



C (15) Patentti myönnetty
Patent no 10114 88 02 1003

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12N 15/27, C 12P 21/00, C 07K 15/06

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	843844
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.10.84
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	01.10.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	05.04.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.11.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	04.10.83 US 539050 P
	19.03.84 US 590867 P

(71) Hakija - Sökande

1. Schering Biotech Corporation, 1454 Page Mill Road, Palo Alto, Cal. 94304, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Yokota, Takashi, 443 Ventura Avenue # 14, Palo Alto, Cal. 94306, USA, (US)
2. Lee, Frank Don, 212 Rinconada Avenue, Palo Alto, Cal. 94301, USA, (US)
3. Rennick, Donna Maye, 14305 Saddle Mountain Road, Los Altos Hills, Cal. 94022, USA, (US)
4. Arai, Ken-ichi, 648 Georgia Avenue, Palo Alto, Cal. 94306, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Leitzinger Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä tuottaa polypeptidiä jolla on monilinjainen nisäkkäsolun kasvutekijäaktiivisuus ja polypeptidin koodaava nukleinihapposekvenssi
Förfarande för produktion av polypeptider som visar en flerlinjig däggdjurscellers växtfaktoraktivitet och nukleinsyrasekvens därav

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 77571 (C 12F 1/00, Ajinomoto Co.), EP A 91539 (C 12N 15/00, Ajinomoto Co., PL 2 § 2)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kohteena ovat plasmidivektorit, joissa on komplemen-
taarisia DNA (cDNA)-klooneja, jotka koodaavat poly-
peptidejä, joilla on monilinjainen nisäkkäsolun kasvu-
tekijäaktiivisuus ja/tai nisäkkään syöttösolun kasvu-
tekijäaktiivisuus. Erään tällisen polypeptidin pituus
on 166 aminohappoa, mukaanlukien noin 19 aminohapon
mahdollinen johtosekvenssi. cDNA on peräisin lähetti-
RNA:sta, joka on eristetty concanavaliini-A-aktivoin-
nin jälkeen hiiren T-solulinjasta. cDNA kloonattiin
liittämällä plasmidivektoriin, joka sen jälkeen trans-
formoitiin E.coli'in. Plasmidivektori sisälsi myös
SV40-viruksesta saatuja DNA-segmenttejä, mikä mahdol-
listi cDNA:n ekspressoinnin sen jälkeen, kun oli trans-
fektoitu nisäkkästä peräisin olevaan isäntäsoluun, ku-
ten apinan COS-7-soluihin.

Uppfinningen avser plasmidvektorer med komplementära DNA (cDNA)-kloner, vilka kodar för polypeptider uppvisande flerlinjig däggdjurs cellväxtfaktoraktivitet och/eller däggdjurs mastcellväxtfaktoraktivitet. En av dessa polypeptiders längd är 166 aminosyror inklusive en potentiell ledarsekvens av ca 19 aminosyror. cDNA:n erhålles från budbärar-DNA, som isolerats från en möss-T-cellinje efter aktivering med concanavalin A. cDNA:t klonades genom inkludering i en plasmidvektor, vilken sedan ~~transformerades~~ till E. coli. Plasmidvektorn innehöll även DNA-segment från SV40-viruset, vilket möjliggjorde expression av cDNA:t efter transfektion till ett däggdjur värdcell, såsom COS-7 celler i apa.

Menetelmä tuottaa polypeptidiä jolla on monilinjainen nisäkässolun kasvutekijäaktiivisuus ja polypeptidin koodaava nukleiinihapposekvenssi - Förfarande för produktion av polypeptider som visar en flerlinjig däggdjurscellers växtfaktoraktivitet och nukleinsyra-sekvens därav

Tämän keksinnön kohteena on yleisesti sanoen rekombinantti-DNA-tekniikan soveltaminen nisäkkään immuunireaktion säätelymekanismin selvittämiseen. Tarkemmin sanoen sen kohteena on menetelmä tuottaa polypeptidejä, joilla on monilinjainen solun kasvutekijäaktiivisuus ja/tai syöttösolun kasvutekijäaktiivisuus, koodaavien deoksiribonukleiinihappo (DNA)-kloonien eristäminen sekä tässä menetelmässä käytetty nukleiinihapposekvenssi.

Rekombinantti-DNA-tekniikka tarkoittaa yleisesti tekniikkaa, jossa donorilähteestä saatu geneettinen informaatio yhdistetään vektoreihin, jotka sen jälkeen prosessoidaan isäntäeliöön, esimerkiksi viemällä siihen, jolloin siirretty geneettinen informaatio kopioituu ja/tai ekspressoituu uudessa ympäristössä. Geneettinen informaatio on yleensä lähetti-RNA:sta (mRNA) saatuna komplementtisena DNA:na (cDNA), joka koodaa haluttua proteiinituotetta. Kantaja on usein plasmidi, joka kykenee yhdistämään cDNA:n isäntäeliöön myöhempää replikaatiota varten ja eräissä tapauksissa myös säätelämään cDNA:n **ekspressiota** ja näin suoraan koodatun tuotteen synteesiä isäntäeliössä.

Tämä tekniikka on edennyt viime vuosina äärimmäisen nopeasti, ja monia erilaisia eksogeenisiä proteiineja on ekspressoitu monissa erilaisissa isäntäeliöissä. Seuraavassa on esimerkkinä eräitä näin tuotettuja eukaryoottisia proteiineja:

- proinsuliini (Naber, S. et al., Gene 21: 95-104/1983/);
- interferonit (Simon, L. et al., Proc. Nat Acad Sci. U.S.A., 80: 2059-2062/1983/ ja Dernynck, R. et al., Nucl. Acids Res. 1: 1819-1837 /1983/; ja kasvuhormoni (Goeddel, D., et al., Nature 281: 544-548/1979/). (Näiden julkaisujen

ja muun referoidun aineiston tarkoituksena on antaa lisää yksityiskohtia kyseisen alan taustasta ja erikoistapauksissa keksinnön toteuttamisesta. Nämä julkaisut ja aineistot on tässä yhteydessä annettu viitemateriaalina.)

Jonkin aikaa on pidetty dogmina, että lisäksi immuunireaktio johtui pääasiassa joukosta monimutkaisia solujen vuorovaikutuksia, nk. "immuuniverkostosta". Vaikkakin edelleen on selvää, että suuri osa reaktiosta todella johtuu lymfosyyttien, makrofaagien, granulosityttien ja muiden solujen verkostomaisista vuorovaikutuksista, immunologit ovat yleisesti nykyään sitä mieltä, että liukoisilla proteiineilla (esimerkiksi nk. lymfokiineilla) on kriittinen rooli näiden solujen vuorovaikutusten säätelyssä.

Lymfokiinit ilmeisestikin välittävät soluaktiivisuuksia monella eri tavalla. Niiden on osoitettu kykenevän tukemaan erilaisten lymfosyyttien lisääntymistä ja kasvua ja itse asiassa niillä uskotaan olevan ratkaiseva osuus monipotentiaalisten hematopoieettisten kantasolujen perusdifferensioitumisessa valtavaksi joukoksi erilaisten solulinjojen edeltäjiä, jotka ovat syynä immuunireaktioon. Tässä reaktiossa tärkeisiin solulinjoihin kuuluu kaksi lymfosyyttiluokkaa: T-solut, jotka voivat tuottaa ja erittää immunoglobuliineja (proteiineja, jotka kykenevät tunnistamaan vieraan aineksen ja sitoutumaan siihen ja näin poistamaan sen), ja T-solut (eri aliryhmiin kuuluvia), jotka indusoivat tai supressoivat B-soluja ja eräitä muita immuuniverkoston muodostavia soluja (mukaanlukien muita T-soluja).

Toinen tärkeä solulinja on syöttösolu-tumallinen sidekudos-solu, joka sijaitsee lähellä kapillaareja kaikkialla kehossa, erityisen suurina konsentraatioina keunkeissa, iholla ja ruoansulatuskanavassa ja sukupuoli-virtsakanavassa. Syöttösoluilla on keskeinen osuus allergiamaisissa taudissa, erityisesti anafylaksissa. Tämä osuus voidaan lyhyesti esittää seuraavasti: kun tietyt antigeenit ristisitovat

erityiset immunoglobuliinit, jotka ovat sitoutuneet syöttösolun pinnalla oleviin reseptoreihin, syöttösolu poistaa tumansa ja vapauttaa väliteaineet (esimerkiksi histamiini, serotoniini, hepariini, kiniinit jne.), jotka aiheuttavat allergiareaktioita, esimerkiksi anafylakseja.

Tutkimusta, jonka avulla on yritetty paremmin ymmärtää (ja siten mahdollisesti hoitaa terapeuttisesti) allergiaa, anafylaksiaa ja muita immuunitauteja tutkimalla immuuni-reaktioon liittyviä syöttösoluja, T-soluja ja muita soluja, on estänyt se, että yleisesti ei ole kyetty ylläpitämään näitä soluja in vitro. Useat immunologit ovat kuitenkin äskettäin havainneet, että tällaisia soluja voitaisiin eristää ja viljellä kasvattamalla niitä muista soluista saaduilla eritteillä, esimerkiksi käsitellyillä alustoilla, jotka on saatu konkanavaliini A:lla (ConA) stimuloituista pernan lymfosyyteistä. Tästä työstä on nyt tullut ilmeiseksi, että solukloonien muodostuminen riippuu spesifisistä tekijöistä, kuten lymfokiineista.

Ilmeisestikin kaikkia veren solutyyppejä muodostuu koko ajan aikuisen selkärankaisen luuytimessä hematopoieettisten edeltäjäsolujen hierarkian kasvun ja erikoistumisen kautta.

Tämän hierarkian huipussa on monipotentiaalinen kantasolu, joka voi varustaa kuolettavasti säteilytetyn eläimen uudelleen suurimmalla osalla, jos ei kaikillakin, immunologisia solutyyppejä (esimerkiksi punasolut, verihiutaleet, lymfosyytit, erilaiset granulosyytit ja monosyytit/makrofaagit). Tällä monipotentiaalisella solulla ei ole vain kyky regeneroida monipotentiaalisten kantasolujen kammiot (itseuudistuminen), vaan myös muodostaa edeltäjäsoluja, jotka tulevat kehittymään pitkin jotakin tiettyä linjaa. Jonkin tietyn tehtävöityneen kantasolun jälkeläisillä näyttää olevan sama solutehtävä kuin emäsolulla (Metcalf. D., "Hemopoietic Colonies", Springer Publishing Co., New York, N.Y, /1977/).

Hematopoieesin in vitro tutkimukset ovat osoittaneet, että

monet liukoiset pesäkkeitä stimuloivat tekijät (CSF) voivat säädellä näiden erilaisten edeltäsolujen kasvua. Eräät näistä tekijöistä on osittain puhdistettu ja niiden on osoitettu vaikuttavan spesifisesti kyseiseen solulinjaan kuuluviin kantasoluihin. Esimerkiksi erytropoietiini stimuloi erytroidi-hierarkian enemmän erikoistuneita jäseniä (Miyake, T., et al., J. Biol. Chem. 252: 5558 /1977/), ja eräs toinen tekijä (pesäkkeitä stimuloiva tekijä-makrofaagi eli CSF-1) stimuloi ensisijaisesti makrofaagin kasvua luuydinsolujen puolikiinteissä viljelmissä (Stanley, E., ja Heard, P., J. Biol. Chem. 252: 4305 /1977/). Vielä eräs toisen tyyppinen kasvutekijä näyttää kykenevän stimuloimaan hematopoieettisia pesäkkeitä, jotka muodostuvat yksistä ainoista solutyypeistä ja solujen seoksista. Niiden solujen erilaisuus, esimerkiksi erytrosyytit, megakaryosyytit, granulositytit, syöttösolut ja monosyytti/makrofaagit, jotka reagoivat yhdelle toisen tyyppiselle tekijälle, ovat antaneet sille nimeksi monilinjainen solun kasvutekijä (multi-CSF) (Iscoe, N. et al., J. Cell. Physiol. Suppl., 1: 65-78 /1982/). Nimi osoittaa sen kykyä vaikuttaa moniin tehtävöityneisiin edeltäjäsoluihin ja mahdollisesti myös monipotentiaalisiin kantasoluihin.

Yksi paremmin karakterisoiduista tekijöistä on interleukiini-1 (IL-1), makrofaageista vapautunut tekijä, joka indusoi tymosyyttien ja perifeeraalisten T-solujen replikoitumisen (Mizel, S. et al., J. Immunol. 120: 1497-1503 /1978/). Interleukiini-2 (IL-2) ja interleukiini-3 (IL-3) ovat samoin kaksi paljon tutkittua lymfokiinia, jotka tietyt stimuloitavat lymfosyytit vapauttavat. Erittäin merkittävä IL-2-tekijän ominaisuus on sen kyky lukea tiettyjen T-solujen jatkuvaa kasvua in vitro (Farrar et al., Ann. N.Y. Acad Sci. 332: 303-15 /1979/). Samoin IL-3-tekijän eräs tärkeä ominaisuus on sen kyky tukea solulinjojen, joilla on syöttösolujen fenotyyppisiä ominaisuuksia, kasvua (Ihle, J. et al., Immunological Rev. 63: 5-32 /1982/). IL-3-tekijästä johtuvaksi on ilmoitettu myös joukko muita solujen kasvu-

ominaisuuksia (kts. Ihle, J. et al., J. Immunol. 131: 282-287 ja 129: 2431 /1981/), mutta sen suhde multi-CSF-tekijään ei ole ollut täysin selvä.

Vaikkakin sekä hiiren IL-2-tekijä että IL-3-tekijä on ainakin osittain karakterisoitu biokemiallisesti (Gillis, S. et al., J. Immunol. 124: 1954-1962 /1980/ ja Ihle, J. et al., J. Immunol. 129: 2431-2436 /1982/, IL-2-tekijää pidetään tällä hetkellä T-solujen kasvusta vastuussa olevana pääasiallisena tekijänä, kun taas samassa määrin ei ole päästy yhteisymmärrykseen proteiinista (proteiineista), joka on vastuussa syöttösolujen kasvutekijästä (MCGF) ja CSF-aktiivisuudesta. Nykyään uskotaan, että hiiren IL-2-tekijän molekyylipaino (luultavasti dimeerinä) on noin 30-35.000 (Simon, P. et al., J. Immunol. 122: 127-132 /1979/), vaikkakin eräitä variaatioita on havaittu (Robb, R. ja Smith, K., Molec. Immun. 18: 1087-1094 /1981/); ja ihmisen IL-2-tekijän molekyylipaino on ilmeisesti noin 15.000 (Gillis, S. et al., Immun. Rev. 63: 167-209 /1982/). Lisäksi äskettäin on raportoitu ihmisen IL-2-tekijää koodaava cDNA-klooni (Taniguchi, T. et al., Nature 302: 305-310 /1983/). Hiiren syöttösolujen kasvutekijöiden molekyyli-painoiksi on toisaalta toisista tiedoista poiketen ilmoitettu 45.000 (Nabel et al., Nature, 291: 332-334 /1981/), 35.000 (Yung, Y. et al., J. Immunol. 127: 794-799 /1981/) ja 28.000 (Ihle, J. et al., J. Immunol. 129: 1377-1383 /1982/). Samankaltaisia epäjohdonmukaisuuksia liittyy CSF-tekijään.

Vaikkakin tällaiset molekyylipainon erot voitaisiin osittain selittää erisuurella glykosylaatiolla, asian selvittäminen vaatii lisätietoja rakenteesta, esimerkiksi kyseessä olevien molekyylien oleellisesti täyspitkän sekvenssianalyysin. Proteiinin sekvenssointi on luonnollisesti eräs ongelman mahdollinen ratkaisukeino, mutta tämä on erittäin vaikea kokeellinen työ eikä sillä läheskään aina saada täysin tarkkoja tai täyspitkiä aminohapposekvenssejä. Lisäksi se, että kyetään valmistamaan suuria määriä polypeptidiä,

jolla on nisäkkään MCGF- tai CSF-aktiivisuutta, helpottaa suuresti syöttösolujen ja muiden immuunireaktioon liittyvien solujen biologian tutkimista; esimerkiksi siten, että solujen kasvun stimuloinnissa ei välttämättä tarvitse turvautua ConA-käsitelyihin alustoihin. MCGF-tai CSF-tekijää koskevat tarkat ja täydelliset sekvenssitiedot osaltaan myös yksinkertaistavat muiden immunologisten tekijöiden etsimistä. Mistä tahansa lymfokiinista saatu lisätieto auttaa myös immuuniverkoston eri kasvutekijöiden ja solujen roolien arvioimista ja antaa siten kuvan koko immuunijärjestelmästä - ja samalla kertaa terapeuttisista eduista.

Näin ollen tarvitaan suuresti laajaa nukleotidisekvenssitiedostoa sellaisista DNA-lajeista ja niiden aminohapposekvensseistä, jotka koodaavat proteiineja, joilla on MCGF- tai CSF-aktiivisuutta. Samoin on olemassa suuri tarve yksinkertaisesta ja taloudellisesta menetelmästä, jolla tällaisia aineita voidaan valmistaa tuntuvia määriä oleellisesti puhtaana. Esillä oleva keksintö täyttää nämä tarpeet.

Esillä oleva keksintö tuo esiin cDNA-kloonit, jotka koodaavat polypeptidejä, joilla on nisäkkään syöttösolujen kasvutekijäaktiivisuutta (MCGF)-aktiivisuus ja monilinjainen solun kasvutekijäaktiivisuus. Kuviossa 1 on esitetty nukleotidisekvenssi cDNA:lle ja oletettu aminohapposekvenssi tähän liittyvälle polypeptidille. cDNA-sekvenssi voi olla integroitunut erilaisiin vektoreihin, jotka vuorostaan voivat ohjata vastaavien polypeptidien synteesiä erilaisissa isännissä, mukaanlukien eukaryoottisissa soluissa, kuten nisäkkään viljelmäsoluissa.

