HU 000218733 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 733 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 02049
(22) A bejelentés napja: 1992. 01. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/642,330 1991. 01. 17. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 92/00277
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/13089

(51) Int. Cl.[7]

C 12 P 19/34
C 12 N 5/10
C 12 N 7/01
C 12 N 9/10
C 12 N 15/00
C 07 H 15/12

(40) A közzététel napja: 1996. 03. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2000. 11. 28.

(72) Feltalálók:
Brand, Andrea, Cambridge, Massachusetts (US)
Goodman, Howard M., Newton, Massachusetts (US)
Haseloff, James, Cambridge, Massachusetts (US)
Perrimon, Norbert, Brookline, Massachusetts (US)

(73) Szabadalmasok:
The General Hospital Corp., Boston, Massachusetts (US)
The President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Massachusetts (US)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Eljárás sejtek eltávolítására transzillesztő ribozimok segítségével

KIVONAT

A találmány új ribozimok előállítására vonatkozik, amelyek képesek önkatalizált transzillesztésre, ami az I. csoportba tartozó intronok katalitikus magján alapszik. A találmány szerinti módszerrel olyan ribozimok konstruálhatók, amelyek nagy pontossággal, hatékonyan képesek egy új 3' exonszekvenciát bármely kiválasztott RNS-szekvenciára illeszteni. A találmány tárgya továbbá eljárás az új transzillesztő ribozimok felhasználásával, egy megcélzott gazdasejt számára toxikus termék szabályozott módon, *in vivo* biztosításával sejtek eltávolítására. A találmány kiterjed az inaktív proribozimformák előállítására is.

HU 218 733 B

A találmány új transzillesztő ribozimokra és ezek alkalmazásával sejtek eltávolítását szolgáló eljárásra vonatkozik.

I. *I. csoportba tartozó intronok*

A katalitikus aktivitással rendelkező RNS-molekulákat ribozimoknak vagy RNS-enzimeknek nevezzük [Cech T. R. Ann. Rev. Biochem. *59*, 543–568 (1990)]. A *Tetrahymena thermophila* prekurzor RNS-e egy olyan intront (egy ribozimot) tartalmaz, amely saját kihasítását képes katalizálni. Ez a ribozim strukturálisan rokon az I. csoportba tartozó intronokkal.

A módosított *T. thermophila* intronillesztő aktivitásához guanozinkofaktor és egy kétértékű kation, Mg^{++} vagy Mn^{++} jelenléte szükséges, és két egymást követő átészterezési reakción keresztül nyilvánul meg (1. ábra). Először egy szabad guanozin kapcsolódik a ribozimhoz, és 3'-végi hidroxilcsoportja olyan helyzetbe kerül, hogy az illesztőhely 5' foszforatomját támadja meg. A guanozin kovalensen kapcsolódik az intronszekvenciához, és az 5' exon felszabadul. Ezután a 3' illesztőhelynél levő foszfodiészter-kötést az 5' exon újonnan szabaddá vált 3' hidroxilcsoportja támadja meg, ami a ligált exonszekvencia képződését eredményezi. A kihasított intron – 3' hidroxilcsoportjánál és belső szekvenciáinál – azután egy sor átészterezési reakción megy át, ami megrövidített cirkuláris formák képződését eredményezi.

Ezek az egymást követő reakciók kémiailag hasonlók, és úgy tűnik, hogy egyetlen aktív helynél mennek végbe. Az önillesztő reakciókra jellemző, hogy alternatív RNS-struktúrák képződnek, mivel a különböző RNS-láncok mindegyike hasonló konformációt képez a nagymértékben konzervatív intron körül. Az illesztéshez szükséges, hogy az intron-exon kapcsolódások a „belső vezető szekvenciá"-ban (internal guide sequence) vagy IGS-ben végződő komplementer szekvencia körül csoportosuljanak.

Az 5' illesztőhelynél történő első hasításhoz szükséges, hogy az IGS és az illesztőhely között bázispárosodott hélix (P1) jöjjön létre. E hélixen belül az U:G „ingadozó" bázispár jelenléte meghatározza azt a foszfodiészterezett kötést, amely a ribozim katalitikus reakciójában hasadni fog. E kötés hasítása után a P1 hélix egy része elmozdul, és egy új hélix, a P10 képződik az IGS és a 3' illesztőhely szomszédságában levő szekvencia közötti komplementaritás következtében. A 3' illesztőhelynél levő foszfodiészterkötést egy nem változó guanozincsoport előzi meg, a P1 szekvencia azon részéhez hasonlóan, amelyet elmozdít. Így az exonok ligálása az első hasítás fordítottjaként jön létre, de ahol az új exonszekvenciákat intronszekvenciák helyettesítették. Megjegyzendő, hogy az exonligálás után végbemenő intron cirkularizálódási reakciók szintén magukban foglalnak bázispárosodást az IGS 5' szekvenciája környezetében, valamint az intronok terminális guanincsoportjának 3' hidroxilcsoportja által közvetített támadást [Been M. D. et al., Selection of cirkularization Sites in a Group I IVS RNA Requires Multiple Alignment of an Internal Template-like Sequence", Cell *50*, 951 (1987)].