Tarkemmin sanoen keksintö tuo esiin menetelmän, jolla tuotetaan polypeptidiä, jolla on monilinjainen nisäkäsolun kasvutekijäaktiivisuus ja joka sisältää seuraavan aminohapposekvenssin

Asp - Thr - His - Arg - Leu - Thr - Arg - Thr -
 Leu - Asn - Cys - Ser - Ser - Ile - Val - Lys -
 Glu - Ile - Ile - Gly - Lys - Leu - Pro - Glu -
 Pro - Glu - Leu - Lys - Thr - Asp - Asp - Glu -
 Gly - Pro - Ser - Leu - Arg - Asn - Lys - Ser -
 Phe - Arg - Arg - Val - Asn - Leu - Ser - Lys -
 Phe - Val - Glu - Ser - Gln - Gly - Glu - Val -
 Asp - Pro - Glu - Asp - Arg - Tyr - Val - Ile -
 Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Lys - Leu - Asn -
 Cys - Cys - Leu - Pro - Thr - Ser - Ala - Asn -
 Asp - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Val - Phe -
 Ile - Arg - Asp - Leu - Asp - Asp - Phe - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Arg - Phe - Tyr - Met - Val -
 His - Leu - Asn - Asp - Leu - Glu - Thr - Val -
 Leu - Ala - Ser - Arg - Pro - Pro - Gln - Pro -
 Ala - Ser - Gly - Ser - Val - Ser - Pro - Asn -
 Arg - Gly - Thr - Val - Glu - Cys - ;

jolle menetelmälle on tunnusomaista se, että se käsittää vaiheet, joissa

a) muodostetaan vektori, joka käsittää mainittua polypeptidiä koodaavan nukleotidisekvenssin, erityisesti mainittua polypeptidiä koodaavasta mRNA-sekvenssistä saadun cDNA-sekvenssin, jolloin vektorin sisältävä nisäkäs- tai bakteeri-isäntä kykenee ekspressoimaan nukleotidisekvenssin, joka kykenee koodaamaan mainitun polypeptidin;

b) liitetään vektori isäntään; ja

c) pidetään vektorin sisältävä isäntä olosuhteissa, jotka sopivat nukleotidisekvenssin ekspressoimiseen mainituksi polypeptidiksi.

cDNA-sekvenssit saadaan parhaiten polypeptidejä koodaavasta mRNA-sekvenssistä, ja isäntä on organismi, kuten vektorilla

transfektoitu tai transformoitu eukaryoottisoluna, esimerkiksi nisäkässolu. Vektori käsittää lisäksi parhaiten myös toisen nukleotidisekvenssin, joka kykenee säätelemään polypeptidiä koodaavan nukleotidisekvenssin ekspressoitumista. Tämä toinen sekvenssikoodi voi sisältää promoottorisekvenssin, yhden tai useampia intronisekvenssejä ja polyadenyylaatiosekvenssin, jolloin polypeptidiä koodaava nukleotidisekvenssi voidaan vastaavasti transkriptoida, lohkaista ja polyadenyloida.

Erityisesti, kun isäntä on nisäkässolu, kuten apinan (munuaisten) COS-7-solu, vektori sisältää SV40 viruksen (simian virus 40) alkualueen promoottorin promoottorisekvenssin ja SV40 jälkialueen polyadenylointisekvenssin.

Kuviossa 1 esitetty (kts. jäljempänä) hiiren cDNA-sekvenssi kykenee hybridisoitumaan muiden DNA-sekvenssien kanssa, kuten cDNA- tai genomikirjastosta saadun DNA:n kanssa, joka koodaa muita nisäkkään kasvutekijöitä. Huomattava on, että kuvatut cDNA-sekvenssit näyttävät sisältävän informaatiota johtosekvenssistä.

Esillä olevan keksinnön mukaiset polypeptidit kykenevät parantamaan nisäkkään syöttösolujen ja muiden solujen kasvua, erityisesti in vitro viljelmissä. Sopivia farmaseuttisia seoksia voidaan valmistaa lisäämällä polypeptidit (joiden preparaattit eivät oleellisesti sisällä muita nisäkkään kasvutekijöitä) terapeuttisesti yhteensopiviin kantajiin.

Keksinnön muut tunnusmerkit ja edut ovat ilmeisiä seuraavasta yksityiskohtaisesta kuvauksesta, jossa esillä olevaa keksintöä on kuvattu mukaanliitettyjen piirustusten ja esimerkin avulla.

Piirustuksissa:

Kuvio 1 esittää cDNA-kloonin, jolla on monilinjainen solun kasvutekijäaktiivisuus, nukleotidisekvenssiä ja oletettua vastaavaa aminohapposekvenssiä.

Kuvio 2 kuvaa MCGF-aktiivisuuden määrää ConA-stimuloiduissa CI.Ly 1+2-/9 soluista eristetyn mRNA:n sakkaroosi-gradientti-sedimentaation jakeissa. 18S ja 28S ribosomipiikkien sijaintikohdat on osoitettu.

Kuvio 3 esittää pcD-MCGF, cDNA-kloonin sisältävää plasmidia, jolla on syöttösolun kasvutekijäaktiivisuutta ja monilinjaista solun kasvutekijäaktiivisuutta.

Kuvio 4 on restriktioendonukleaasi-lohkaisukartta kuvion 3 mukaisesta cDNA-insertistä.

Kuviossa 3 on osoitettu nuolella 950 bp cDNA-insertin, joka on SV40-alkupromoottorista saadussa pcD-ekspressiovektorissa, transkriptio. Katkaisudonorin ja -akseptorin sijaintikohdat on annettu. Polyadenylointisignaali, joka myös on saatu SV40:stä, sijaitsee cDNA-insertin 3'-päässä. cDNA-insertti on varjostettu tiheästi. Loput vektorisekvensseistä on saatu pBR322:sta, mukaanlukien β -laktamaasigeeni (Amp^R) ja replikaation alkukohta.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti tehdään komplementtiset DNA (cDNA) kloonit polypeptideille, joilla on nisäkkään syöttösolun kasvutekijä (MCGF)-aktiivisuutta ja/tai monilinjaista solun kasvutekijän (multi-CSF)-aktiivisuutta. Sen jälkeen, kun cDNA-sekvenssit on liitetty replikoituviin ekspressiovektoreihin ja vektorit on transfektoitu sopivaan

isäntään (esimerkiksi nisäkässoluviljelmä), ekspressoitunut polypeptidi (tai polypeptidit) voi antaa syöttösolujen ja hemapioieettisten soiujen laajeta moniksi solulinjoiksi.

Kuviossa 1 on esitetty esimerkkinä oletettu aminohapposekvenssi, joka perustuu eristettyyn nukleotidisekvenssiin. Osa ennustetusta sekvenssistä (aminohapot 33 - 41) on identtinen hiiren interleukiini-3:n (IL-3), jolla on osoitettu olevan hiiren MCGF-aktiivisuutta ja multi-CSF-aktiivisuutta (Ihle, J. et al., J. Immunol. 129, 2431-2436 /1982/; Ihle, J. et al., J. Immunol. 131, 282-287 (1983); ja Garland, J. et al., toim. Oppenheim, J. ja Cohen, S., "Interleukins, Lymphokines, and Cytosines" Proceedings of Third Int. Lymphokines Workshop, Academic Press, New York, sivut 123-129 /1983/), raportoidun NH₂-terminaalisekvenssin kanssa. Koodialue, joka sijaitsee translaation lähtökodonin (ATG) ja IL-3:ssa olevan sekvenssin lähtökohdan välillä, sisältää runsaasti hydrofobisia aminohappoja, kuten on odotettavissa erittyneen proteiinin johtosekvenssille. Sen vuoksi erittyneessä tilassa oleva polypeptidin valmismuoto in vivo luultavasti alkaa Asp-tähteellä, kuten IL-3, ja proteolyyttinen käsittely poistaa noin 20 edeltävää aminohappoa, jotka muodostavat oletetun johtosekvenssin. Jos tämän oletetaan olevan oikein, niin MCGF- ja multi-CSF-aktiivisuuksia omaava valmis polypeptidi muodostuisi 134:stä aminohaposta lasketun molekyylipainon ollessa noin 15.000. Lisäksi neljän potentiaalisen N-glykosylaatiokohdan, so. Asn-X-Ser (jossa X on aminohappotähde) polypeptidin oletetuissa aminohappokohdissa 42-44, 70-72, 77-79 ja 112-114 (kts. Neuberger et al., Glycoproteins 5, 450-490, Elsevier Publishing Co., U.S.A. /1972/) mukanaoloviittaa siihen, että tämä olisi glykosyloitunut in vivo.

COS-7 apinasoluihin transfektoituna yksi tämän keksinnön mukaisista cDNA-klooneista ohjaa biologisesti aktiivisen MCGF:n ja multi-CSF:n synteesiä. Tämän ekspressoituneen kloonatun geenituotteen lisääminen hiiren luuydinsoluviljelmiin mahdollistaa useisiin solulinjoihin tehtävöityneiden hematopoieettisten solujen laajenemisen; se tukee BFU-E-pesäkkeiden (burst-forming erythroid), CFU-G/M-pesäkkeiden (granulocyte/macrophage), syöttösolupesäkkeiden (CFU-mast) sekä moninkertaisten solulinjojen (CFU-Mixed) pesäkkeiden muodostumista ja ylläpitää monipotentiaalisia kantasoluja (CFU-S) nesteviljelmässä.

Esillä olevan keksinnön mukaisten cDNA-lajien valmistamiseen voidaan käyttää monia erilaisia menetelmiä. Esimerkiksi kokonais-mRNA uutetaan (esim. kuten Berger, S. et al., Biochemistry 18: 5143-5149 /1979/ solulinjasta (esimerkiksi hybridisolulinjasta), joka ottaa polypeptidejä, joilla on nisakkään syöttösolun kasvutekijäaktiivisuutta. Kaksisäikeiset cDNA-lajit tästä kokonais-mRNA:sta voidaan konstruoida käyttämällä primeerin initioimaa käänteistranskriptiota (Verma, I., Biochim. Biophys. Acta, 473: 1-38 /1977/), jolloin saadaan ensin jokaisen mRNA-sekvenssin komplementti, ja sen jälkeen priimaamalla toinen säiesynteesi (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9: 2251-2266 /1981/). Tämän jälkeen cDNA-lajit voidaan kloonata liittämällä ne sopiviin plasmidi- tai bakteerifaagivektoreihin (Tougeon, F. et al., Nucleic Acids Res., 2, 2365-2378 /1975/ tai Scherer, G. et al., Dev. Biol. 86, 438-447 /1981/) komplementtisten homopolymeeristen häntien avulla (Efstratiadis, A. et al., Cell, 10, 571-585 /1977/) tai kohesiivisten päiden avulla, jotka on muodostettu käyttämällä linkkerisegmenttejä, joissa on sopivat restriktiokohdat (Seeburg, P. et al., Nature, 270, 486-494 /1977/ tai Shine, J. et al., Nature, 270, 494-499 /1977/), ja sen jälkeen transformoimalla sopiva isäntä. (Kts. yleisesti Efstratiadis, A., ja Villa-Kormaroff, L., "Cloning of double stranded cDNA" kirjassa Setlow, J. ja Hollaender, A. (toim.) Genetic

Engineering, Vol. 1, Plenum Publishing Corp., N.Y., U.S.A. /1982/).

Parhaana pidetty menetelmä, jolla saadaan tämän keksinnön mukaisia täyspitkiä kloonattuja cDNA-lajeja, on H. Okayama'n ja P. Berg'in kehittämä menetelmä (Mol. and Cell. Biol., 2: 161-170 /1982/). Tämän menetelmän etuna on, että cDNA-insertit laitetaan bakteerikloonausvektoriin sellaiseen kohtaan, että cDNA voi nisäkässoluissa myös suoraan transloitua ja prosessoitua. Lyhyesti sanoen priimataan ensimmäinen cDNA-säie polydeoksitymidyylihapolla, joka on kovalenttisesti liitetty lineaarisen plasmidivektori-DNA:n toiseen päähän. Sen jälkeen plasmidivektori syklisoidaan **linkkeri**-DNA-segmentin kanssa, joka siltaa plasmidin toisen pään cDNA-koodaussekvenssin 5'-päähän. Käyttämällä DNA-fragmenttia, joka sisältää SV40 (Simian Virus 40) alkuaalueen promoottorin ja linkkerin, jossa on modifioitu SV40 jälki-alueen introni, voidaan cDNA ekspressoida in vitro COS-7 hiiren munuaissoluissa ilman enempää modifiointia. (Kts. yleisesti Okayama, H. ja Berg, P., Mol. and Cell. Biol., 3: 280-289 /1983/ ja Jolly, D. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 80: 477-481 /1983/).

Halutut cDNA-kloonit voidaan myös detektoida ja eristää hybridisointiseulomalla sopivilla mRNA-näytteillä (Heindell, H. et al., Cell, 15: 43-54 /1978/). Vaihtoehtoisesti voidaan cDNA-kirjastot seuloa hybridiselektion avulla (Harpold, M. et al., Nucleic Acid Res., 5: 2039-2053 /1978/ tai Parnes, J. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 78: 2253-2257 /1981/) tai Xenopus-oosyyteissä (Aurdon, J., Nature, 233: 177-182 /1971/). (kts. yleisesti Villa-Komaroff, L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 75: 3727-3731 /1978/).

Kun cDNA-kirjasto Okayama/Berg-plasmidivektorissa on tehty, cDNA-kloonit kerätään ja haluttujen cDNA-lajien läsnäolo (random pools) tarkistetaan hybridiselektion, translaation ja määritysten avulla (esimerkiksi mittaamalla MCGF tai

multi-CSF kasvutekijäaktiivisuus, antigeenideterminanttien läsnäolo tai muut biologiset aktiivisuudet). Näiden kriteereiden perusteella positiiviset joukot voidaan sen jälkeen tutkia sopivalla kehitetyllä koettimella, esimerkiksi B-solulinjasta ja/tai indusoimattomasta T-solulinjasta saadulla cDNA:lla. Tämän jälkeen positiiviset joukot, jotka on käsitelty koettimella, jaetaan yksittäisiksi klooniksi, jotka testataan transfektoimalla sopivaan isäntään (kuten nisäkässoluviljelmään), ja haluttu aktiivisuus määritetään isännän supernatantista (esimerkiksi multi-CSF- tai MCGF-aktiivisuus). Sen jälkeen sekvenssoidaan positiiviset kloonit.

Kun seuraavassa kuvataan menetelmiä, jotka koskevat keksinnön mukaisten cDNA-kloonien valmistamista, käsitellään ensin syöttösolulinjat ja muut linjat, minkä jälkeen kuvataan yleisesti seuraavia: Menetelmät, joilla translatoidaan MCGF-aktiivisuutta omaavaa proteiinia koodaava mRNA; cDNA-sekvenssejä sisältävän cDNA-kirjaston konstruointi; kirjaston hybridiselektio; plasmidivektorin täyspitkien cDNA-kloonien eristäminen ja lyhempi ekspressointi nisäkässoluissa; multi-CSF-määritykset; ihmisen multi-CSF:n ja MCGF:n eristäminen, subkloonaus ja ekspressointi bakteerissa ja hiivassa; ja puhdistaminen ja formulointi. Jäljempänä on esitetty yksityiskohtaisempi kuvaus kokeellisesta menetelmästä kokonaisuudessaan.

Syöttösolu- ja T-solulinjat

Suositteluja tämän keksinnön yhteydessä käytettyjä soluja ovat solut, jotka on kehitetty Galli'n kuvaamalla tavalla, J. et al. (J. Cell Biol., 95: 435-444 /1982/). Yksi kloonattu syöttösolulinja, josta käytetään merkintää MC/9 ja joka on tallennettu American Type Culture kokoelmaan (ATCC-numero CRL 8306), kasvatettiin DME-alustalla (Dulbecco's modified Eagle's medium), jota oli täydennetty 5 %:lla supernatantteja

ConA-aktivoitua T-solulinjasta, josta käytetään merkintää Cl.Ly 1⁺2⁻/9 ja joka on tallennettu American Type Culture kokoelmaan (ATCC-numero CRL 8179) (Nabel, G. et al., Nature, 291: 332-334 /1981/). Tämä T-solulinja oli saatu C57B1/6 hiirestä (Nabel, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 1157-1161 /1981/), ja tämä ylläpidettiin modifioitussa täydennetyssä DME-alustassa (Nabel et al., Cell, 23: 19-28 /1981/). Se on tämän keksinnön mukaisille polypeptideille sopiva mRNA-lähde, mutta voidaan käyttää myös muita nisäkkösolulähteitä (mukaanlukien ihmisen periferiaverta), jolla on kyseeseen tuleva aktiivisuus (esimerkiksi MCGF tai multi-CSF).

MC/9-soluja käytetään myös MCGF-aktiivisuuden määrittämiseen, parhaiten jo vakiintuneilla tavoilla suoritettuna ³H-tymidiini-menetelmän avulla (esim. Nabel et al., Nature, 291: 332-334 /1981/). MC/9-soluja (10⁴/kaivo) viljellään tasapohjaisilla Falcon'in mikrotiitterilevyillä DME-alustassa, jossa on täydennyksenä 4 % vasikansikiöserumia, 50 µm 2-merkaptotetanolia (2-ME), 2 mM glutamiinia, ei-oleellisia aminohappoja, oleellisia vitamiineja ja eri konsentraatiota supernatanttia lopputilavuuden ollessa 0,1 ml. Jokaiseen viljelmään lisätään 0,5 Ci ³H-tymidiiniä 24 tunnin inkubointiajan viimeiseksi 4 tunniksi. Sen jälkeen solut kerätään lasisuodattimien päälle ja radioaktiivisuus mitataan nestetuikespektrometrillä.

mRNA:n eristäminen ja fraktiointi koon mukaan

Solun kokonais-mRNA voidaan eristää monella eri yleisesti tunnetulla menetelmällä, esimerkiksi käyttämällä Chirgwin'in et al., (Biochemistry, 18: 5294-5299 /1979/), guanidinium-biosyanaatti-uuttomenetelmää. Jos käytetään tätä menetelmää, 1-2 x 10⁸ aktivoitua apu-T-solusta, kuten Cl.Ly 1⁺2⁻/9-soluista saadaan noin 100 µg polyA⁺ mRNA:ta valittuna oligo-(dT) selluloosapyyväillä. mRNA:n fraktioimiseksi koon perusteella 100 µg:n kerros polyA⁺ mRNA:ta laitetaan 10 ml 5-25% sakkaroosigradientin päälle (10 mM Tris.HCl,

pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) ja sentrifugoidaan 19 h/26.000 rpm Beckman SW41 roottorissa. Otetaan talteen 450 µl jakeet ja RNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia.

Xenopus laevis oosyyttien hybridiselektio ja mikroinjisointi

Suodatinhybridisoinnit suoritetaan parhaiten oleellisesti Parnes'in et al. kuvaamalla tavalla (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 2253:2257 /1981/). Alalla yleisesti tunnetuilla menetelmillä injisoidaan eluoituja mRNA-eriä yksittäisiin Xenopus laevis oosyytteihin. Elävistä oosyyteistä saadut supernatantit kerätään 48 tunnin kuluttua, yhdistetään ja niistä määritetään aktiivisuudet.

cDNA-kirjaston rakentaminen

cDNA-kirjasto voidaan parhaiten rakentaa käyttämällä pcDV1 vektori-primeeriä ja pL1 linkkerifragmenttia /saatavissa P-L Biochemicals Inc.-yhtiöstä, Milwaukee, WI) menetelmillä, joilla saadaan mRNA-transkriptien suuresti rikastuneita täyspitkiä kopioita (esim. Okayama, H. ja Berg. P., Mol. Cell biol., 2, 161-170 /1982/ ja Mol. Cell biol., 3, 280-289 /1983/). Plasmidivektori, joka sisältää SV40 alkupromoottorin ja SV40 RNA-prosessointisignaalit, on tehty niin, että se edistää kloonatun cDNA-segmentin ekspressoitumista tuonkäsolutussa.

Okayama'n ja Berg'in menetelmällä transformoidaan syklisoitu vektori-cDNA-preparaatti kompetenttiin bakteerisoluuun, kuten E.coli MC1061 soluihin (Casadaban, M. and Cohen, S., J. Mol. Biol., 138: 179-207 /1980/ käyttämällä kalsiumkloridia (Cohen, S. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2110-2114 /1972/). Kun käytetään 5 µg ConA-stimuloituista Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluista saatua polyA⁺ RNA:ta saadaan noin 1,5 x 10⁶ itsenäistä transformanttia. Noin 10⁴ kloonaa poimitaan yksitellen ja siirrostetaan mikrotiitterilevyjen kaivoihin (Flow Laboratories Inc., McLean, Virginia),

jotka sisältävät 200 µl l-lientä, 50 µg/ml ampicilliinia ja 7 % dimetyylisulfoksidia. H. Okayama'n ja P. Berg'in, (Mol. Cell Biol., 3, 280-289 /1983/), kuvaamalla tavalla valmistetaan haluttaessa alikirjastoja cDNA-totaalikirjastosta cDNA-insertin koon perusteella. Lyhyesti sanoen plasmidi-DNA käsitellään erikseen Sall-, Clal- ja HindIII-entsyymeillä ja elektroforesoidaan 1-prosenttisella agarosigeelillä. Etidiumbromidi-värjäyksen jälkeen geeli leikataan 7 osaan, jotka vastaavat cDNA-inserttikokoja 0 - 1, 1 - 2, 2 - 3, 3 - 4, 4 - 5, 5 - 6 ja yli 6 kiloemästä (kb). DNA uutetaan jokaisesta leikkeestä, syklisoidaan uudelleen T4 DNA-ligaasilla ja tällä transformoidaan MC1061. Nukleotidisekvenssointi kokonaisuudessaan voidaan suorittaa A. Maxam'in ja W. Gilbert'in menetelmällä (Methods Enzymol., 65: 499-560 /1980/).

Pienennetyn cDNA-koettimen valmistaminen

³²P-cDNA-koetin rikastetaan haluttaessa ConA-indusoidun sekvenssin suhteen kahden cDNA-absorptiojakson avulla, joilla poistetaan cDNA-sekvenssit, jotka ovat yhteisiä immuunijärjestelmän Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluille ja lähisukuisille, mutta tehtävöityneille soluille, kuten B-solumyeloomalle (kts. Davis, M. et al., "Isolation of B4 T-Cell Specific Genes", Vitteta, E. ja Fox, C. toim. UCLA Symp., s. 48 /1982/). Kääntötranskriptausin templaattina käytetään parhaiten noin 2 µg sakkaroosigradianttijakeesta saatua mRNA:ta, jolla on MCGF- ja multi-CSF-aktiivisuutta, käyttämällä oligo (dT) 12-18 primeerejä (saatavissa Collaborative Research-yhtiöstä, Waltham, Mass.). RNA:n alkalihydrolyysin jälkeen ³²P-cDNA hybridisoidaan 68°C:ssa 14 tuntia (cot-luku= 5.000) 20 µg mRNA-erien kanssa, jotka on saatu seuraavista: WEH1-231, B-solu-lymfooma (kts. esim. Taussig et al., Immunology 39: 57-60 /1980/) ja NS-1-peräinen hybridoma (ATCC-numero HB-8113). Hybridisoitumaton cdNA erotetaan cDNA/RNA-hybrideistä pylväskromatografoimalla hydroksiapatiitilla. Toinen pienentäminen voidaan sen jälkeen suorittaa

edellä kuvatulla tavalla ($cot = 1.100$) hybridisoitumattomalla ^{32}P -cDNA:lla käyttämällä ylimäärä mRNA:ta (10 ug), joka on saatu indusoitumattomista Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluista. ConA-indusoitujen sekvenssien suhteen käytettyä yksisäikeistä ^{32}P -cDNA:ta, joka muodostaa noin 1-2 % lähtöaineesta, käytetään sen jälkeen pesäkehybridisoinnissa (Maniatis, l. et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. /1982/).

DNA-transfektoinnit apinasoluihin

Noin 1×10^6 COS-7 apinan munuaissolua siirretään 60 mm maljoille päivää ennen transfektointia. Transfektoinneissa käytetään parhaiten 15 μ g plasmidi-DNA:ta 1,5 ml:ssa DME:tä, joka sisältää 50 mM Iris.HCl, pH 7,4 ja 400 μ g/ml DEAE-dekstraania (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi). Sen jälkeen tämä liuos poistetaan 4 tunnin kuluttua ja korvataan seoksella, jonka koostumus on 2,0 ml DME + 4 % vasikansikiöseerumia. 72 tunnin kuluttua medium otetaan taltteen ja siitä määritetään edellä kuvatulla tavalla MCGF- tai multi-CSF-aktiivisuus. DNA-transfektoinnit voidaan suorittaa myös monissa muissa erilaisissa solulähteissä (kts. jäljempänä).

Multi-CSF-määritykset

Multi-CSF-aktiivisuuden määrittämisessä testataan kyky vaikuttaa monipotentiaalisiin edeltäjäsoluihin tai useaan solulinjan suhteen rajoitettuun soluun tai testataan kumpikin kyky. (kts. yleisesti Iscove, N. et al., J. Cell Physiol. Suppl. 1: 65-78 /1982/ ja Ruppert, S., Exp. Hematol. 11: 154-161 /1983/). Määrittäsolosuhteiden perustana on, että ne sallivat BFU-E-pesäkkeiden (burst-forming erythroid), CFU-G/M-pesäkkeiden (granulocyte/macrophage) ja solulinjaltaan sekalaisten pesäkkeiden (CFU-Mixed) muodostumisen. Määritykset suoritetaan yleisesti D. Metcalf'in et al. (J. Cell Physiol., 98: 401-420 /1979/) ja G. Johnson'in (J. Cell Physiol.,

103: 371-383 /1980/) menetelmillä.

CSF-c-määritys (Colony Forming Unit - culture)

Luuydinsoluja voidaan kerätä C57B1/6 hiirten reisiluista. Solut pestään kerran ja valmistetaan yksisoluinen suspensio Iscove'n modifioidussa Dulbecco'n alustassa, /MDM/ (GIBCO, Grand Island, New York), jossa on lisäksi 3 % vasikansikiöseerumia /FCS/ (GIBCO). Tämä yksisoluinen suspensio maljataan muovisiin kudosviljelymaljoihin ja inkuboidaan 1-2 tuntia 37°C-lämpötilaisessa inkubaattorissa (jossa 6 % CO₂) niin, että solut voivat kiinnittyä maljaan. Sen jälkeen kiinnittymättömät solut poistetaan ja laitetaan eräissä tapauksissa epäjatkuvaan Percoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)-gradienttiin, jotka muodostuvat 2 ml:n kerroksista, joissa on 40 %, 50 %, 60 %, 70 % Percoll-liuosta (Kakiuchi *et al.*, J. Immunol., 131: 109 /1983/). Eri välipinnoilla olevat solut kerätään erikseen ja pestään kaksi kertaa IMDM + 3 % FCS-seoksella. (Percoll-gradienttiin laittamattomat solut voidaan vaihtoehtoisesti pestä kerran IMDM + 3 % FCS-seoksella). Erilliset solupelletit suspendoidaan sen jälkeen IMDM + 15 % FCS-seokseen 4,5-6 x 10⁶ solua/ml konsentraatiossa.

CFU-c-viljelmät voidaan sen jälkeen määrittää käyttämällä Isoce'n *et al.* (J. Cell Physiol., 83: 309 /1974/) metyyli-selluloosa-menetelmän muunnelmaa. Sekoiteaan FCS (loppukonsentraatio 25 %), 2-merkaptetaanli (5 x 10⁻⁵M), penisilliini-streptomysiini (1:100 GIBCO-perusliuoksia), metyyli-selluloosa (1,1 %, 4000 senttipoisea), solut (1,5-2 x 10⁵/ml) ja CFU-c-kyvyn suhteen testattavat erilaiset koetekijät (30 %) ja pienelle petrimaljalle laitetaan 1 ml seosta. Maljoja inkuboidaan 7 päivää 37°C/6 % CO₂ inkubaattorissa. Sen jälkeen niistä lasketaan pesäkkeet käyttämällä leikkausmikroskooppia (4x). Pesäke määritellään siten, että se muodostuu 50 tai suuremmasta määrästä soluja. Yksittäiset

pesäkkeet voidaan uuttaa, laittaa mikroskooppilevyille, kiinnittää ja värjätä Wright/Geims-menetelmällä (kts. Todd-Sanford, Clinical Diagnosis By Laboratory Methods, 15. painos, Davidsohn ja Henry (toim.) 137 /1974/). Sen jälkeen suoritetaan läsnäolevien solutyypin morfologinen analyysi yhtä pesäkettä kohti.

BFU-E (Burst Forming Unit - Erythroid tai CFU-E)

Edellä oleva menetelmä kelpaa seuraavin modifikaatioin. Joko hetkellä, jolloin maljataan metyyliiselluloosaan, tai 3 päivää myöhemmin lisätään levyä kohti 0,5-1 yksikön konsentraatiossa lampaan erytropoietiiniä (vaihe III, Connaught Medical Research Laboratories, Philadelphia, PA). Eytroidia sisältävät pesäkkeet (BFU-E tai CFU-E) lasketaan 10-14 päivän kuluttua (maljaushetkestä) pesäkkeinä, jotka sisältävät visuaalisesti luettavia elementtejä. Yksittäiset pesäkkeet uutetaan ja värjätään edellä kuvatulla tavalla morfologista analyysiä varten.

CFU-s (Colony Forming Unit - spleen)

Luuydin uutetaan C57B1/6 hiirten reisiluusta. Solut pestään kaksi kertaa DME-alustalla (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GIBCO) ja joko injisoidaan välittömästi kuolettavasti säteilytettyjen (1000 rad) C57B1/6 hiirten häntälaskimoon tai käsitellään edelleen. Käsitely muodostuu seuraavista eri menettelyistä: 1) solut lyysataan anti- θ :lla ja komplementilla, minkä jälkeen joko välittömästi injisoidaan eläimiin tai viljellään eri aikoja erilaisissa olosuhteissa ennen injisointia; 2) vaihtoehtoisesti ei suoriteta mitään antiseeromilyysausta, vaan soluja viljellään välittömästi erilaisissa olosuhteissa. Viljelyolosuhteet voivat olla seuraavat: soluja suspendoidaan uudelleen 1×10^6 solua/ml alustaan, jonka koostumus on: DME (GIBCO) + 2-ME (5×10^{-5} M), MEM-vitamiinit (1:100) (GIBCO), ei-välttämättömät aminohapot (1:100) (GIBCO), L-glutamiini (1:100) (GIBCO), penisil-

liini/streptomysiini (1:100) (GIBCO), arginiinin, asparagiinin ja foolihapon seos, 15% FCS (GIBCO), 2mM natriumpyruvaatti + eri tekijät, joilla CFU-s-solujen säilyminen testataan (loppukonsentraatio 25%). Iämä solupreparaatti maljataan sen jälkeen 24-kaivoisille kudosisviljelmälevyille (Falcon) 1 ml/kaivo ja inkuboidaan eri aikoja (vähintään 7 päivää) 37⁰C/10% CO₂-inkubaattorissa. Kiinnittymättömät solut poistetaan joka 3.-4. päivä, sentrifugoidaan pohjalle, suspendoidaan uudelleen uuteen alustaan, joka sisältää kyseeseen tulevan tekijän, ja maljataan uudelleen. Määrittäviä varten, joissa inkubointi kestää yli 7 päivää, solut siirretään suurempiin muovisiin soluviljelmäastioihin, jotta kaikkien kiinnittämättömien solujen konsentraatio pysyisi alle 5×10^5 solua/ml. Inkuboinnin loputtua solut pestään kaksi kertaa ja suspendoidaan uudelleen DME-alustaan (ilman täydentäviä aineita) ja injisoidaan kuolettavasti säteilytettyjen C57Bl/6 hiirten häntälaskimoon. Solut injisoidaan käyttämällä joko tietty määrä eläviä soluja tai tietty tilavuusjake viljelmästä. 9 - 12 päivää injisoinnin jälkeen pernat poistetaan ja laitetaan Borin'in kiinnittimeen (Mallinkrodt, St. Louis, MO). Pernapesäkkeistä lasketaan pernan pinnalla olevien näkyvien nodulien määrä leikkausmikroskoopin (4x) avulla.

Humaanin multi-CSF:n ja MCGF cDNA:n eristäminen

Jyrsijägeenien DNA-klooneja on käytetty identifioimaan ja eristämään DNA:ta, joka koodaa homologisia ihmisgeenejä. Koska ihmisen ja jyrsijän geenien välinen homologia on suhteellisen vähäinen, hybridisointiolosuhteita on lievennettävä niin, että voidaan tehdä ristihybridisointi sekvenssien välillä, jotka ovat vain 75-80-prosenttisesti homologisia. Tämän tavoitteen saavuttamiseksi on käytetty useita erilaisia koeohjeita. Esimerkiksi ihmisen C^k-immunoglobuliinin kevyen ketjun geeni on eristetty käyttämällä koettimena vastaavaa hiiren C^k-geeniä (Heiter, P. et al.,

Cell 22: 197-207 /1981/) ja hiiren transplantaatioanti-geenigeenit on eristetty hybridisoimalla DNA-klooneihin, jotka koodaavat humaanivastineitaan (Steinnetz, T. et al., Cell 24: 125-134 /1981/).

Eräissä suositellussa menetelmässä maljataan humaani-genomi-DNA-kirjastosta (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. /1982/) saatuja γ -faagiklooneja 2×10^4 - 5×10^4 plakkia 150 mm maljaa kohti sopivaan isäntäkantaan, kuten E.coli LL392 bakteereihin. Yleensä riittää 10 - 20 maljaa.

Maljoja inkuboidaan 10 - 12 tuntia 37°C :ssa, minkä jälkeen niitä pidetään jääkaapissa kaksi tuntia ja sen jälkeen jokaisen maljan agar-pinnalle laitetaan 132 mm nitro-selluloosasuodatin. Suodattimen annetaan pysyä kosketuksessa maljan kanssa vähintään 5 minuuttia, jona aikana suodattimet merkitään maljoihin puhkaisemalla värillä täytetyllä numero 22 neulalla. Sen jälkeen suodattimet irroitetaan maljoilta ja niillä inkuboidaan peräkkäin vähintään 2 minuuttia ensin 250 ml seosta, jonka koostumus on 0,1 N NaOH, 0,5 M NaCl; ja sen jälkeen 250 ml:ssa seosta, jonka koostumus on 0,5 M Tris.HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl. Suodattimet kuivataan paperi-pyyhkeillä ja sen jälkeen niitä paistetaan 4 - 8 tuntia 80°C :ssa.