II. *Katalitikus aktivitás*

Az I. csoportba tartozó intronok strukturális és katalítikus tulajdonságainak jobb jellemzése érdekében az exonszekvenciákat eltávolították a T. *thermophila* intron „magjá"-ból. Cech T. R. és munkatársai a WO 88/04300 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben legalább három, a *Tetrahymena* intron ribozim által mutatott katalitikus aktivitást írnak le: (1) egy defoszforilezőaktivitást, ami szekvenciaspecifikus módon távolítja el az RNS 3'-terminális foszfátcsoportját, (2) egy RNS-polimeráz (nukleotidil-transzferáz) aktivitást, ami az oligoribonukleotidok poliribonukleotidokká alakítását katalizálja és (3) egy szekvenciaspecifikus endoribonukleázaktivitást.

Az egyes ribozimaktivitások és a szubsztrát RNS-ek egymásra kölcsönhatást gyakorolhatnak, és ezek a kölcsönhatások jellemzőek. Így például, ha az intron csonkított formáit az 5' illesztőhelynek megfelelő szekvenciával inkubáljuk, a hely guanozintól függő hasításon megy keresztül, ugyanúgy, mint az illesztés első lépésében. A szubsztrát és az endoribonukleotid intron RNS-ek bázispárosodva P1 hélixet képeznek, és a hasítás a 4–6. helynél levő U:G bázispár után megy végbe. Filogenetikus összehasonlítások és mutációs analízisek arra utalnak, hogy az 5' illesztőhelynél levő konzervatív uracilcsoport közvetlen környezetében levő szekvenciák természete lényegtelen a katalízis szempontjából, feltéve, hogy a P1 hélix bázispárosodása megmarad [Doudna J. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 7402–7406 (1989)].

A 3' illesztőhely szekvenciája kiválasztásának követelményei főleg magában az intron szekvenciájában rejlenek, beleértve a P9.0 hélixet és az az utáni guanozincsoportot, amely a 3' intron határvonalat övezi. Amint a mutációs analízisek mutatják, a 3' exonon belüli túlnyúló szekvenciák azonban szükségesek a P10 hélix kialakulásához és a hatékony hasításhoz [Suh E. R. et al. Mol. Cell. Biol. *10*, 2960–2965 (1990)]. Emellett az intron csonkított formájának felhasználásával oligonukleotidokat és „külső" vezetőszekvenciákat és olyan oligonukleotidokat ligáltak keresztbe, amelyeket 5' guanozincsoporttal meghosszabbítottak. A 3' exonszekvenciáknak megfelelő szubsztrát oligonukleotidokat a ligálás előtt egyenként sorakoztatták fel a P10 hélixeknek egy külső templáton történő kialakításával [Doudna J. A. et al., Nature *339*, 519–522 (1989)].

A ribozimok hasítóaktivitását fajlagos RNS-ekké alakították úgy, hogy diszkrét „hibridizációs" területet vittek be a ribozimba. Az ilyen hibridizációs terület specifikusan hibiridizál a kívánt RNS-sel. Így például Gerlach W. L. et al. a 321 201 számú európai szabadalmi leírás szerint olyan ribozimot konstruáltak, amely a célzott RNS-sel komplementer szekvenciát tartalmaz. E komplementer szekvencia hosszának növelésével fokozódott ezen szekvencia célhoz való affinitása. E ribozim hibridizációs és hasítási területei azonban egymásnak integrális részei. A komplementer területeken keresztül a célzott RNS-hez való hibridizálás hatására a ribozim katalitikus területe hasítja a célzott RNS-t. A szerzők arra utalnak, hogy a ribozim hasznos lehet a

célzott RNS *in vivo* inaktiválására vagy hasítására, így például olyan humán betegségek gyógyításában, amelyekre jellemző az idegen gazdaszervezet RNS-ének termelése. A ribozim által irányított transzillesztést azonban (szemben a transzhasítással) nem ismertették vagy javasolták.

A különböző, természetben előforduló ribozimok endoribonukleázaktivitásait (hasítóaktivitásokat) széles körben tanulmányozták. Ezen ribozimok szerkezetének és szekvenciájának analízise azt mutatta, hogy a hasítási hely körüli bizonyos nukleotidok nagymértékben konzervatívak, a túlnyúló szekvenciák azonban nem annyira. Ezen információ alapján olyan új endoribonukleázaktivitásokat terveztek, amelyek nem fordulnak elő a természetben. Így például Cech és mások eltérő szubsztrátszekvencia-specifitással rendelkező új ribozimokat konstruáltak [Cech T. R. et al., WO 88/04300; Koizumi M. et al., FEBS Lett. *228*, 228–230 (1988); Koizumi M. et al., FEBS Lett. *239*, 285–288 (1988); Haseloff J. et al., Nature *334*, 585–591 (1987); Heus H. A. et al., Nucl. Acids Res. *18*, 1103–1108 (1990)]. A növényi viroidok önhasításának és a szatellit RNS-eknek a korai tanulmányozásából [Buzayan J. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83*, 8859–8862 (1986)] kifejlesztették az olyan ribozimok tervezésének elveit, amelyek más RNS-molekulákat képesek transzhasítani nagymértékben szekvenciaspecifikus módon [Haseloff J. et al., Nature *334*, 585–591 (1988)]. E konstrukciók azonban nem képesek hatékonyan katalizálni a célzott transzillesztő reakciókat.