Hybridisointia varten suodattimet kostutetaan 1x SET-liuoksella (0,15 M NaCl, 30 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM Na_2EDTA) ja tämän jälkeen inkuboidaan 2 tuntia 65°C :ssa (1,5-2 ml/suodatin) koko ajan sekoittaen liuoksessa, jonka koostumus on 3x SET, 5x Denhardt'in liuos (Denhardt, D.T., B.B.R.C. 23: 641-646 /1966/), 10% dekstraanisulfaatti, 0,1% natrium-dodekyylisulfaatti (SDS), 50 $\mu\text{g/ml}$ poly (rA), 50 $\mu\text{g/ml}$ poly (rC) ja 50 $\mu\text{g/ml}$ poly (rG). Sen jälkeen tämä liuos heitetään pois ja suodattimia hybridisoidaan 1 tunti 65°C :ssa käyttämällä 0,5 μg ($\sim 10^8$ cpm) nick-transloitua hiiren

DNA-koetinta samassa liuoksessa (uusi) (1,5-2 ml/suodatin) ja tämän jälkeen 12-20 tuntia 55°C:ssa. Suodattimet pestään sen jälkeen peräkkäin yhden tunnin ajan 55°C:ssa lievästi sekoittaen seuraavissa liuoksissa: 3x SET, 1x Denhardt'in liuos; 0,1% SDS; ja 1x SET, 0,1% SDS (10-15 ml/suodatin). Suodattimet kuivataan paperipyyhkeillä ja sen jälkeen autoradiografoidaan 12-24 tuntia käyttämällä sopivaa vahvistavaa varjostinta. Hybridisointiplakit poimitaan sen jälkeen agar-levyiltä steriileillä pasteur-pipeteillä ja jokainen laitetaan 1 ml:aan seosta, jonka koostumus on: 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris.HCl pH 7,5, 10 mm MgCl₂, 100 ug/ml gelatiini, ja lisätään 50 ul kloroformia. Sen jälkeen, kun on pidetty vähintään 4-8 tuntia kylmässä, seulotaan faagit jokaisesta plakista uudelleen alhaisella tiheydellä (2000-4000 plakkia/150 mm malja) edellä kuvatun menetelmän kanssa identtisellä menetelmällä.

Positiivisesti hybridisoituneita faagiklooneja, kun tämä on ensin vahvistettu seulomalla uudelleen, voidaan sen jälkeen käyttää humaani-cDNA-kirjastosta saatujen satunnaispesäkkeiden seulontakoettimena samalla tavoin kuin edellä on kuvattu hiirisysteemin yhteydessä. Humaani-cDNA-kirjasto tulisi valmistaa käyttämällä sopivasta solulähteestä, kuten periferiaveren T-lymfosyyteistä saatua RNA:ta (kts. Gray, P. et al., Nature 295: 503-508 /1972/). Täyspitkät cDNA-kloonit voidaan sen jälkeen identifioida ekspressoimalla Cos-7 soluissa, mikä jälleen tehdään samalla tavoin kuin hiiren cDNA-kloonien yhteydessä. Eristetyt ihmisen multi-CSF cDNA-kloonit pystyvät ekspressoimaan tekijän, joka kykenee stimuloimaan ihmisen luuydinsoluja.

Ekspressio E.coli:ssa, hiivassa ja soluviljelmässä

Prokaryootit, kuten E.coli, sopivat erittäin hyvin esillä olevan keksinnön mukaisten polypeptidien ekspressoimiseen (kts. esimerkiksi US-patentit 4,338,397 ja 4,411,994) edellyttäen, että glykolysaatiota ei haluta. Korkeiden

ekspressiotasojen saavuttamiseksi tulisi käyttää promootoreita, kuten β -laktamaasi (penisillinaasi) ja laktoosipromoottorisysteemeitä (Chang et al., *Nature*, 275: 615 /1978/; Itakura et al., *Science*, 198: 1056 /1977/; Goddel et al., *Nature* 281: 544 /1979/ tai tryptofaani (trp)-promoottorisysteemiä (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 /1980/). Nämä ovat kaikkein yleisimmin käytettyjä promootoreita, mutta saatavissa on myös muita mikrobi-promootoreita.

Alan ammattimiehet tietävät, että proteiinin tuottamisessa voidaan käyttää myös prokaryoottien lisäksi eukaryoottisia mikrobeja, kuten hiivaa. Parhaana pidetty eukaryoottinen mikro-organismi on Saccharomyces cerevisiae. Sopiviin promoottorisekvensseihin hiivavektoreissa kuuluvat 3-fosfoglyseraattikinaasin promoottorit (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 /1980/) tai muiden glykolyyttisen entsyymien promoottorit (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 /1968/; Holland et al., *Biochemistry*, 17: 4900 /1978/). Voidaan käyttää myös muita promootoreita, joiden lisäetuna on, että kasvuolosuhteet kontrolloivat transkriptiota. Periaatteessa sopiva on mikä tahansa plasmidivektori, joka sisältää hiivan kanssa yhteensopivan promoottorin, replikaation alkukohdan ja terminaatiosekvenssit.

Mikro-organismien lisäksi isäntinä voidaan käyttää myös soluviljelmiä, jotka on saatu monisoluisista organismeista (erityisesti nisäkässoluista). Esimerkkejä tällaisista hyödyllisistä isäntäsolulinjoista ovat HeLa-solut, kiinalaisen hamsterin munasarjan solulinjat ja nuoren hamsterin munuais-solulinjat. Tällaisten solujen ekspressiovektorit sisältävät tavallisesti tarvittaessa replikaation alkukohdan, ekspressoitavan geenin edellä sijaitsevan promoottorin sekä mahdollisesti tarvittavat ribosomin sitoutumiskohdat, RNA:n katkaisukohdat, polyadelydointikohdat ja transkriptionaaliset terminaattorisekvenssit. Nisäkässoluissa käytettynä ekspressiovektorissa on usein virusaineen antamia kontrolli-

funktioita. Yleisesti käytetyt promoottorit ovat esimerkiksi peräisin polyoma, Adenovirus 2 ja kaikkein useimmiten SV-40 viruksista. (kts. yleisesti U.S.P. 4,399,216, WO 81/02425 ja WO 83/03259).

Esillä olevan keksinnön mukaisten cDNA-kloonien ekspressoimiseksi E.coli bakteerissa fuusioidaan sopivat promoottorit (esim. trp, lac, tac, YpL, jne.) ja Shine-Dalgarno'n sekvenssit niiden plasmidien koko koodaussekvenssin kanssa, joissa on ATG-kodoni parhaiten signaalipeptidin katkaisukohtaan edessä. Tarkemmin sanoen MCGF:n tai multi-CSF:n cDNA-klooni, esimerkiksi pcD-MCGF, digestoidaan ensin PstI ja XhoI endonukleasilla ja noin 1 kb segmentti, jossa on koko proteiinia koodaava sekvenssi, alikloonataan sopiviin E.coli ekspresiovektoreihin proteiini- ja signaalisekvenssin ekspressoimiseksi. Vaihtoehtoisesti voidaan vain valmiin proteiinin ekspressoimiseksi segmentti alikloonata M13mp8 PstI- ja Sall-endonukleasikohtiin. Yksisäikeinen M13mp8 DNA, joka sisältää proteiinia koodaavan sekvenssin komplementtisäikeen, yhdistetään synteettisen oligonukleotidin kanssa ja sen jälkeen syntetisoidaan Klenow'in fragmentin avulla kaksisäikeinen proteiinia koodaava sekvenssi. Digestoidaan Neol-endonukleasilla ja käsitellään S1-nukleasilla, minkä jälkeen tasapäinen DNA-segmentti, joka sisältää kaksisäikeisen MCGF:a koodaavan sekvenssin tai multi-CSF:a koodaavan sekvenssin, insertoidaan sopivaan ekspresiovektoriin, kuten pDR540-vektoriin, jossa on tac-promoottori (kts. Russel, D.R. ja Bennett, G.N., Gen 20, 231-243 /1982/); ja deBoer, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 21-25 /1983/). (Kts. yleisesti Messing, J. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A, 74, 3642-3646 /1977/); Gronenborn, B. ja Messing, J., Nature 272: 375 /1978/; Messing, J. et al., Nucl. Acid Res. 9, 309 /1981/; ja Messing, J. ja Vieira, J., Gene 19, 269-276 /1982/).

MCGF- tai multi-CSF cDNA-kloonin ekspressoimiseksi hiivassa eristetään pcD-MCGF plasmidista PstI-XhoI-fragmentti,

jossa cDNA-insertti, ja kloonataan tämän jälkeen pUC8 PstI-SalI-kohtiin. Saatu plasmidi B8/pUC8 katkaistaan PstI:llä ja digestoidaan Bal31:llä, mikä poistaa cDNA:n vastapuolella olevan oligo (dG:dC) kappaleen. XhoI-linkkeri kiinnitetään Val31-digestoituun DNA:an ja plasmidit otetaan E.coli'in. Deletion koko määritetään analysoimalla transformantit. XhoI-EcoRI-fragmentti (jossa on MCGF tai multi-CSF cDNA) eristetään sen jälkeen yhdestä deletiojohdoksesta, jossa tulisi olla noin 20 emäsparin deletio, ja kloonataan pAAH5:n HindIII-kohtaan ja pAAR6:n EcoRI-kohtaan käyttämällä Klenow'in fragmenttia ja tasapää-ligaatiota. (puC8 on M13mp7-peräinen systeemi, joka on hyödyllinen insertiometriagenoinnissa ja sekvenssoitaessa synteettisten yleisprimereiden kanssa: Kts. Vieira, J. ja Messing, J., Gene 19: 259-268 /1982/); pcD-X:n suhteen, kts. Okayama, H. ja Berg, P., Mol. Cell. Biol. 3: 280-289 /1983/); pAAH5 ja pAAR6 ovat hiivan ekspressiovektoreita, joissa on ADCI-promoottori ja -terminaattori: Ammer, G., "Expression of Genes in Yeast using the ADCI promoter", Methods in Enzymology, 101: 192-210 /1982/).

Puhdistaminen ja formulaatiot

Multi-CSF- ja MCGF-polypeptidit, jotka ekspressoitu E.coli:ssa, hiivassa tai muissa soluissa, voidaan puhdistaa alan standardimenetelmillä, mukaanlukien saostamalla ammoniumsulfaatilla, fraktioimalla pylväskromatograafisesti (esimerkiksi ioninvaihto, geelisuodatus, elektroforeesi, affiniteettikromatografia jne.) ja lopuksi kiteyttämällä (kts. yleisesti "Enzyme purification and Related Techniques", Methods in Enzymology, 22: 233-577 /1977/). Keksinnön mukaisia polypeptidejä, jotka ensin on puhdistettu joko osittain tai homogeenisuuteen asti, voidaan käyttää farmaseuttisissa seoksissa (kts. jäljempänä), esimerkiksi ruoansulatuskanavan parasiitti-infektioiden hoitamiseen tai tutkimustarkoituksiin, esimerkiksi hematopoeettisten alustojen tai syöttösolualustojen supplementtina ja antigeenisena

aineena, valmistettaessa spesifisiä immunoglobuliineja, jotka ovat hyödyllisiä immunomäärityksissä, immuno-fluoresenssivärjäyksissä jne. (kts. yleisesti "Immunological Methods", Vols. I & II, toim. Lefkovits, I. ja Pernis, B., Academic Press, New York, N.Y. /1979 & 1981/; ja "Handbook of Experimental Immunology", toim. Weir, D., Blackwell Scientific Publications, St. Louis, MO /1978/).

Farmaseuttisten seosten valmistamiseksi, jotka sisältävät tämän keksinnön kuvaamia polypeptidejä, nämä polypeptidit seostetaan sekoittamalla ne parhaiten inerttien, farmaseuttisesti hyväksyttävien kantajien kanssa. Sopivat kantajat ja niiden valmistusmenetelmät ovat alalla yleisesti tunnettuja (kts. esim. Remington's Pharmaceutical Sciences ja U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA /1980/). Parenteraalista antamista pidetään parhaimpana. Tässä antamistavassa voidaan käyttää myös mekaanisia antamisjärjestelmiä.

Farmaseuttinen seos on parhaiten yksikköannostusmuodossa. Tällaisessa muodossa valmiste on jaettu yksikköannoksiin, jotka sisältävät sopivat määrät aktiivista komponenttia. Aktiivisen yhdisteen määrä valmisteen yksikköannoksessa voi vaihdella tai se voi olla säädetty välille 1 μ g - 100 mg riippuen kulloinkin käytetystä applikoitavasta ja aktiivisen ainesosan tehosta. Seos voi haluttaessa sisältää myös muita terapeuttisia aineita.

Annostukset voivat vaihdella riippuen potilaan tarpeista, hoidettavan tilan vakavuudesta ja kulloinkin käytetystä yhdisteestä. Oikean annostuksen määrittäminen kulloinkin kyseessä olevaan tilanteeseen on alalla tunnettua. Yleisesti sanoen hoito aloitetaan käyttämällä pienempiä annostuksia, jotka ovat pienempiä kuin yhdisteen optimaalinen annos. Sen jälkeen annostusta lisätään pienin lisäyksin, kunnes saavutetaan optimaalinen vaikutus näissä olosuhteissa. Käytön helppouden vuoksi voidaan päivittäinen kokonaisannostus

haluttaessa jakaa ja antaa annoksittain päivän aikana.

Seuraavat kokeita koskeva informaatio ja koetulokset on annettu esimerkkimäisesti ilman rajoittavaa tarkoitusta.

KOKEELLINEN OSA

A. Kloonatut indusori-T-solut

1) T-solujen (Cl.Ly 1⁺2⁻/9 (ATCC numero CRL 8179) kloonია, jonka fenotyyppi on Thy 1⁺ Ly 12⁻, pidetään jatkuvasti $0,5 \times 10^5$ solua/ml konsentraatiossa DME-alustalla (Dulbecco's Modified Eagle's medium), jossa on 10 % lämmön avulla inaktivoitua vasikansikiöseerumia, 5×10^{-5} M 2-ME, 2mM glutamiinia, ei-välttämättömiä aminohappoja ja välttämättömiä vitamiineja, ja joka on käsitelty 25 %:lla supernatantteja, jotka on saatu hiiren ConA-aktivoiduista Balb/c pernasoluista.

2) Cl.Ly 1⁺2⁻/9 solujen ConA-aktiivointi: Soluja viljellään 5×10^5 /ml konsentraatiossa DME alustalla, jossa on 4 % lämmön avulla inaktivoitua vasikansikiöseerumia, 5×10^{-5} M 2-ME, 2 mM glutamiinia, ei-välttämättömiä aminohappoja, välttämättömiä vitamiineja ja 2 ug/ml ConA. Sen jälkeen, kun on inkuboitu 12-14 tuntia 37°C:ssa 10-prosenttisessä hiilidioksidissa, solususpensio sentrifugoidaan 10 minuutin ajan nopeudella 1500 rpm. Solupelletit otetaan talteen ja jäädytetään välittömästi -70°C:ssa. Supernatantit suodatetaan (Nalgene-0,22 mikronia) ja säilytetään -20°C:ssa kasvutekijöiden lähteenä. Supernatanttien tasaosista määritetään MCGF-aktiivisuus (kts. jäljempänä) ja vahvistetaan näin linjan indusoituminen ConA-käsittelyn avulla.

B. Kloonatut syöttösolut

1) Syöttösolulinja (MC/9) (ATCC numero CRL 8306) kloonattiin rajalaimentamalla 13 päivän ikäisen hiirensikiön maksasta

DME-alustalla, joka sisälsi 4 % lämmön avulla inaktivoitua vasikansikiöseerumia (FCS), 5×10^5 M merkaptoetanolia ja 2 mM glutamiinia ja joka oli käsitelty ConA-aktivoidulla Balb/c-pernasoluilla (Nabel et al., Nature 291: 332-334 /1981/). Solukloonilla on pintamembraanin glykoproteiinien suhteen Thy 1^- , Ly 1^- , 2^- , Ly 5^+ fenotyyppi.

2) Syöttösolujen klooni pidetään jatkuvasti yllä 16-18 tunnin kahdentumisajoilla DME-alustalla, jossa on 10 % lämmön avulla inaktivoitua vasikansikiöseerumia, 5×10^{-5} M 2-merkaptoetanolia ja 2 mM glutamiinia, ei-välttämättömiä aminohappoja ja välttämättömiä vitamiineja ja joka on täydennetty 5 %:lla supernatanttia, joka on saatu ConA-aktivoidusta indusori-T-solukloonista (kts. edellä). Syöttösolukloonin kasvu riippuu aktiivisesta kasvutekijästä (tekijöistä), joka on saatu stimuloitujen Cl.Ly $1^+2^-/9$ solujen supernatantista.

C. MCGF-aktiivisuuden biologiset määritykset

1. Määritys liittämällä tritioitua tymidiiniä.

a) 1×10^4 MC/9 solua viljeltiin tasapohjaisilla mikro-tiitterilevyillä 0,1 ml:ssa DME-alustaa, joka sisälsi 4 % lämmön avulla inaktivoitua vasikansikiöseerumia, 5×10^5 M 2-merkaptoetanolia, 2 mM glutamiinia, ei-välttämättömiä aminohappoja, välttämättömiä vitamiineja ja kaksinkertaistuvat laimennukset testattavaa supernatanttia.

b) Levyt inkuboitiin 37°C :ssa 10-prosenttisessä hiilidioksidissa. 20 tunnin kuluttua jokaiseen viljelmään isätettiin $0,5 \mu\text{Ci}$ ^3H -tymidiiniä (New England Nuclear, Boston, Mass.). Neljän tunnin kuluttua solut kerättiin suodatinpaperiliuskojen päälle käyttämällä automaattista solujen keräysyksikköä. Kuivatut näytteet dispendoitiin tuikeskintillaationesteeseen ja cpm-arvot laskettiin normaalilla β -laskurilla.