A különálló RNS-ekben levő exonok kapcsolása, azaz a transzillesztés a természetben mind snRNP-közvetített, mind önkatalizált formában előfordul az I. és II. csoportbeli intronoknál. A tripanoszómában és a *Caenorhabditis elegans* mRNS-ekben a közös 5' vezetőszekvencia különálló génekről íródik át és illesztődik az mRNS-ek 3' részévé [Agabian N., Cell *61*, 1157–1160 (1990); Hirsch D. et al., Mol. Biol. Rep. 14, 115 (1990)]. Ezek a kis „illesztő vezető" RNS-ek (slRNS-ek) olyan szekvenciákhoz fuzionált 5' exonból állnak, amelyek funkcionálisan helyettesíthetik az U1 snRNS-t emlős snRNS-illesztő extraktumokban.

Az I. és II. csoportba tartozó önillesztő intronok szintén képesek a mesterséges rendszerekben exon transzligálására [Been M. D. et al., Cell *47*, 207–216 (1986); Galloway-Salvo J. L. et al., J. Mol. Biol. *211*, 537–549 (1990); Jacquier A. et al., Science *234*, 1099–1194 (1986); Jarrell K. A. et al., Mol. Cell Biol. *8*, 2361–2366 (1988)]. A transzillesztés *in vivo* a kloroplasztok szétvált génjeiben levő II. csoportba tartozó intronoknál fordul elő [Rohchi T. et al., Nucl. Acids Res. *16*, 10 025–10 036 (1988)], valamint *Escherichia coliban* egy mesterséges szétvált génben levő I. csoportba tartozó intronnál mutatták ki [Galloway-Salco J. L. et al., J. Mol. Biol. *211*, 537–549 (1990)]. Ez utóbbi esetben egy I. csoportba tartozó intront tartalmazó bakteriofág T4 timidilát-szintáz gént (td) választottak szét a P6a hélix intront összekötő huroknál. A td gén szegmensének transzkriptumairól kimutatták, hogy *in vitro* transzillesztésen mennek keresztül, és megmentik a diszfunkcionális E. *coli* gazdasejteket. Az ismert bázispárosodások (P3, P6 és P6a), valamint az intronszegmensek közötti lehetséges tercier kölcsönhatások lehetővé teszik a génrészek korrekt összeszerelését és processzálását.

In vitro körülmények között a *Tetrahymena* ribozim képes katalizálni a modell egyszálú oligoribonukleotid szubsztrát transzillesztését. Ehhez négy komponens szükséges: ribozim, 3' egyszálú RNS, 5' exon és GTP. Az ilyen reakciókban a Tetrahymena ribozim egy olyan rövidített formáját (L–21 Scal IVS RNS) használják, amely a belső vezető szekvenciánál kezdődik, és az U_{409}-nél végződik [Flanegan J. B. et al., J. Cell. Biochem. *12* (Supp.), D:28 rész (1988)]. A GTP támadása az 5' illesztőhelynél felszabadítja az 5' exont, amelyet azután a ribozim egy, a 3' illesztőhelynél végbemenő átészterezési reakcióban a 3' exonhoz kapcsol.

A ribozimok *in vivo* használatát antiszensz RNS helyett bizonyos RNS-ek megcélzására és elbontására a következő irodalmi helyeken javasolták: Gerlach W. L. et al., EP 321 201 számú szabadalmi leírás; Cotten M., Trends Biotechnol. 8, 174–178 (1990); Cotten M. et al., EMBO J. *8*, 3861–3866 (1989); Salver N. et al., Science *247*, 1222–1225 (1990). A HIV–1 fertőzés során kifejeződő RNS elleni katalitikus endonukleázaktivitást mutató ribozim kifejezését javasolták például a humán immunhiányos betegség vírus 1. típusa (HIV–1) által okozott fertőzés elleni potenciális kezelés céljára [Saver N. et al., Science *247*, 1222–1225 (1990); Cooper M., CDCAIDS Weekly, 1989. április 3., 2. oldal; Rossi J. J., Abstract of Grant No. 1RO1AI29329 a „Dialog's Federal Research in Progress File 265" c. kiadvány]. A kísérletek azonban nem voltak sikeresek.