2. Kolorimetrinen tetratsoliumsuola-määritys (MTT).

a) 1×10^4 MC/9 solua viljeltiin tasapohjaisilla mikrotiiterilevyillä 0,1 ml:ssa DME-alustaa, jota oli täydennetty ko-tekijöillä ja testattavalla supernatantilla, kuten on kuvattu kohdassa 1) a).

b) Levyjä inkuboitiin 37°C :ssa 10-prosenttisessa CO_2 :ssa. 20 tunnin kuluttua jokaiseen viljelmään lisättiin 0,01 ml 5 mg/ml liuosta, joka sisälsi 5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimetyylitiazol-2-yyli)-2,5-difenyyli-tetrasoliumbromidi, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS). Neljän tunnin kuluttua jokaiseen viljelmään lisättiin 0,1 ml 0,04 N suolahappoa isopropanolissa ja sekoitettiin hyvin. Muutaman minuutin kuluttua levyt luettiin Dynatech MR580 Microelisa Auto Reader lukulaitteella (Dynatech Instruments, Inc., Torrance, CA) aallonpituudella 570 nm (referenssiaallonpituus 630 nm) ja kalibrointiasteuksella 1,99.

D. mRNA:n eristäminen Cl.Ly $1^{+}2^{-}/9$ soluista.

1. Solun kokonais-RNA eristettiin soluista käyttämällä Chirgwin'in et al., (Biochemistry, 18: 5294-5299 /1979/) guanidiini-isotiosyanaatti-menetelmää.

Indusoimattomista tai ConA-indusoiduista Cl.Ly $1^{+}2^{-}/9$ soluista saadut pakastetut solupelletit suspendoitiin guanidiini-isotiosyanaatti-lyysausliuokseen. $1-2 \times 10^8$ solua kohti käytettiin 20 ml lyysausliuosta. Pelletit suspendoitiin uudelleen pipetoimalla, minkä jälkeen DNA leikkauskäsiteltiin johtamalla neljä kertaa ruiskun läpi käyttämällä neulaa, jonka koko oli 16 gaugea. Lysaatti kerrostettiin 40 ml polyallomeerisentrifugiputkeen 20 ml päälle 5,7 M CsCl, 10 mM EDTA-seosta. Tätä liuosta sentrifugoitiin 25.000 kierr./min. Beckman SW28 roottorissa (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) 40 tunnin ajan

15°C:ssa. DNA:ta sisältävä guanidiini-isotiosyanaattifaasi pipetoitiin yläosasta alas välipintaan. Putken seinämät ja välipinta pestiin 2-3 ml:lla guanidiini-isotiosyanaattilyysausliuosta. Putki katkaistiin saksilla välipinnan alapuolelta ja CsCl-liuos dekantoiitiin. RNA-pelletit pestiin kaksi kertaa kylmällä 70-prosenttisella etanolilla. Sen jälkeen pelletit suspendoitiin uudelleen 500 ul:aan puskuria (10 mM Tris.HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,05 % SDS). Lisättiin 50 ul 3M natriumasettaattia ja RNA saostettiin 1 ml:lla etanolia. RNA otettiin talteen sentrifugoimalla ja pelletit pestiin kerran kylmällä etanolilla.

2) Poly A⁺ mRNA:n eristäminen:

Pesty ja kuivattu kokonais-RNA-pelletti suspendoitiin uudelleen 900 ul:aan oligo (dT)-eluointipuskuria (10 mM Tris.HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5% SDS). RNA:ta kuumennettiin 3 minuuttia 68°C:ssa ja jäädytettiin sen jälkeen jäällä. Lisättiin 100 ul 5 M natriumkloridia. RNA-näyte vietiin 1,0 ml:n oligo (dT)-selluloosapylvääseen (tyyppi 3, Collaborative Research, Waltham, MA), joka oli tasapainoitettu sidepuskurilla (10 mM Tris.HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 0,5% SDS). Pylvään läpivirta johdettiin pylvään läpi vielä kaksi kertaa. Sen jälkeen pylväs pestiin 20 ml:lla sidepuskuria. Poly A⁺ mRNA otettiin talteen pesemällä eluointipuskurilla. RNA eluoiutui tavallisesti ensimmäisessä 2 ml:ssa eluointipuskuria. RNA saostettiin 0,1 tilavuudella 3 M natriumasettaattia (pH 6) ja kahdella tilavuudella etanolia. RNA-pelletti otettiin talteen sentrifugoimalla, pestiin kaksi kertaa kylmällä etanolilla ja kuivattiin. Sen jälkeen pelletti suspendoitiin uudelleen veteen. Tasaosat laimennettiin ja määritettiin absorbanssiaallonpituudella 260 nm.

E. Poly A⁺ mRNA:n fraktiointi sakkaroosigradientsentrifugoinnin avulla:

100 μ l liuosta, joka sisälsi 100 μ g kohdasta D. 2) saatua poly A⁺ mRNA:ta, kuumennettiin 1 minuutti 65^oC:ssa ja sen jälkeen kerrostettiin 10 ml päälle 5-25 % sakka-roosigradianttia (10 mM Tris.HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, ja 1 mM EDTA). Gradientti sentrifugoitiin Beckman SW41 roottorissa 26.000 kierr./min. 19 tuntia 5^oC:ssa. Rakeita otettiin talteen 450 μ l, saostettiin 2 tilavuudella etanolia ja suspendoitiin uudelleen injisointia varten oosyytteihin (kts. jäljempänä). Rinnakkainen gradientti kerrostettiin edellä kuvatulla tavalla sentrifugoidulla radio-leimatun (³H-uridiinin) ja ribosomaalisen RNA:n (BRL, Bethesda, MA) seoksella ja tuikelaskimessa laskettiin 450 μ l jakeet.

Xenopus oosyytteihin injisoinnin jälkeen saatiin koon perusteella fraktioidusta poly A⁺ mRNA:sta MCGF-aktiivisuuspiikki, joka kolorimetrinen määrittäminen perusteella sedimentoitui nitaammin kuin 18S, kuten on esitetty kuviossa 2. Nämä jakeet olivat rikastuneet noin 10-kertaisesti MCGF-mRNA:n suhteen ja niitä käytettiin myöhemmin ³²P-leimatun cDNA-koettimen valmistamiseen.

F. Oosyyttien injisointi

Oosyytit poistettiin naaraspuolisista Xenopus laevis:sta ja inkuboitiin Barth'in liuoksessa (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,41 mM CaCl₂, 0,82 mM MgSO₄, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES (pH 7,9) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Valmistettiin 2-3 oosyytin injektiorypäleet. RNA-näytteet injisoitiin liuotettuna injisointipuskuriin (40 mM Tris.HCl pH 7,4, 0,35 M NaCl). Totaali poly A⁺ mRNA suspendoitiin uudelleen injisointipuskuriin 500 μ g/ml konsentraatiossa, kun taas RNA-näytteet, jotka oli eluoitu hybridiselektioista (kts. jäljempänä) saaduista DNA-suodattimista, ja jotka aina sisälsivät kantaja 5 ug vasikanmaksan tRNA:ta, suspendoitiin uudelleen 2 μ l:aan injisointipuskuria. Jokaiseen oosyyttiin injisoitiin 40 nl määrät käyttämällä käsin vedettyjä mikropipettejä,

joiden kärjet oli vedetty mikrovetolaitteen avulla. Pipetit kalibroitiin tunnetuilla tilavuuksilla steriiliä vettä. Jokaista mRNA-näytettä kohti injisoitiin noin 30-40 oosyyttiä. Injisoituja oosyyttejä inkuboitiin kahden tai kolmen ryhmässä 96-kaivoisten mikrotiitterimaljojen yksittäisissä kaivoissa, jotka sisälsivät oosyyttiä kohti 10 μ l Barth'in liuosta + 1% naudanseerumialbumia. Oosyyttejä pidettiin 48 tuntia 19°C:ssa ja sen jälkeen otettiin talteen ja yhdistettiin supernatantit eläviä oosyyttejä sisältävistä kaivoista. Nämä supernatantit steriloidtiin sentrifugoimalla 10 minuuttia mikrosentrifuugissa ja sen jälkeen niistä määritettiin edellä kuvatulla tavalla MCGF-aktiivisuus. Vertailuna otettiin aina talteen supernatantit injisoi-mattomista oosyyteistä.

Taulukossa I on esitetty määrittämistulokset käsittelemättömistä tai ConA-stimuloituista Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluista talteenotetuista supernatanteista. Kaikkien näytteiden, mukaanlukien vertailustandardi, titraus suoritettiin kolmena rinnakkaisena. Yksi MCGF-yksikkö on se tekijämäärä, jolla päästään 15 %:iin siitä ³H-tymidiinin maksimaalisesta liittymismäärästä, joka saadaan käyttämällä Cl.Ly 1⁺2⁻/9 supernatanttia.

TAULUKKO I

Cl.Ly 1⁺2⁻/9-tuottama MCGF-aktiivisuus (yksikköä/ml)

	<u>Solu supernatantti</u>	<u>Injisoitu mRNA</u>
ilman ConA	50	40
ConA:n kanssa	26.383	1.403

G. cDNA-kirjaston muodostaminen:

1) Vektoriprimeerin ja oligo dG-häntäisten linkkeri-DNA-lajien valmistaminen:

Okayama & Berg'in (Mol. & Cell. Biol. 2: 161-170 /1982/)

menetelmää käytettiin vain vähäisin muutoksin ja sovitettuna Okayama & Berg'in /Mol. & Cell. Biol. 3: 380-389 (1983/ kuvaamiin pcDV1- ja pL1-plasmideihin.

80 ug näyte pcDV1 DNA:ta digestoitiin 30°C:ssa 20 yksikön kanssa KpnI endonukleaasia 450 µl:ssa, jonka koostumus oli: 6 mM Tris.HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 6 mM NaCl, 6 mM 2-ME ja 0,1 mg BSA (naudanseerumialbumiini) ml:ssa. 16 tunnin kuluttua digestointi päätettiin 40 ul:lla 0,25 M EDTA:ta (pH 8,0) ja 20 ul:lla 10% natriumdodekyylisulfaattia (SDS); DNA otettiin talteen sen jälkeen, kun ensin oli uutettu vedellä kyllästetyllä (1:1) fenoli-CHCl₃:lla (jäljempänä kutsutaan fenoli-CHCl₃:ksi) ja saostettu etanolilla. Homopolymeerihännät, joissa oli keskimäärin 60 mutta enintään 80 deoksitymidylaatti (dT) tähdettä päätä kohti, lisättiin seuraavalla tavalla: Vasikan kateenkorvan avulla terminaalisen transferaasin avulla KpnI endonukleaasilla muodostettuihin päihin: Reaktioseoksen (38 µl) koostumus oli: natriumkakydylaatti-30 mM Tris.HCl pH 6,8 (puskuri), sekä 1 mM COCl₂, 0,1 mM ditiotreitolili, 0,25 mM dTTP, KpnI endonukleaasilla digestoitu DNA, ja 68 U terminaalinen deoksinukleotidyylitransferaasi (P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee, WI). Sen jälkeen, kun oli pidetty 30 minuuttia 37°C:ssa, pysäytettiin reaktio 20 ul:lla 0,25 M EDTA:ta (pH 8,0) ja 10 µl:lla 10-prosentista natriumdodekyylisulfaattia ja useiden fenoli-CHCl₃-uuttojen jälkeen DNA otettiin talteen saostamalla etanolilla. Sen jälkeen DNA:ta digestoitiin 5 tuntia 37°C:ssa 15 yksiköllä EcoRI endonukleaasia 50 µl:ssa seosta, jonka koostumus oli: 10 mM Tris.HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitolili ja 0,1 mg BSA ml:ssa. Suuri fragmentti, joka sisälsi SV40 polyadenylaatiokohdan ja replikaation pBR322 alkukohdan ja ampicilliiniresistanssin geenin, puhdistettiin agarosigeelielektroforcesilla (1%) ja otettiin geelistä talteen lasijauhemenetelmän (Vogelstein, B. & Gillespie, D., Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 615-619

/1979/) muunnelman avulla. dI-häntäinen DNA puhdistettiin edelleen absorboimalla ja eluoimalla oligo (dA)-selluloosa-pylväästä seuraavasti: DNA liuotettiin 1 ml:aan 10 mM Tris.HCl pH 7,3 puskuria, joka sisälsi 1 mM EDTA ja 1 M NaCl, ja joka oli jäädytetty 0°C:een, ja vietiin saman puskurin kanssa 0°C:ssa tasapainoitettuun oligo (dA)-selluloosapylvääseen (0,6 x 2,5 cm). Pylväs pestiin samalla puskurilla 0°C:ssa ja eluoitiin vedellä huoneen lämpötilassa. Eluoitunut DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 1 mM EDTA:n avulla 10 mM Tris.HCl pH 7,3 puskuriin.

Oligo (dG)-häntäinen linkkeri-DNA valmistettiin digestoimalla 75 µg pL1 DNA:ta 20 yksiköllä PstI endonukleaasia 450 ul:ssa seosta, jonka koostumus ml kohti oli: 6 mM Tris.HCl pH 7,4, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-ME, 50 mM NaCl ja 0,01 mg BSA. Reaktioseosta pidettiin 16 tuntia 30°C:ssa, minkä jälkeen se uutettiin fenoli-CHCl₃:lla ja DNA saostettiin alkoholilla. Häntiin, joissa oli 10 - 15 deoksiguanylaatti (dG)-tähdettä, lisättiin sen jälkeen päätä kohti 46 yksikköä terminaalista deoksinukleotidyylitransferaasia samassa edellä kuvatussa reaktioseoksessa (38 µl), jossa kuitenkin dTTP oli korvattu 0,1 mM dGTP:llä. Seos pidettiin 20 minuuttia 37°C:ssa, minkä jälkeen se uutettiin fenoli-CHCl₃:lla, DNA saostettiin etanolilla ja sen jälkeen digestoitiin 4 tuntia 37°C:ssa 35 yksiköllä HindIII endonukleaasia 50 ul:ssa, jonka koostumus oli: 20 mM Tris.HCl pH 7,4, 7 mM MgCl₂, 60 mM NaCl ja 0,1 mg BSA. Pieni oligo (dG)-häntäinen linkkeri-DNA puhdistettiin agarosigeeli-elektroforeesin (1,8%) avulla ja otettiin talteen edellä kuvatulla tavalla.

2) cDNA-kirjaston valmistaminen:

Vaihe 1. cDNA-synteesi.

Reaktioseoksen (10 µl) koostumus oli: 50 mM Tris.HCl pH 8,3, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 0,3 mM ditiotreitoli,

2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP ja 2 mM dCTP, 20 uCi ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol), 2 ug poly A⁺ RNA Con-A indusoiduissa Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluissa, 60 U RNAasi (Biotec, Inc., Madison, WI), ja 2 ug vektori-primeeri DNA (15 pmol primeeripäätä) ja 45 U käänteistranskriptaasi. Reaktioseosta inkuboitiin 60 minuuttia 42°C:ssa ja sen jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 1 ul 0,25 M EDTA (pH 8,0) ja 0,5 µl 10% SDS; lisättiin 40 ul fenoli-CHCl₃ ja liuos sekoitettiin voimakkaasti Vortex-sekoittimessa ja sen jälkeen sentrifugoitiin. Vesifaasiin lisättiin 40 µl 4 M ammoniumasetaattia ja 160 ul etanolia, minkä jälkeen liuosta jäähdytettiin 15 minuuttia kuivajään avulla, jäähdyttämisen jälkeen saostuneet reagoimattomat deoksinukleosiditriposfaatit liuotettiin lämmittämällä huoneen lämpötilaan ja samalla varovasti ravistellen. Tämän jälkeen sentrifugoitiin 10 minuuttia Eppendorf-mikrofuugissa. Pelletit liuotettiin seokseen, joka sisälsi 10 µl 10 mM Tris.HCl pH 7,3 puskuria ja 1 mM EDTA, sekoitettiin 10 µl:n kanssa 4 M ammoniumasetaattia ja saostettiin 40 µl:lla etanolia. Tällä menetelmällä poistettiin reagoimattomista deoksinukleosiditriposfaateista yli 99 %. Pelletti huuhdeltiin etanolilla.

Vaihe 2: Oligodeoksisytidylaatin /oligo (dC)/ lisääminen.

Plasmidi-cDNA:mRNA:n sisältävä pelletti liuotettiin 20 µl:aan 140 mM natriumkakodylaatti-30 mM Tris.HCl pH 6,8 puskuria, joka sisälsi 1 mM CoCl₂, 0,1 mM ditiotreitolia, 0,2 µg poly(A), 70 µM dCTPS, 5 µCi ^{32}P -dCTP, 3000 Ci/mmol ja 60 yksikköä terminaalista deoksinukleotidyylitransferaasia. Reaktio suoritettiin 37°C:ssa 5 minuutin ajan, joka mahdollisti 10 - 15 dCMP-tähteen lisäämisen päätä kohti, ja sen jälkeen päätettiin reaktio 2 ul:lla 0,25 M EDTA (pH 8,0) ja 1 µl:lla 10% SDS. Uutettiin 20 µl:lla fenoli-CHCl₃, minkä jälkeen vesifaasi sekoitettiin 20 µl:n kanssa ammoniumasetaattia, DNA saostettiin ja saostettiin uudelleen 80 ul:lla etanolia. Lopullinen pelletti

huuhdelttiin etanolilla.

Vaihe 3: HindIII endonukleaasi-digestio.

Pelletti liuotettiin 30 μ l:aan puskuria, jonka koostumus ml kohti oli: 20 mM Tris.HCl pH 7,4, 7 mM MgCl₂, 60 mM NaCl ja 0,1 mg BSA. Sen jälkeen digestoitiin 2 tuntia 37°C:ssa 10 yksiköllä HindIII endonukleasilla. Reaktio lopetettiin 3 μ l:lla 0,25 M EDTA:ta (pH 8,0) ja 1,5 μ l:lla 10% SDS. Tämän jälkeen uutettiin fenoli-CHCl₃:lla ja lisättiin 30 μ l 4 M ammoniumasetaattia ja DNA saostettiin 120 μ l:lla etanolia. Pelletti huuhdelttiin etanolilla ja liuotettiin sen jälkeen seokseen, jossa oli 10 μ l 10 mM Tris.HCl (pH 7,3) puskuria ja 1 mM EDTA:ta. Jäätymisen -20°C-lämpötilaisen säilytyksen aikana estettiin lisäämällä 3 μ l etanolia.

Vaihe 4: Oligo (dG)-hätäisen linkkeri-DNA:n välittämä syklisointi

9 μ l:n näytettä HindIII endonukleasilla digestoitua oligo (dC)-hätäistä cDNA:mRNA-plasmidia. (90 % näytteestä) inkuboitiin 5 minuuttia 65°C:ssa seoksessa (90 μ l), jonka koostumus oli 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl ja 1,8 pmol oligo (dG)-hätäinen linkkeri-DNA, minkä jälkeen laskettiin 42°C:een 60 minuutiksi ja tämän jälkeen jäädytettiin 0°C:een. Seos (90 μ l) säädettiin 900 μ l:ksi seoksella, jonka koostumus ml kohti oli: 20 mM Tris.HCl pH 7,5, 4 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 M KCl, 50 μ g BSA ja 0,1 mM β -NAD; lisättiin 6 μ g E.coli DNA-ligaasia ja liuosta inkuboitiin sen jälkeen yön yli 12°C:ssa.

Vaihe 5: RNA-säikeen korvaaminen DNA:lla.

Insertin RNA-säikeen korvaamiseksi ligatointiseos säädettiin niin, että se sisälsi 40 μ M kutakin neljää deoksinukleo-

siditriposfaattia, 0,15 mM β -NAD, 4 μ g vielä lisättyä E.coli DNA-ligaasia, 16 yksikköä E.coli DNA-polymeraasia I (PolI) ja 9 yksikköä E.coli RNAasia H. Tätä seosta (960 μ l) inkuboitiin peräkkäin 12^oC:ssa ja huoneen lämpötilassa kussakin 1 tunti tarkoituksena edistää optimaalista korjautumissynteesiä ja nick-translaatiota PolI:n avulla.

Vaihe 6: E.coli'in transformointi

Transformointi suoritettiin käyttämällä Cohen'in et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2110-2114 /1972/) kuvaamaan menetelmää pienin muunnelmin. E.coli K-12 kanta MC1061 (Casadaban, M. ja Cohen, S., J. Mol. Biol. 138: 179-207 /1980/) kasvatettiin 0,5 absorptioyksikön (600 nm) tiheyteen 37^oC:ssa 20 ml:ssa L-lientä. Solut otettiin talteen sentrifugoimalla, suspendoitiin 10 ml:aan 10 mM Iris.HCl pH 7,3 puskuria, joka sisälsi 50 mM CaCl₂, ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 0^oC:ssa. Solut suspendoitiin uudelleen 2 ml:aan edellä mainittua puskuria ja inkuboitiin jälleen 5 minuuttia 0^oC:ssa; sen jälkeen 0,2 ml:n kanssa solususpensiota sekoitettiin 0,1 ml DNA-liuosta (vaihe 5) ja inkuboitiin 15 minuuttia 0^oC:ssa. Tämän jälkeen soluja pidettiin 2 minuuttia 27^oC:ssa ja tämän jälkeen 10 minuuttia huoneen lämpötilassa. Sen jälkeen lisättiin 0,5 ml L-lientä ja viljelmää inkuboitiin 30 minuuttia 37^oC:ssa, sekoitettiin 42^oC:ssa 2.5 ml:n kanssa L-liemen pehmeälle agarille ja levitettiin L-liemen agarille, joka sisälsi 50 μ g ampisilliinia ml:ssa. Inkuboitiin 37^oC:ssa 12 - 24 tuntia ja pesäkkeet poimittiin steriileillä hammastikuilla.

Muodostui noin 1×10^6 riippumatonta cDNA-kloonia, joista yksitellen poimittiin 10.000 kloonia ja siirrostettiin nämä mikrotiitterilevyjen kaivoihin, jotka sisälsivät 200 μ l L-lientä, 50 μ g/ml ampisilliinia ja 7 % DMSO. Muodostui noin 1000 kloonin sattumapoolit, ja valmistettiin

plasmidi-DNA-hybridien selektiokokeita varten.

H. Hybridiselektiot.

Hybridiselektiot suoritettiin kahdeksalla cDNA-plasmidivalmisteella, jotka otettiin edellä kuvatuista sattumapoolista.

1) DNA-suodattimien valmistaminen

Kaikki plasmidi DNA-lajit linearisoitiin digestoimalla ClaI:llä ennen sitomista nitroselluloosasuodattimiin. Digestiot suoritettiin 50 μ l:ssa seosta, jonka koostumus oli: 10 mM Tris.HCl pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 10 μ g plasmidi-DNA, 50 mM NaCl ja 10 yksikköä ClaI. Inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa, minkä jälkeen näytteet laimennettiin 200 μ l:ksi TE:llä (10 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) ja uutettiin yhtä suurella tilavuudella (200 μ l) TE:llä kyllästettyä fenolia. Vesifaasiin lisättiin 20 μ l 3M natriumasetaattia (pH 6) ja tämä saostettiin 2 tilavuudella etanolia. DNA-pelletit otettiin talteen sentrifugoimalla ja sen jälkeen pestiin 70-prosenttisella etanolilla. Kuivattu pelletti suspendoitiin uudelleen 150 μ l:aan steriiliä vettä jokaista 10 μ l kohti DNA:ta. Jokaista DNA-näytettä kohti valmistettiin kaksoissuodattimet, 10 μ g DNA:ta suodatinta kohti. DNA 150 μ l:ssa vettä kiehutettiin 10 minuuttia, sen jälkeen lisättiin 150 μ l 1M natriumhydroksidia ja liuosta inkuboitiin 20 minuuttia huoneen lämpötilassa. Näyte jäähdytettiin jäällä, sen jälkeen lisättiin 150 μ l 1M HCl, 1M natriumkloridia, 0,3M natriumsitraattia ja 0,5M Tris.HCl pH 8,0 puskuria.

0,9 cm Millipore HAWP-suodattimet, jotka oli kostutettu tislattulla vedellä, laitettiin Schleicher'in ja Schuell'in mikro-suodatuslaitteeseen. Edellä saatu denaturoitu ja neutraloitu DNA-liuos suodatettiin sentrifugoimalla 5 minuuttia 500 kierr./min. Suodattimet pestiin 1 ml:lla

6xSSC (0,15 M NaCl, 0,015 M Na-sitraatti) ja sen jälkeen ilmakeivattiin, ennenkuin paistettiin 2 tuntia 80°C:ssa.

2) Hybridisoinnit

Hybridisoinnit suoritettiin 200 µl:ssa seosta, jonka koostumus oli: 65 % (v/v) uudistettu formamidi, 20 mM PIPES, pH 6,4, 0,4 M NaCl, 200 µg/ml vasikanmaksan tRNA ja 100 µg/ml polyA⁺ mRNA ConA-indusoiduista Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluista. Jokaista hybridisointiliuosta kuumennettiin 3 minuuttia 70°C:ssa ja sen jälkeen kaksi DNA-suodatinta (10 µg DNA/suodatin) leikattiin neljänneksiin ja lisättiin liuokseen. Hybridejä inkuboitiin 4 tuntia 50°C:ssa ja sen jälkeen inkuboitiin 4 tuntia 46°C:ssa ja 42°C:ssa. Tämän jälkeen supernatantit poistettiin ja suodattimet pestiin kolme kertaa 1 ml:lla seosta, jonka koostumus oli: 10 mM Tris.HCl pH 7,4, 0,15M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS. Tämän jälkeen pestiin kolme kertaa 1 ml:lla samaa puskuria ilman SDS. Kumpaakin puskuria säilytettiin pesuja varten 65°C:ssa. Hybridisoidun mRNA:n eluoimiseksi pikkupulloihin lisättiin 400 µl tislattua vettä ja 5 µg vasikanmaksan tRNA:ta. Putkia kiehutettiin 3 minuuttia ja sen jälkeen jäähdytettiin nopeasti kuivajää/etanolista. Näytteet sulatettiin ja eluoitu RNA saostettiin 2 tilavuudella etanolia ja 0,1 tilavuudella 3M Na-asettaattia (pH 6). RNA-pelletit otettiin talteen sentrifugoimalla ja pestiin kaksi kertaa 70-prosenttisellä etanolilla. Kuivatut pelletit suspendoitiin uudelleen µl:aan oosyyttien injisointipuskuria ja koko näyte injisoitiin oosyytteihin (kts. edellä).

Tällä tavoin seulotusta kahdeksasta lähtöpoolista useat olivat positiivisia ja jatkoanalyysiin valittiin 1 pooli, jossa MCGF-aktiivisuus oli korkein. Tämä pooli, joka muodostui 672:sta yksittäisestä kloonista, jaettiin edelleen neljääntoista alipooliin, joissa kussakin oli 48 kloonina. Näistä alipoolista saatu plasmidi-DNA käytettiin hybridiselektioiden toisessa sarjassa. Vain yhdestä näistä

alipoleista saatiin positiivinen signaali. Sen jälkeen nämä 48 kloonia seulottiin jäljempänä kuvatulla tavalla pienennetyllä cDNA-koettimella.

I. Pienennetyn cDNA-koettimen valmistaminen

1) ^{32}P -cDNA-synteesi:

2 μg polyA⁺ mRNA:ta, joka oli saatu edellä saadun sakka-roosigradientin MCGF-huippujakeesta, suspendoitiin uudelleen 2 ul:aan vettä. Tätä kuumennettiin 5 minuuttia 65^oC:ssa, sen jälkeen lisättiin reaktioseokseen, jonka koostumus oli: 50 mM Tris.HCl pH 8,3, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 0,7 mM DTT, 1 mM dATP, 1 mM dGTP ja 1 mM dTTP, 34 μM dCTP, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligo-/12-18/-(dT) (Collaborative Research), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aktinomysiini D, 500 μCi α - ^{32}P -dCTP (Amersham, 3000 Ci/mmol) ja 150 yksikköä käänteistranskriptaasia (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, FL), kokonaistilavuuden ollessa 100 ul. Inkuboitiin 2 tuntia 40^oC:ssa, minkä jälkeen reaktioseoksesta poistettiin 0,5 μl , joka saostettiin trikloorietikkahapolla liittyneen ^{32}P -määrän määrittämiseksi. Sen jälkeen lisättiin 100 μl 0,2 N natriumhydroksidia ja RNA hydrolysoitiin kuumentamalla näytettä 20 minuuttia 70^oC:ssa. Jäähdyttämisen jälkeen reaktioseos neutraloitiin 20 ul:lla 1 N suolahappoa ja lisättiin kantajana 4 μl 1 mg/ml tRNA:ta. Näyte uutettiin kaksi kertaa yhtä suurella tilavuudella fenoli-kloroformia (1:1). Sen jälkeen se saostettiin yhtä suurella tilavuudella 4 M ammoniumasetaattia ja 2 tilavuudella etanolia. Pelletti suspendoitiin uudelleen 100 μl :aan vettä, saostaminen toistettiin ja pelletti pestiin kaksi kertaa 80-prosenttisellä etanolilla.

2) Ensimmäinen pienentävä hybridisointi:

^{32}P -cDNA (syntetisoitiin kuten edellä) kerasaostettiin käyttämällä 20 μg polyA⁺ mRNA:ta WEHI-3:sta ja 20 μl

polyA⁺ mRNA:ta B-soluhybridomasta. Pelletti suspendoitiin uudelleen seokseen, jossa oli 7 μ l vettä, 1 μ l 4 M Na-fosfaattia pH 7, 0,1 μ l 20% SDS ja 0,1 μ l 0,1M EDTA:ta, ja sen jälkeen koko näyte suljettiin kapillaariputkeen. Näytettä kuumennettiin 30 minuuttia 90°C:ssa, minkä jälkeen pidettiin 14 tuntia 68°C:ssa (Cot = 5000). Hybridisointiseos laimennettiin sen jälkeen 1 ml:ksi 0,12 M natriumfosfaatilla pH 7,0 ja 0,1%:lla SDS ja seoksen lämpötila nostettiin 60°C:een. Seos vietiin sen jälkeen pylvääseen, joka sisälsi 0,4 g samassa puskurissa tasapainoitettua hydroksiapatiittia, ja pidettiin 60°C:ssa. Läpivirta otettiin talteen ja sen jälkeen pylväs pestiin 5 ml:lla samaa puskuria 60°C:ssa. 1 ml:n jakeet otettiin talteen ja kustakin jakeesta laskettiin 1 μ l:n erät skintillaatiolaskimessa. Yksisäikeinen cDNA-piikki jakeessa 2, 3 ja 4 yhdistettiin. Tämä materiaali, joka muodosti 66,5 % ³²P-cDNA-lähtöaineesta, väkevöitiin 0,4 ml:ksi uutamalla 2-butanolilla ja sen jälkeen suolat poistettiin kromatograafisesti 2 ml:n Sephadex G-25-pylväässä.

3) Toinen pienentävä hybridisointi:

Edellä saatu näyte, josta suolat oli poistettu, väkevöitiin etanolisaostuksen avulla ja sen jälkeen keraosaostettiin käyttämällä 9,5 μ g poly A⁺ mRNA:ta indusoimattomista Cl.Ly 1⁺2⁻/9 soluista. Pesty ja kuivattu pelletti suspendoitiin uudelleen seokseen, jonka koostumus oli: 10 μ l vesi, 1,5 μ l 4M natriumfosfaatti pH 7, 0,15 μ l 20% SDS ja 0,15 μ l 0,1 M EDTA. Näytettä inkuboitiin suljetussa kapillaariputkessa 30 minuuttia 90°C:ssa ja sen jälkeen 20 tuntia 68°C:ssa. Kromatografointi hydroksiapatiitilla toistettiin edellä kuvatulla tavalla. Yksisäikeinen cDNA, joka eluoitui pylväästä 60°C:ssa, muodosti 17 % lähtöaineista. Tällä ³²P-cDNA:lla pylväshybridisoitiin 48 pesäkettä hybridiselektioiden identifioimassa alipoolissa. Kolme pesäkettä hybridisoitui koettimen kanssa ja näitä käytettiin jatkossa hybridiselektioinnissa. Yksi näistä,

jolle annettiin nimeksi kloonin 5G, oli toistettavasti positiivinen.

J. Koon perusteella fraktioitu alikirjasto

30 µg plasmidi-DNA:tä, joka muodosti koko cDNA-kirjaston (pcD-X DNA), digestoitiin erikseen restriktioentsyymeillä Sall, HindIII ja Clal plasmidin linearisoimiseksi. Käsitellyt DNA:t fraktioitiin koon perusteella 1% agarosigeelillä, joka erotti plasmidit, joissa oli erikokoiset cDNA-insertit. Geelistä leikattiin segmentit, plasmideineen, joissa oli seuraavien kokoalueiden cDNA-insertit:

- 0 - 1kb
- 1 - 2kb
- 3 - 4kb
- 4 - 5kb
- 5 - 6kb
- 6 kb ja pidemmät

DNA eluoitiin jokaisesta geeliviipaleesta käyttämällä Vogelstein'in ja Gillespie'n lasijauhemenetelmää (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 76: 615-619 /1970/). Kolmesta digestiotuotteesta eluoidut DNA:t yhdistettiin koon perusteella ja syklisoitiin uudelleen käsittelemällä T4 ligaasilla yhteensä 15 ul:ssa seosta, jonka koostumus oli: 50 mM Tris.HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM spermiidiini, 1 mM ATP ja 100 µg/ml BSA. Ligatointiseoksia inkuboitiin 16 tuntia 12^oC:ssa. E.coli-kanta MC 1061 transformoitiin Cohen'in et al.-menetelmällä (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2110-2114 /1972/) käyttämällä 3 µl kutakin yhdistettyä fraktiokokoa. $1,1 \times 10^5$ riippumatonta transformaatiota sisältävä kirjasto saatiin jakeelle, joka sisälsi 1-2 kb pituisia cDNA-inserttejä. Tätä jaetta käytettiin myöhemässä täyspitkien MCGF-kloonien seulonnassa.

K. Koon perusteella fraktioidun alikirjaston seulonta

Alustava reskriktioendonukleaasianalyysi sekä DNA-sekvenssitiedot osoittivat, että kloonin 5G (identifioitu hybridiselektion avulla) cDNA-insertti oli noin 650 emäsparin pituinen. Kloonista 5G eristettiin sisäinen BamHI-NcoI restriktiofragmentti. Fragmentti defosforyloitiin vasikan-suoliston alkalisella fosfataasilla G. Chacomas'in ja J. Sande'n menetelmällä (Methods Enzymol. 65: 75-79 /1980/). Sen jälkeen fragmentti leimattiin $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP:llä ja T4 polynukleotidikinaasilla A. Maxam'in ja W. Gilbert'in menetelmällä (Methods Enzymol. 65: 499-507 /1980/). Tätä leimattua fragmenttia käytettiin sen jälkeen ConA-indusoidun Cl.Ly 1⁺2⁻/9 mRNA:n RNA-täplän koettimena. Detektoitiin noin 1 kb pituinen vyöhyke, mikä viittaa siihen, että klooni 5G ei ollut täyspitkä klooni.

Sen vuoksi samalla 5G cDNA-insertistä saadulla koettimella seulottiin 1-2 kb inserttien suhteen rikastettu alikirjasto (saatu edellä). Käytimme T. Maniatis'in et al. (Molecular Chem., Cold Spring Harbor Laboratory /1982/) kuvaamaa Hanahan ja Moselson'in (Gene, 10: 63 /1980/) menetelmää. Noin 500-1000 bakteeria levitettiin 80 mm nitroselluloosa-suodattimille ja inkuboitiin 37^oC:ssa L-liemimaljoilla, jotka sisälsivät 50 $\mu\text{l/ml}$ ampisilliinia, ja bakteeripesäkkeet siirrettiin toiselle nitroselluloosasuodattimelle. Suodattimien kaksoiskappaleita inkuboitiin 37^oC:ssa 8 tuntia L-liemellä (+ ampisilliini), siirrettiin 10 $\mu\text{g/ml}$ kloramfenikolia sisältäville L-liemimaljoille ja inkuboitiin yön yli plasmidin kopiomäärän monistamiseksi. T. Maniatis'in et al., supra kuvaamalla tavalla lyysattiin pesäkkeet SDS:llä, denaturoitiin natriumhydroksidilla ja neutraloitiin, minkä jälkeen pesäkkeistä saatu DNA sidottiin nitroselluloosaan.