Egy, a ribozimoknak a humán immunhiányos betegség vírus 1. típusa (HIV–1) által okozott fertőzés elleni terápiás szerekként való alkalmazására vonatkozó vizsgálatban a kalapácsfejminta ribozimjaival [Hitchins C. J. et al., Nucl. Acids Res. *14*, 3627 (1986); Keese P. et al., Viroids and Viroid-Like Pathogens (szerk. J. S. Semamcik), CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, 1–47. oldal] célozták meg a HIV–1 *gag* transzkriptumait. A gaggal megcélzott ribozim kifejezése humán sejttenyészetekben a HIV–1 gag RNS-szint és p24 antigénszint csökkenését (de nem a teljes eltűnését) eredményezte [Sarver N. et al., Science *247*, 1222–1225 (1990)]. A Sarver-féle ribozim gyógyhatása tehát kis hatékonysága miatt korlátozott volt, mivel minden megmenekülő patogén-RNS probléma marad a gazdaszervezet számára.

A ribozim *in vivo* alkalmazásával kapcsolatos másik probléma az, hogy a ribozim szubsztráthoz viszonyított magas aránya szükséges a ribozim sejtmagkivonatokban kifejtett gátlóhatásához, és ilyen arányokat nehéz elérni. Cotton és munkatársai magas ribozim:szubsztrát arányt értek el úgy, hogy a ribozim számára hasítóhelyet tartalmazó szubsztrát RNS-sel együtt békaoocitákba olyan expressziós kazettát mikroinjektáltak, amely egy erős tRNS promoterhez (egy polimeráz III promoterhez) működőképesen kapcsolt ribozimtermelő gént tartalmazott [Cotton M. et al., EMBO

J. *8*, 3861–3866 (1989)]. A mikroinjektálás azonban soksejtes szervezetek esetén nem a megfelelő módszer.

Az *E. coli* β-galaktozidázt kódoló mRNS ellen tervezett ribozimok *in vivo* aktivitását Chuat J. C. és munkatársai ismertették [Biochem. Biophys. Res. Commun. *162*, 1025–1029 (1989)]. Ezt az aktivitást azonban csak akkor figyelték meg, ha a ribozim és a cél ugyanazon molekulán került átfertőzésre baktériumsejtekbe. A ribozimaktivitás hatástalan volt, ha olyan mRNS ellen tervezték, amelyet egy, a β-galaktozidáz gén célzott részét tartalmazó bakteriális F episzóma ír át.

A ribozimaktivitás jelenlegi technikai alkalmazása tehát azon esetekre korlátozódik, amelyek a ribozimok hasító aktivitásának kihasználását javasolják a megcélzott RNS aktivitásának megszüntetésére. Az ilyen alkalmazásokhoz azonban a hatékonyság biztosítására gyakran az összes megcélzott RNS-molekula teljes elroncsolása és/vagy viszonylag magas ribozim:szubsztrát arány kell, és ezt nehéz elérni. A legfontosabb az, hogy a technika állása szerinti módosított ribozimok nem alkalmasak hatékony irányított transzillesztésre.

Szükség van tehát nagy hatékonyságú ribozimok és ribozim expressziós rendszerek kifejlesztésére. Különösen azért, mert a technika állása szerint nem ismert hatékony eszköz egy létező RNS-szekvencia elroncsolására vagy egy létező RNS kódolószekvenciájának megváltoztatására úgy, hogy egy új RNS-szekvenciát egy gazdaszervezet RNS-ébe transzillesztünk.

Felismertük az új ribozimok tervezésének a lehetőségét és azt, hogy nagy hatékonyságú módszerekre van szükség magasabb eukarióták genetikai jellemzőinek *in vivo* megváltoztatására, ezért kísérleteket végeztünk a natív RNS-ek genetikai információjának *in vivo* megváltoztatására ribozimok alkalmazásával. Kutatásaink során nagy hatékonyságú transzillesztő ribozimokat és ezek genetikai manipulációjának irányelveit fejlesztettük ki.

A találmány értelmében elsőként alkottunk meg olyan RNS- vagy DNS-molekulákat, amelyek transzillesztő ribozimokat kódolnak, e ribozimok képesek hatékonyan és nagy pontossággal, *in vitro* vagy *in vivo* illeszteni egy új 3' exonszekvenciát bármely kiválasztott megcélzott RNS-szekvenciába. Ezen molekulák újak abból a szempontból is, hogy képesek bármely kiválasztott megcélzott RNS vagy 3' exonszekvenciát befogadni, és emellett olyan komplementer szekvenciával rendelkeznek, amely elősegíti az ilyen ribozimok fajlagosságát.

A találmány értelmében továbbá ribozimot kódoló RNS- vagy DNS-molekulákat alkottunk, ahol a ribozim szekvenciája egy fúziós RNS, amelyben az egyik RNS-szekvencia a ribozim RNS-hez való hibridizálását biztosítja, míg a másik RNS-szekvencia alkalmas arra, hogy áthelyeződjön a megcélzott RNS-be, ahol ez a második RNS-szekvencia a megcélzott RNS számára idegen RNS-t kódol.

A találmány értelmében továbbá olyan ribozimot kódoló RNS- vagy DNS-molekulát alkottunk, amelynek a szekvenciája egy fent említett fúziós RNS, ahol az első RNS-szekvencia az ilyen RNS-molekuláknak a GAL4 RNS-hez való hibridizálását biztosító szekvencia, míg a második RNS-szekvencia a diftériatoxin A láncának (DTA) kódolószekvenciája.

A találmány értelmében továbbá olyan, megfelelő módon megszakított ribozimot, egy proribozimot kódoló RNS- vagy DNS-molekulát alkottunk, ahol a proribozim szubsztrátaktivált, azaz az ilyen proribozim nem vagy csak elhanyagolható mértékben rendelkezik önhasító vagy transzillesztő aktivitással, amíg a megcélzott RNS-sel való specifikus kölcsönhatással reaktiválva van.

A találmány értelmében továbbá RNS- vagy DNS-molekulát alkottunk, amely egy ribozim- vagy proribozimkifejező olyan kazettát tartalmaz, amely stabilan fenntartható egy gazdaszervezetben, vagy beiktatható egy gazdaszervezet genomjába, ahol a kazetta egy olyan promoter szekvenciáját tartalmazza, amely az adott gazdaszervezetben képes funkcionálni, és amely működőképesen van kapcsolva egy találmány szerinti ribozim vagy proribozim szekvenciájához.

A találmány értelmében továbbá RNS- vagy DNS-molekulát alkottunk, amely egy ribozim vagy proribozim kifejező olyan kazettát tartalmaz, amely stabilan inszertálható egy gazdaszervezet genomjába, ahol a ribozimkifejező kazetta egy GAL4-érzékeny promoter szekvenciát tartalmaz, amely a találmány szerinti ribozim vagy proribozim szekvenciájához működőképesen van kapcsolva.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy *in vitro* transzillesztő eljárást, ami abban áll, hogy (1) *in vitro* összehozunk egy találmány szerinti ribozimot vagy proribozimot és egy ilyen ribozimhoz alkalmas szubsztrátot, (2) olyan *in vitro* reakciókörülményeket biztosítunk, amelyek fokozzák az ilyen ribozim vagy proribozim katalitikus aktivitását, és (3) ilyen körülmények között reagáltatjuk a ribozimot vagy proribozimot a szubsztráttal.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy in *vivo* transzillesztő eljárást, ami abban áll, hogy (1) egy találmány szerinti RNS- vagy DNS-molekulát bejuttatunk egy gazdasejtbe, (2) a gazdasejtben a molekula által kódolt ribozimot vagy proribozimot kifejezésre juttatjuk, (3) a gazdasejtben szubsztrátot juttatunk kifejezésre a ribozim vagy proribozim számára, és (4) gazdasejtben a ribozimot vagy proribozimot reagáltatjuk a szubsztráttal.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy valamely megcélzott RNS aktivitásának megszüntetésére szolgáló eljárást, ami abban áll, hogy (1) előállítunk egy ribozimot vagy proribozimot, amely katalitikusan aktív az említett megcélzott RNS ellen, (2) összehozzuk egy említett megcélzott RNS-sel, és (3) olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik, hogy az említett ribozim vagy proribozim kifejezze katalitikus aktivitását az említett megcélzott RNS ellen.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy eljárást egy gazdasejt kívánt genetikai szekvenciával való in *vivo* ellátására, ami abban áll, hogy (1) a kívánt gazdasejtbe egy ribozimot vagy proribozimot juttatunk, amely katalitikusan aktív az említett megcélzott RNS ellen, (2) előállítunk egy ribozimot vagy proribozimot, amely a kí-

ván genetikai szekvenciát kódolja, és (3) olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik, hogy az említett ribozim vagy proribozim transzillessze a kívánt genetikai szekvenciát a megcélzott RNS-be.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy eljárást sejtek eltávolítására soksejtes növényekben és állatokban, ami abban áll, hogy egy gazdasejtbe, különösen megtermékenyített embriósejtbe bejuttatunk egy találmány szerinti olyan ribozimot vagy proribozimot, amely a gazdasejtben a kívánt cél transzillesztésére képes, és amely egy olyan gént kódol, amely toxikus a gazdasejtre.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy eljárást mezőgazdaságilag fontos növényfajták nő- vagy hímsterilitásának kialakítására, ami abban áll, hogy a találmány szerinti ribozim vagy proribozim segítségével olyan sejtet távolítunk el, amely a kívánt sterilitás eléréséhez szükséges.