Seulottiin noin 20.000 pesäkettä, joista 19 pesäkettä oli toistettavasti positiivisia koettimen kanssa tehdyn uusintaseulonnan jälkeen. Näistä pesäkkeistä valmistettiin

plasmidi-DNA:ta ja käytettiin tätä transfektointikokeissa.

L. DNA-transfektioinnit

Yhtä päivää ennen transfektointia laitettiin 10^6 COS-7 apinasolua yksittäisille 60 mm maljoille DME:ssä, joka sisälsi 10 % vasikansikiöseerumia ja 2 M glutamiinia. Transfektioinnin suorittamiseksi alusta aspiroitiin jokaiselta maljalta ja korvattiin 1,5 ml:lla DME:tä, joka sisälsi 60 mM Tris.HCl pH 7,4 puskuria, 400 µg/ml DEAE-dekstraania ja 15 µg testattavaa plasmidi-DNA:ta. Maljoja inkuboitiin 4 tuntia 37°C:ssa, sen jälkeen poistettiin DNA-pitoinen alusta ja maljat pestiin kaksi kertaa 2 ml:lla seerumivapaata DME:tä. 2,0 ml DME:tä, joka sisälsi 4% vasikansikiöseerumia ja 2 mM glutamiinia, lisättiin maljoille, joita sen jälkeen inkuboitiin 72 tuntia 37°C:ssa. Kasvualusta otettiin talteen ja siitä määritettiin edellä kuvatulla tavalla MCGF-aktiivisuus.

Viisi pesäkettä alkuaan kuudesta positiivisesta tutkittiin transfektoimalla. Tulokset on esitetty taulukossa II. Valeinfektoidut COS-7 solut käsiteltiin samalla tavoin, mutta jättämällä DNA pois.

TAULUKKO II
MCGF:n transientti ekspressoituminen apinasoluissa

Kloonit	cDNA lähtökohta*	Oligo(dG)-palkan pituus***	MCGF-aktiivisuus yks./ml:ssa
Vale	-	-	<20
B4	41	13	5.228
B5	ND**	ND	7.371
B6	1	13	3.307
B8	1	13	6.929
B9	1	13	3.362
C1.Ly 1 ⁺ 2 ⁻ /9	-	-	19.769

- * MCGF cDNA:n 5'-pää on esitetty nukleotiditähteenä kuviossa 1.
- ** Ei määritetty; cDNA:n lähtökohta sijaitsee kohdan 41 5'-puolella.
- *** Oligo (dG)-pala MCGF cDNA:n 5'-päässä.

Kuviossa 3 on esitetty plasmidi (pcD-MCGF), jossa on täysipituinen MCGF- ja multi-CSF (kts. jäljempänä) cDNA-insertti. E.coli-bakteeri, jossa plasmidi on, on tallennettu ATCC-kokoelmaan (kokoelma numero 39467). 950 bp insertti on pcD-ekspressiovektorissa. Nuolella on osoitettu transkriptio SV40 alkupromoottorista. Myös katkaisun donori- ja akseptorikohtien sijainti on esitetty. Polyadelyointisignaali, joka siis on peräisin SV40:stä, sijaitsee cDNA-insertin 3'-päässä. cDNA-insertti on viivoitettu tiheällä. Loput vektorisekvensseistä ovat peräisin pBR322:sta, joka sisältää β -laktamasigeenin (Amp^R) ja replikoitumisen alkukohdan.

Kuviossa 4 on esitetty esillä olevan keksinnön mukaisen cDNA-insertin restriktioendonukleaasin katkaisukartta. Kuviossa 1 on esitetty nukleotidisekvenssi ja oletettu aminohapposekvenssi.

Kolme cDNA-inserttiä sisältävät yhden ainoan avoimen lukukehyksen, joka muodostuu 166:sta kodonista alkaen metioniinikodinilla kohdassa 28. Tämän oletetun aloituskodonin lisäksi ensimmäisen myötäpuolella sijaitsee 12 ja 18 kodonin päässä kaksi muuta metioniinikodonia. Neljäs cDNA-klooni 40 emäsparin verran myötäpuolella kolmen muun insertin 5'-päistä. Tässä lyhyessä cDNA-kloonissa ei ole ensimmäistä metioniinikodonia, mutta sillä kuitenkin saadaan aktiivinen MCGF viettäessä COS-soluihin. Toinen näistä kahdesta myötäpuolella sijaitsevasta ATG-kodonista voi siten ilmeisesti toimia aloituskodonina.

COS-7 soluissa ekspressoitulla kloonilla B9 (COS-MCGF)

arvioitiin sen aktiivisuusspektri, kun mukana ei ollut muita T-solutuotteita. Ekspressoitu materiaali ei ole mitogeeninen T- tai B-soluille, se ei indusoi B-soluja tuottamaan immunoglobuliinia (taulukko III) eikä se indusoi makrofaagi IA:n ekspressiota. Tämä geenituote kuitenkin stimuloi hematopoeettisten pesäkkeiden muodostumista metyyliiselluloosaan suspendoiduissa luuydinsoluissa osoittaen, että yhdellä ainoalla geenituotteella voi olla sekä MCGF- että pesäkettä stimuloiva aktiivisuus.

Selitykset taulukkoon III

* Pesäkkeiden määrä $1,5 \times 10^5$ luuydinsolua kohti. Jokainen arvo tarkoittaa kolmesta rinnakkaisesta viljelmästä määritettyjen pesäkkeiden keskimäärää \pm SEM. $1,5 \times 10^5$ ei-tarttuvaa, pienitiheyksistä ($< 1,077$ g/ml) luuydinsolua C57Bl/6 hiiristä suspendoitiin 1 ml määriin 35 mm maljoissa, jotka sisälsivät 0,9 % metyyliiselluloosaa, 20 % CFS, Iscove'n modifioitua Dulbecco'n alustaa, 50 μ M 2-ME ja 30 % kasvatusalustaa, joka oli käsitelty annetuilla solusupernatanteilla. CSF:n, joka indusoi makrofaagipesäkkeiden muodostumista, lähteenä käytettiin hiiren L-soluja. Inkuboitiin 5 päivää 37°C:ssa CO₂:ssa, minkä jälkeen jokaiseen maljaan lisättiin 0,5 - 1,0 yksikköä erytropoietiinia (Connaught, vaihe III). Maljoja inkuboitiin vielä 7 päivää, minkä jälkeen pesäkkeet laskettiin leikkausmikroskoopin avulla.

** TCGF-aktiivisuus määritettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla. Yksi TCGF-aktiivisuusyksikkö on määritelty siksi määräksi, joka maksimaalisesta määrästä laskettuna 25 % ³H-tymidiinin liittymisen 5×10^3 HT-2 soluihin.

† B-solut puhdistettiin C57Bl/6 hiirten pernasoluista ja niistä määritettiin kuvatulla tavalla lisääntyminen. Yksi BCGF-aktiivisuusyksikkö on määritelty siksi määräksi, joka aiheuttaa 50-prosenttisen ³H-tymidiinin liittymisen 1×10^5 B-soluihin, joita on stimuloitu 2 μ g/ml LPS:lla.

†† Immunoglobuliinia erittävien ja plakin muodostavien solujen kokonaismäärä laskettiin hemolyyttisten plakkien määritysmenetelmän muunnelmalla.

Tarkemmin sanoen ekspressoitunut B-9 klooni testattiin olosuhteissa, joissa BFU-E-, CFU-G/M- ja seka-CFU-pesäkkeiden kehittyminen on mahdollista. Taulukko III osoittaa, että kolmen tyyppisiä pesäkkeitä voitiin identifioida ja laskea

luuydinsolujen viljelmissä, joita oli inkuboitu ekspressoidun materiaalin kanssa. Lukuisin tyyppi muodostui värittömistä pesäkkeistä, joilta puuttuivat hemoglobinisoidut osat. Niiden morfologia oli tyypillinen granulosyytti/makrofaagi-pesäkkeille, joiden olemassaolo vahvistettiin myöhemmin histokemiallisen värjäyksen avulla. Mukana oli myös joitakin suuria makroskooppisia pesäkkeitä, jotka sisälsivät monikeskisesti järjestäytyneinä tasaisesti punaisia solurykelmiä, joille annettiin nimeksi BFU-E. Lisäksi havaitsimme muutamia pesäkkeitä, jotka sisälsivät hemoglobinoituja soluja sekoittuneena suurten ja pienten läpikuultavien solujen kanssa, jotka laskettiin sekasoluina.

Näiden erilaisten pesäkkeiden koostumus analysoitiin viemällä valitut pesäkkeet lasilevyille ja värjäämällä Wright-Giemsa-värillä tai epäspesifisillä esteraasiväreillä. Yli 300 pesäkettä tutkittiin. Suurin osa näistä pesäkkeistä (89 %) muodostui granulosyyteistä, makrofaageista tai granulosyytti/makrofaagiseoksesta, kun taas 4 % muodostui syöttösoluista. Loput muodostuivat muista sekasolulinjoista kuin neutrofiili/makrofaagi. Taulukossa IV on esitetty eri tyyppien määrät 10 tyypilliselle sekapesäkkeelle, jotka oli kerätty useasta kokeesta. Useiden solutyypin mukanaolo yhdessä ainoassa pesäkkeessä viittaa siihen, että nämä pesäkkeet ovat peräisin monipotentialisista edeltäjäsoluista.

Taulukko IV

Hematopieettisten sekapesäkkeiden, jotka oli otettu COS-MCGF-käsitellyssä alustassa kasvatetuista luuydinviljelmistä, solujen koostumus

Pesäkkeen numero	*Eri tyyppien määrät (%).....						
	E	n	m	e	syöttö	M	B1
1	21				76		3
2		36	35	29	9		
3	97		1			2	
4			22		78		
5	17		74		9		
6		64	15	21			
7	18	81				1	
8	27	40		33			
9		86		14			
100	96					3	1

* Erilaisten tyyppien määrät, jotka suurempia kuin 200 tumallista solua/pesäke. Käytetyt lyhennykset ovat:
E, erytrosyytti; n, neutrofiili; m, makrofaagi/monosyytti;
e, eosinofiili; syöttö, syöttösolu; M, megakaryosyytti;
ja B1, emosolu.

Ekspressoidun B-9 kloonin vaikutukset määritettiin tehtävöitymättömillä varhaisvaiheen kantasoluilla Till'in ja McCulloch'in (Radiat. Res., 14: 213-222 /1961/) CFU-S-menetelmällä J. Schrader'in ja I. Clark-Lewis'in (J. Immunol., 129: 30-35 /1982/) modifioimalla tavalla. Kun kiinnittämättömiä luuydinsoluja, joissa ei ollut T-soluja, inkuboitiin yksi viikko COS-MCGF-alustalla ja injisoitiin laskimon kautta kuolettavasti säteilytettyyn hiireen, pernaan ilmestyi makroskooppisia pesäkkeitä (taulukko V). Sen sijaan solut, joita oli inkuboitu valetransfektoitujen COS-7 solujen supernatanteissa, eivät muodostaneet pesäkkeitä.

TAULUKKO V

CFU-S-solujen havaitseminen luuydinsoluissa, joita viljelty yksi viikko COS-MCGF-käsitellyllä alustalla.

Viljelmään lisätty supernatantti	Koe n:o	Pernamodulit/hiiri*	CFU-S**
COS-7 solut, transfektoitu täyspitkällä MCGF cDNA:lla	1	8,8 ± 1,5	264
	2	6,2 ± 2,8	186
COS-7 solut, trasfektoitu epätäydellisellä MCGF cDNA:lla*	2	0,8 ± 0,7	24
Valetransfektoidut COS-7 solut	1	0,87 ± 0,7	24
	2	0,7 ± 0,6	21
L-solut	1	0,3 ± 0,5	9
	2	Ei tehty	-
Alusta	1	0,3 ± 0,5	9
	2	0,5 ± 0,5	15

* Pernapesäkkeiden keskiarvo ± SEM 5 eri hiiressä.

** CFU-S-solujen laskettu keskiarvo, joka kuvaa CFU-S-solujen esiintymistäajuutta koko viljelmässä, jossa 3×10^6 luuydinsolua.

† Epätäydellisellä MCGF cDNA-kloonilla ei ole aluetta, joka koodaa NH_2 -terminaalista 55 aminohappoa.

Tiheydeltään keveitä (1,077) C57B1/6 luuydinsoluja, jotka oli käsitelty anti-Thyl-vasta-aineella ja komplementilla, maljattiin 1×10^6 solua/ml Iscove'n modifioituun Dulbecco'n alustaan, joka edellä kuvatulla tavalla oli täydennetty 20 %:lla vasikansikiöseerumia, 50 µM 2-ME:llä ja 30 %:lla käsiteltyä alustaa. Kiinnittymättömät solut poistettiin kolme kertaa yhden viikon inkubointijakson aikana ja korvat-

tiin uudella alustalla. Solut otettiin talteen viikon kuluttua, pestiin kaksi kertaa ja laimennettiin alkuperäiseen viljelytilavuuteen fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. Jokainen kuolettavasti säteilytetty (1.000 R) C57B1/6 eläin injisoitiin i.v. 0,1 ml:lla solususpensiota. 9 päivän kuluttua pernat poistettiin ja pernanodulit laskettiin käyttämällä leikkausmikroskooppia.

Yhteenvetona todettakoon, että aluksi karakterisoidun syöttösolun kasvutekijäaktiivisuuden lisäksi COS-MCGF:llä on ebs (erythroid burst-promoting)-aktiivisuutta, mikä mahdollistaa monien solulinjojen, mukaanlukien monosyytti/granulosyytti-, erytroidi- ja megakaryosyyttisolujen kantasolujen ja varhaisvaiheen tehtävöityneiden edeltäjäsolujen kasvun. Tämä aktiivisuusalue osoittaa, että esillä olevan keksinnön mukaiset cDNA-kloonit koodaavat proteiineja, joilla on monisolulinjaisten hematopoieettisten solujen kasvutekijäominaisuudet.

Edellä olevasta havaitaan, että esillä olevan keksinnön mukaisista cDNA-klooneista saadaan täsmälliset ja täydelliset sekvenssitiedot nisäkkäiden multi-CSF:n ja syöttösolun kasvutekijöille. Keksintö antaa myös alan ammattimiehille keinot tuottaa merkittäviä määriä tällaisia tekijöitä (jotka eivät oleellisesti sisällä muita hematopoieettisia tekijöitä) niin, että syöttösolut ja muut hematopoieettiset solut voidaan ylläpitää paremmin in vitro. cDNA-klooneista saatu informaatio lisää lisäksi nisäkkäiden immuunireaktion ymmärtämistä ja parantaa näin hoitomahdollisuuksia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä tuottaa polypeptidiä, jolla on monilinjainen nisäkässolun kasvutekijäaktiivisuus ja joka sisältää seuraavan aminohapposekvenssin

Asp - Thr - His - Arg - Leu - Thr - Arg - Thr -
 Leu - Asn - Cys - Ser - Ser - Ile - Val - Lys -
 Glu - Ile - Ile - Gly - Lys - Leu - Pro - Glu -
 Pro - Glu - Leu - Lys - Thr - Asp - Asp - Glu -
 Gly - Pro - Ser - Leu - Arg - Asn - Lys - Ser =
 Phe - Arg - Arg - Val - Asn - Leu - Ser - Lys -
 Phe - Val - Glu - Ser - Gln - Gly - Glu - Val -
 Asp - Pro - Glu - Asp - Arg - Tyr - Val - Ile -
 Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Lys - Leu - Asn -
 Cys - Cys - Leu - Pro - Thr - Ser - Ala - Asn -
 Asp - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Val - Phe -
 Ile - Arg - Asp - Leu - Asp - Asp - Phe - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Arg - Phe - Tyr - Met - Val -
 His - Leu - Asn - Asp - Leu - Glu - Thr - Val -
 Leu - Ala - Ser - Arg - Pro - Pro - Gln - Pro -
 Ala - Ser - Gly - Ser - Val - Ser - Pro - Asn -
 Arg - Gly - Thr - Val - Glu - Cys - ;

t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa

- a) muodostetaan vektori, joka käsittää mainittua polypeptidiä koodaavan nukleotidisekvenssin, erityisesti mainittua polypeptidiä koodaavasta mRNA-sekvenssistä saadun cDNA-sekvenssin, jolloin vektorin sisältävä nisäkäs- tai bakteeri-isäntä kykenee ekspressoimaan nukleotidisekvenssin, joka kykenee koodaamaan mainitun polypeptidin;
- b) liitetään vektori isäntään; ja
- c) pidetään vektorin sisältävä isäntä olosuhteissa, jotka sopivat nukleotidisekvenssin ekspressoimiseen mainituksi polypeptidiksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidiä koodaavan nukleotidisekvenssin kaava on

GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - .

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että nukleotidisekvenssi alkaa ainakin osalla seuraavasta sekvenssistä

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
 AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
 CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
 CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG - ;

joka koodaa vastaavan osan polypeptidin hydrofobisesta johtosekvenssistä:

Met - Val - Leu - Ala - Ser - Ser - Thr - Thr -
 Ser - Ile - His - Thr - Met - Leu - Leu - Leu -
 Leu - Leu - Met - Leu - Phe - His - Leu - Gly -
 Leu - Gln - Ala - Ser - Ile - Ser - Gly - Arg - .