A találmány értelmében továbbá kidolgoztunk egy eljárást növények növényi patogének elleni immunizálására, ami abban áll, hogy olyan transzgenikus növényeket konstruálunk, amelyek ki tudnak fejezni egy valamely növényi patogénre specifikus találmány szerinti fúziós ribozimot vagy proribozimot, amely képes bármely, a patogénnel fertőzött gazdasejt eltávolítására.

A találmány értelmében továbbá megalkottunk egy transzformált, kívánt patogénnel szemben rezisztens mikroorganizmust, amely olyan, a találmány szerinti ribozimmal vagy proribozimmal van transzformálva, amely a patogén által kifejezett nukleinsavmolekulát megcélzó katalitikus aktivitással rendelkezik.

A találmány értelmében továbbá megalkottunk egy víruspatogént, amely a kívánt ribozim- vagy proribozimaktivitást képes a kívánt gazdasejtbe juttatni, ahol a ribozim- vagy proribozimaktivitást a találmány szerinti ribozim vagy proribozim szállítja.

A mellékelt 1. ábra az I. csoportba tartozó intron ribozimmal történő illesztésének a mechanizmusát ábrázolja.

A 2. ábra (A) a *Tetrahymena thermophila* rRNS intronjának a szerkezetét; és (B) a megcélzott mRNS-t és a találmány szerinti transzillesztő ribozimot, illetve proribozimot ábrázolja.

A 3. ábra (A) egy CAT–LacZ α-peptidet transzillesztő ribozim vázlatát; és (B) a CAT–LacZ ribozim teljes DNS-kódolószekvenciáját ábrázolja.

A 4. ábra az uborka-mozaikvírus (CMV) RNS 4 transzillesztő ribozimjait ábrázolja. A: a vírus megcélzott RNS-szekvenciája; (B) oligonukleotid célszekvencia; (C) CMV RNS 4 – diftériatoxin A-lánc transzillesztő ribozim.

Az 5. ábra az uborka-mozaikvírus 3/4 szekvenciáinak az összehasonlítását ábrázolja.

A 6. ábra (A) egy Gal4 – diftériatoxin A (DTA) transzillesztő ribozim vázlatát; (B) az izoleucinhelyettesített Gal4-DTA ribozim teljes kódolószekvenciáját ábrázolja.

A 7. ábra a P-elemmel közvetített „fokozó leállítás" módszerét ábrázolja a Gal4 protein kifejezése esetén.

A 8. ábra egy vad típusú DTA és egy DTA 3' exonmutáns részleges szekvenciáját ábrázolja.

A 9. ábra a pGaTB és pGaTN térképét ábrázolja.

A 10. ábra a pUAST térképét ábrázolja.

A 11. ábra egy Gal4–DTA transzillesztő ribozimot kifejező *Drosophila*-embrió kutikulapreparátumát mutatja.

A 12. ábra a ribozim tervezésének logikai alapját mutatja. Nyilak mutatják a ribozim hasítási helyét, az „antiszensz" területeket feketével, a katalitikus területeket sötétebb árnyalással, míg a 3' „exon"-szekvenciát világosabb árnyalással jelöltük. A megcélzott mRNS hiányában a transzillesztő ribozimok átmenetileg bázispárosodhatnak, és reagálhatnak heterológ szekvenciákkal (beleértve a sajátjukat). Emellett a „3' exon"-kapcsolásnál hasadás következhet be. Olyan inaktív „proribozimokat" konstruálunk, amelyek extra önkomplementer szekvenciákat tartalmaznak, ami a ribozim katalitikus centrumának téves összehajtogatódását okozza. Aktív ribozimok csak az után képződnek, hogy bázispárosodtak a megcélozni szándékozott mRNS-sel, és így az interferáló szekunder szerkezet áthelyeződött.

A 13. ábra a CAT–LacZ transzkapcsoló ribozim szekvenciáját és kikövetkeztetett szekunder szerkezetét mutatja. A ribozim „mag"-szekvenciáit sötét betűkkel ábrázoltuk [Cech, Gene *73*, 259–271 (1989) szerint]. A P8 hélixeket a 13 és 18 nukleotidot tartalmazó nem módosított ribozim, valamint az 1. és 2. proribozim esetére ábrázoltuk, amelyek az „antiszensz" területekkel komplementer szekvenciával rendelkeznek (világos betűkkel).

A 14. ábra (A) sematikusan mutatja az „antiszensz" aktív CAT–LacZ ribozimot, P8 hélixszel és 3' „exon"-szekvenciával rendelkező ribozimterületet; és (B) egyrészt az inaktív CAT–LacZ proribozim 2-t, amely bázispárosodott a módosított P8 hélix és az „antiszensz" terület között; másrészt az aktív proribozimot, miután bázispárosodott a CAT mRNS-sel, a P8 hélix–„antiszensz" párosodás áthelyeződött, és a P8 hélix újraképződött.

A 15. ábra a CAT–LacZ proribozim transzkriptumok stabilitását mutatja. A CAT–LacZ ribozim- és proribozimszekvenciát tartalmazó plazmidokat EcoRI-gyel hasítottuk, és T7 vagy SP6 RNS-polimerázzal [^{32}P]UTP jelenlétében átírtuk. A radioaktívan jelzett transzkriptumokat 5%-os poliakrilamidgélen 7 mol/l-es karbamid és 25%-os formamid elegyében elektroforetizálva frakcionáltuk és autoradiográfáltuk. A ribozim transzkriptumok extenzív hidrolízisen mentek át, elsősorban a „3' exon" kapcsolódásnál. A proribozimformák lényegesen kevésbé voltak reaktívak.

A 16. ábra a CAT–LacZ proribozim endoribonukleázaktivitását mutatja. CAT–LacZ ribozim- és proribozimszekvenciát tartalmazó plazmidokat ScaI-gyel hasítottunk és T7 vagy SP6 RNS-polimerázzal átírtuk. A transzkriptumokat 30 percig 37 °C-on, 45 °C-on és 50 °C-on 40 mmol/l-es Tris-HCl, pH=7,5, 6 mmol/l-es $MgCl_2$, 2 mmol/l-es GTP összetételű és radioaktívan jelzett, PuvII-vel hasított plazmidról T7 RNS-polimerázzal átírt CAT RNS-t tartalmazó oldatban inkubáltuk.

A termékeket 5%-os poliakrilamidgélen 7 mol/l-es karbamid és 25%-os formamid elegyében elektroforetizálva frakcionáltuk és autoradiografáltuk. A 173 nt (nukleotid) hosszúságú CAT RNS RNS-sel közvetített hasítása 76 nt, illetve 97 nt hosszúságú 5' és 3' fragmenseket eredményezett.

A 17. ábra a proribozim tervezésére használt „vad típusú" és módosított P8 hélixeket mutatja sematikus formában a lehetséges bázispárosodásokkal. Azokat a bázisokat, amelyek a megfelelő proribozim „antiszensz" részére komplementerek, vastag betűvel jelöltük. A komplementer bázisok számát megadtuk az egyes hélixek mellett. A hélixeket a megfelelő proribozim transzkriptumok stabilitásának sorrendjében ábrázoltuk, a stabilitást az *in vitro* transzkripció során végbemenő „3' exon" hidrolízisfoka alapján mértük.

A 18. ábra a GAL4–DTA proribozim stabilitását mutatja. Ribozim- és proribozimszekvenciát tartalmazó plazmidokat XhoI-gyel linearizáltunk, és T7 RNS-polimeráz alkalmazásával átírtunk. A transzkriptumokat 60 percig 50 °C-on 40 mmol/l-es Tris-HCl, pH 7,5, 6 mmol/l-es $MgCl_2$, 2 mmol/l-es spermidin, 10 mmol/l-es NaCl, 1 mmol/l-es GTP összetételű oldatban inkubáltuk, majd 5%-os poliakrilamidgélen 7 mol/l-es karbamid és 25%-os formamid elegyében elektroforetizálva frakcionáltuk és autoradiografáltuk. A ribozimtranszkriptumokat extenzíven hidrolizáltuk, és megállapítottuk, hogy a proribozim 1 kevésbé, a proribozim 2 viszont eléggé stabil.

I. Definíciók

Leírásunkban számos olyan fogalmat használunk, amelyek a rekombináns DNS (rDNS) technika területén használatosak. A leírás és igénypontok világos és egyértelmű érthetősége érdekében a fogalmakat a következőkben definiáljuk.

Ribozim: olyan RNS-molekula, amely önmagában katalitikus aktivitással rendelkezik.

Transzillesztés: a genetikai manipuláció egy formája, amelynek során egy első polinukleotid nukleinsavszekvenciáját kolineárisan kapcsoljuk vagy inszertáljuk egy második polinukleotidszekvenciához, illetve -szekvenciába olyan módon, hogy a polinukleotidok közötti 3' –> 5' foszfodiészter-kötés megmaradjon. Az „irányított" transzillesztésen vagy „szubsztrátspecifikus" transzillesztésen olyan transzillesztési reakciót értünk, amelyhez szubsztrátként egy meghatározott RNS-re van szükség (azaz olyan RNS-re, amelybe az áthelyezendő szekvencia átilleszthető). Irányított transzillesztés több RNS-t is megcélozhat, ha a ribozim vagy proribozim úgy van megtervezve, hogy a megfelelő RNS-sorozatban jelen levő megcélzott szekvencia ellen irányuljon.

Megcélzott RNS: olyan RNS-molekula, amely a találmány szerinti ribozim vagy proribozim katalitikus aktivitása számára szubsztrát.

Expressziós kazetta: olyan genetikai szekvencia, amely a találmány szerinti ribozim vagy proribozim expressziójához szükséges szekvenciákat biztosítja.

Stabil: egy szekvencia stabil inszertálása egy genomba olyan inszertálást jelent, ami az ilyen szekvencia öröklődését eredményezi az ilyen genom kópiáiban.