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä polypeptidin valmistamiseksi jossa vesipitoisessa ravintoväliaineessa viljellään nisäkäs- tai bakteeri-isäntäsolua, joka on transfektoitu tai transformoitu vektorilla, joka sisältää ja kykenee ekspressoimaan DNA-sekvenssin, joka koodaa mainitun polypeptidin, t u n n e t t u siitä, että polypeptidillä on monilinjainen nisäkässolun kasvutekijäaktiivisuus, jonka kaava on seuraava

Asp - Thr - His - Arg - Leu - Thr - Arg - Thr -
 Leu - Asn - Cys - Ser - Ser - Ile - Val - Lys -
 Glu - Ile - Ile - Gly - Lys - Leu - Pro - Glu -
 Pro - Glu - Leu - Lys - Thr - Asp - Asp - Glu -
 Gly - Pro - Ser - Leu - Arg - Asn - Lys - Ser -
 Phe - Arg - Arg - Val - Asn - Leu - Ser - Lys -
 Phe - Val - Glu - Ser - Gln - Gly - Glu - Val -
 Asp - Pro - Glu - Asp - Arg - Tyr - Val - Ile -
 Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Lys - Leu - Asn -
 Cys - Cys - Leu - Pro - Thr - Ser - Ala - Asn -
 Asp - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Val - Phe -
 Ile - Arg - Asp - Leu - Asp - Asp - Phe - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Arg - Phe - Tyr - Met - Val -
 His - Leu - Asn - Asp - Leu - Glu - Thr - Val -
 Leu - Ala - Ser - Arg - Pro - Pro - Gln - Pro -
 Ala - Ser - Gly - Ser - Val - Ser - Pro - Asn -
 Arg - Gly - Thr - Val - Glu - Cys - ;

ja vektori sisältää ja kykenee ekspressoimaan DNA-sekvenssin, jolla on kaava

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
 AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
 CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
 CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG -
 GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - .

5. Nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa polypeptidin, jolla on monilinjainen nisäkässoluken kasvutekijäaktiivisuus ja jolla on kaava

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
 AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
 CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
 CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG -
 GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -

TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - TAA - ;

tai

GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - TAA - .

Patentkrav

1. Förfarande för produktion av en polypeptid, som uppvisar en flerlinjig däggdjurscellers växtfaktoraktivitet och som innehåller följande aminosyrasekvens

Asp - Thr - His - Arg - Leu - Thr - Arg - Thr -
 Leu - Asn - Cys - Ser - Ser - Ile - Val - Lys -
 Glu - Ile - Ile - Gly - Lys - Leu - Pro - Glu -
 Pro - Glu - Leu - Lys - Thr - Asp - Asp - Glu -
 Gly - Pro - Ser - Leu - Arg - Asn - Lys - Ser -
 Phe - Arg - Arg - Val - Asn - Leu - Ser - Lys -
 Phe - Val - Glu - Ser - Gln - Gly - Glu - Val -
 Asp - Pro - Glu - Asp - Arg - Tyr - Val - Ile -
 Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Lys - Leu - Asn -
 Cys - Cys - Leu - Pro - Thr - Ser - Ala - Asn -
 Asp - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Val - Phe -
 Ile - Arg - Asp - Leu - Asp - Asp - Phe - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Arg - Phe - Tyr - Met - Val -
 His - Leu - Asn - Asp - Leu - Glu - Thr - Val -
 Leu - Ala - Ser - Arg - Pro - Pro - Gln - Pro -
 Ala - Ser - Gly - Ser - Val - Ser - Pro - Asn -
 Arg - Gly - Thr - Val - Glu - Cys - ;

k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet omfattar följande steg, i vilka:

a) bildas en vektor omfattande en nämnda polypeptid kodande nukleotidsekvens, speciellt en från en nämnda polypeptid kodande mRNA-sekvens erhållen cDNA-sekvens, varvid vektorn innehållande däggdjurs- eller bakterievärden är i stånd att uttrycka nukleotidsekvensen, som förmår enkoda nämnda polypeptid;

b) vektorn införes i värden; och

c) den vektorn innehållande värden hålles under betingelser, som är lämpliga för att uttrycka nukleotidsekvensen i nämnda polypeptid.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att polypeptiden kodande nukleotidisekvensen har
formeln

GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - .

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att nukleotidsekvensen början med
åtminstone delvis följande sekvens:

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG - ;

som kodar motsvarande del av polypeptidens hydrofoba ledsekvens:

Met - Val - Leu - Ala - Ser - Ser - Thr - Thr -
 Ser - Ile - His - Thr - Met - Leu - Leu - Leu -
 Leu - Leu - Met - Leu - Phe - His - Leu - Gly -
 Leu - Gln - Ala - Ser - Ile - Ser - Gly - Arg - .

4. Förfarande för framställning av en polypeptid enligt patentkravet 1 eller 2, där i ett vattenhaltigt näringsmedium odlas däggdjurs- eller bakterievärdceller, som transfekteras eller transformerats med en vektor, som innehåller och förmår uttrycka en DNA-sekvens, som kodar nämnda polypeptid, k ä n - n e t e c k n a d därav, att polypeptiden uppvisar en flerlinjig däggdjurscells växtfaktoraktivitet med följande formel:

Asp - Thr - His - Arg - Leu - Thr - Arg - Thr -
 Leu - Asn - Cys - Ser - Ser - Ile - Val - Lys -
 Glu - Ile - Ile - Gly - Lys - Leu - Pro - Glu -
 Pro - Glu - Leu - Lys - Thr - Asp - Asp - Glu -
 Gly - Pro - Ser - Leu - Arg - Asn - Lys - Ser -
 Phe - Arg - Arg - Val - Asn - Leu - Ser - Lys -
 Phe - Val - Glu - Ser - Gln - Gly - Glu - Val -
 Asp - Pro - Glu - Asp - Arg - Tyr - Val - Ile -
 Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Lys - Leu - Asn -
 Cys - Cys - Leu - Pro - Thr - Ser - Ala - Asn -
 Asp - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Val - Phe -
 Ile - Arg - Asp - Leu - Asp - Asp - Phe - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Arg - Phe - Tyr - Met - Val -
 His - Leu - Asn - Asp - Leu - Glu - Thr - Val -
 Leu - Ala - Ser - Arg - Pro - Pro - Gln - Pro -
 Ala - Ser - Gly - Ser - Val - Ser - Pro - Asn -
 Arg - Gly - Thr - Val - Glu - Cys - ;

och vektorn innehåller och förmår uttrycka en DNA-sekvens med formeln

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
 AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
 CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
 CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG -
 GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - .

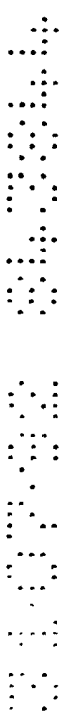
5. Nukleinsyraekvens, som enkodar en polypeptid med en fler- on linjig däggdjurscells växtfaktoraktivitet och har formeln

ATG - GTT - CTT - GCC - AGC - TCT - ACC - ACC -
 AGC - ATC - CAC - ACC - ATG - CTG - CTC - CTG -
 CTC - CTG - ATG - CTC - TTC - CAC - CTG - GGA -
 CTC - CAA - GCT - TCA - ATC - AGT - GGC - CGG -
 GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -

GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - TAA - ;

eller

GAT - ACC - CAC - CGT - TTA - ACC - AGA - ACG -
 TTG - AAT - TGC - AGC - TCT - ATT - GTC - AAG -
 GAG - ATT - ATA - GGG - AAG - CTC - CCA - GAA -
 CCT - GAA - CTC - AAA - ACT - GAT - GAT - GAA -
 GGA - CCC - TCT - CTG - AGG - AAT - AAG - AGC -
 TTT - CGG - AGA - GTA - AAC - CTG - TCC - AAA -
 TTC - GTG - GAA - AGC - CAA - GGA - GAA - GTG -
 GAT - CCT - GAG - GAC - AGA - TAC - GTT - ATC -
 AAG - TCC - AAT - CTT - CAG - AAA - CTT - AAC -
 TGT - TGC - CTG - CCT - ACA - TCT - GCG - AAT -
 GAC - TCT - GCG - CTG - CCA - GGG - GTC - TTC -
 ATT - CGA - GAT - CTG - GAT - GAC - TTT - CGG -
 AAG - AAA - CTG - AGA - TTC - TAC - ATG - GTC -
 CAC - CTT - AAC - GAT - CTG - GAG - ACA - GTG -
 CTA - GCC - TCT - AGA - CCA - CCT - CAG - CCC -
 GCA - TCT - GGC - TCC - GTC - TCT - CCT - AAC -
 CGT - GGA - ACC - GTG - GAA - TGT - TAA - .



1
 GGGGGGGGG GGGNAACCCCT TGGAGGACCA GNAACGAGACA ATG GTT CTT GCC AGC TCT ACC ACC AGC ATC CAC ACC ATG CTG CTC
 MET Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr MET Leu Leu
 20 40 60
 80
 CTG CTC ATG CTC TTC CAC CTG GGA CTC CAA GCT TCA ATC AGT GGC OGG GAT ACC CAC CGT TTA ACC AGA AGC TTG
 Leu Leu Leu MET Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu
 100 120 140
 160
 AAT TGC AGC TCT AAT GTC ANG GAG ATT ATA GGG AAG CTC CCA GAA CCT GAA CTC AAA ACT GAT GAT GAA GGA CCC TCT
 Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu Gly Pro Ser
 180 200 220
 240
 CTG AGG AAT AAG AGC TTT CCG AGA GTA AAC CTG TCC AAA TTC GTG GAA AGC CAA GGA GAA GTG GAT CCT GAG GAC AGA
 Leu Arg Asn Lys Ser Phe Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp Pro Glu Asp Arg
 260 280 300
 320
 TAC GTT ATC AAG TCC AAT CTT CAG AAA CTT AAC TGT TGC CTG CCT ACA TCT GCG AAT GAC TCT GCG CTG CCA GGG GTC
 Tyr Val Ile Lys Ser Asn Leu Leu Gln Lys Leu Asn Cys Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val
 340 360 380
 400
 TTC AAT CGA GAT CTG GAT GAC TTT CGG AAG AAA CTG AGA TTC TAC ATG GTC CAC CTT AAC GAT CTG GAG ACA GTG CTA
 Phe Ile Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val Leu
 420 440 460
 480
 GCC TCT AGA CCA CCT CAG CCC GCA TCT GGC TCC GTC TCT CCT AAC CGT GGA ACC GTG GAA TGT TAA
 Ala Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn Arg Gly Thr Val Glu Cys
 500 520

FIGURE 1

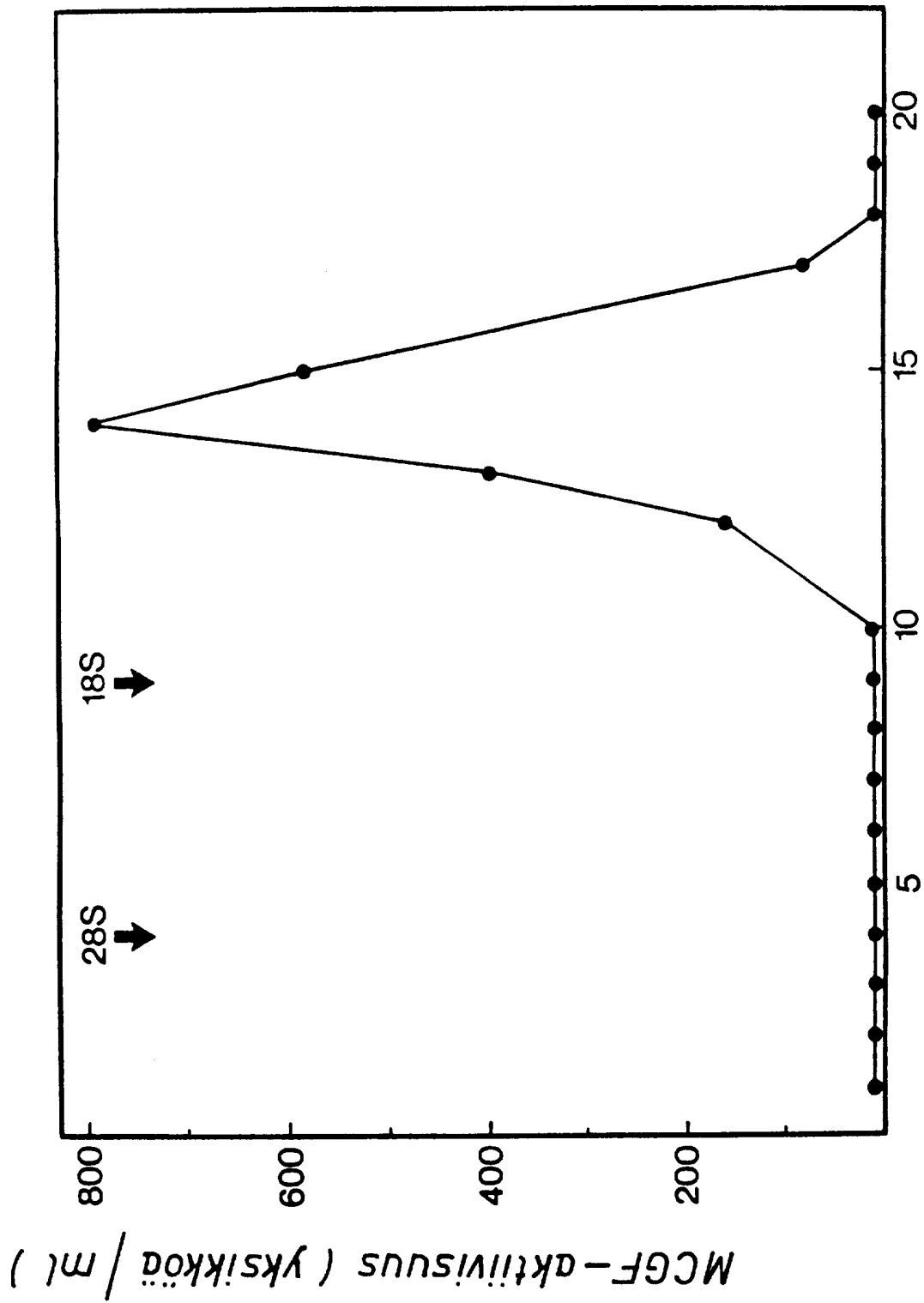


FIGURE 2

Jakeen numero

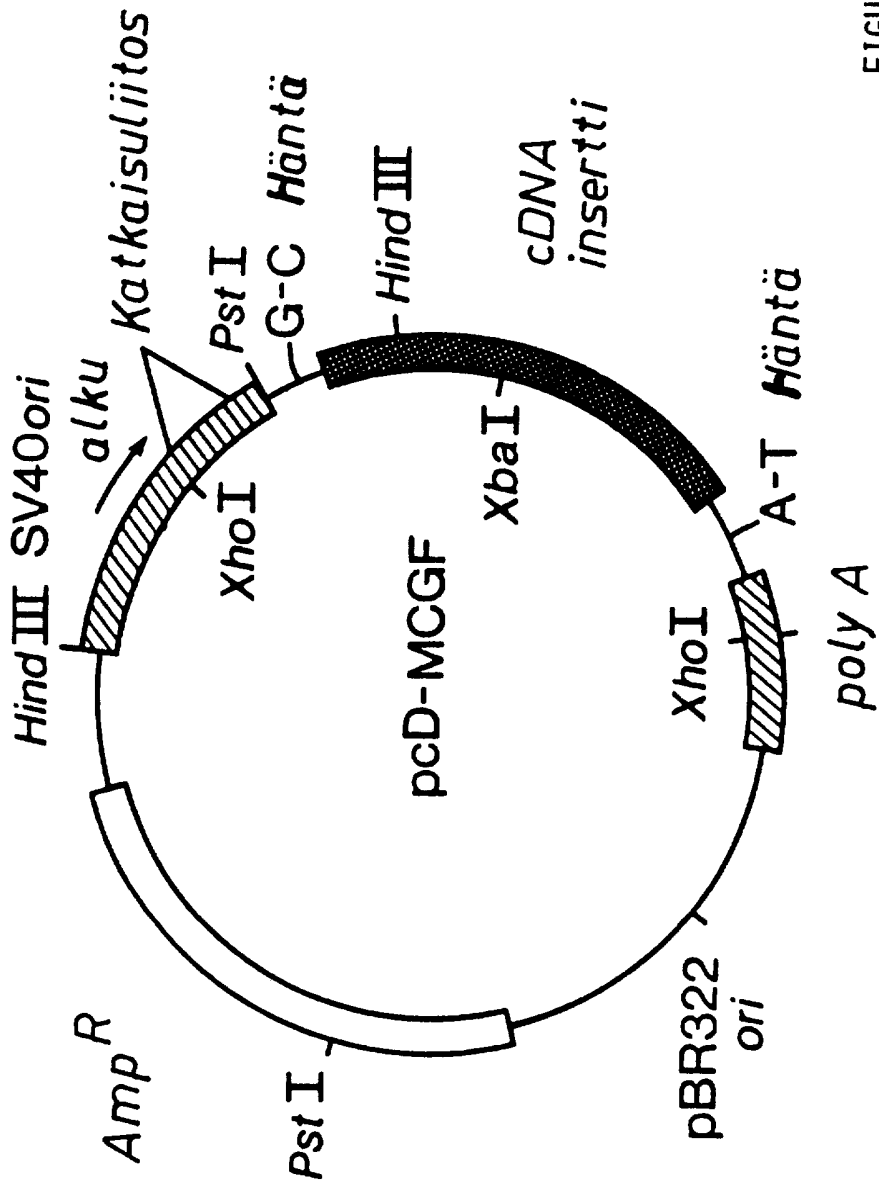


FIGURE 3