Működőképes kapcsolat: olyan kapcsolat vagy kötés, amelyben a szekvencia egy (vagy több) másik szekvenciához kapcsolódik oly módon, hogy képes legyen megváltoztatni a szekvencia (vagy szekvenciák) működését. Így például, ha egy ribozimot vagy proribozimot kódolószekvenciát egy promoterhez kapcsolunk, akkor a ribozimot vagy proribozimot kódolószekvencia kifejeződése a promoter szabályozó befolyása alá kerül. Két nukleinsavszekvenciáról (például ribozimot vagy proribozimot kódoló szekvencia a kódolószekvencia és a szekvencia 5' végénél levő promoter régió szekvenciája) akkor mondjuk, hogy működőképesen vannak kapcsolva, ha az operátor funkció indukálása a ribozimot vagy proribozimot kódoló szekvencia transzkripcióját eredményezi, és ha a két szekvencia közötti kötés természete (1) nem eredményez leolvasásikeret-eltolódási mutációt, (2) nem zavarja a regulátor szekvencia ribozimkifejező képességét. Tehát egy operátor régió akkor van működőképesen kapcsolva egy nukleinsavszekvenciával, ha a promoter képes a nukleinsavszekvencia szintézisét befolyásolni.

II. A találmány szerinti ribozim előállítása

A találmány szerinti transzillesztő ribozimok, proribozimok és a találmány szerinti eljárások először teszik lehetővé, hogy olyan ribozimot alkossunk, amely irányítottan képes transzillesztődni egy RNS-szekvenciába, különösen érett (intront nem tartalmazó) mRNS-be. A találmány szerinti transzillesztő ribozim a megcélzott molekulával szemben fennálló kiterjesztett komplementeritásával nagymértékben különbözik a technika állása szerinti *T. thermophila* eredetű endoribonukleáz-aktivitásoktól. A találmány szerinti ribozim ezenfelül meglevő komplementeritása a megcélzott molekula iránti fokozott affinitást és specificitást biztosít, és a komplementeritás a katalitikus aktivitásnak nem integrális része. Emellett a hasítás denaturálószerek hiányában és Mg^{++} nagy koncentrációja jelenlétében hatékonyan és precízen megy végbe.

A fenti transzillesztő ribozimok tervezésére vonatkozó irányelvek konzervatívak, az I. csoportba tartozó önillesztő intronok jól meghatározott tulajdonságain alapulnak, és bármely irányított transzillesztő ribozim tervezésének általános vázát jelentik. Ennek megfelelően a megadott irányelvek nem csak a *T. thermophila* pre-mRNS I. csoportba tartozó intronjaira korlátozódnak.

A natív *T. thermophila* ribozim (az intronszekvencia) *a T. thermophila* extrakromoszomális rDNS alábbi szekvenciájának 53. és 456. bázispárja között helyezkedik el:

TGACGCAATT CAACCAAGCG CGGGTAAACG GCGGGAGTAA CTATGACTCT

CTAAATAGCA ATATTTACCT TTGGAGGGAA AAGTTATCAG GCATGCACCT

CCTAGCTAGT CTTTAAACCA ATAGATTGCA TCGGTTTAAA AGGCAAGACC

GTCAAATTGC GGGAAAGGGG TCAACAGCCG TTCAGTACCA AGTCTCAGGG

GAAACTTTGA CATGGCCTTG CAAAGGGTAT GGTAATAAGC TGACGGACAT

GGTCCTAACC ACGCAGCCAA GTCCTAAGTC AACAGATCTT CTGTTGATAT

GGATGCAGTT CACAGACTAA ATGTCGGTCG GGGAAGATGT ATTCTTCTCA

TAAGATATAG TCGGACCTCT CCTTAATGGG AGGTAGCGGA TGAATGGATG

CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT ATGCGAAAGT ATATTGATTA

GTTTTGGAGT ACTCGTAAGG TAGCCAAATG CCTCGTCATC TAATTAGTGA

CGCGCATGAA TGGATTA

[Kan N. C. et al., Nucl. Acids Res. *10*, 2809–2822 (1982)].

Amint korábban említettük, a találmány szerinti, irányított transzillesztő ribozimokat az intron katalitikus magjának alkalmazásával állítjuk elő. Az intron és katalitikus magja ismert módon izolálható. Az intron katalitikus magja, azaz a csonkított intron a teljes hosszúságú introntól csak abban különbözik, hogy a ScaI helynél az intron utolsó öt nukleotidja el van távolítva. A rövidített intron-RNS ismert módon előállítható, vagy készlet formájában kereskedelemben kapható, például a Biochemicals (Cleveland, OH, USA) cég 72 000 katalógusszámú terméke (RNAzyme^R Tet 1.0 kit). Ez a készlet ribozimot tartalmaz, és megadja a ribozim használatának leírását. Az átírt Tet. 1 cDNS-polimeráz láncreakció (PCR) mutagenezisszubsztrátjaként használható szintetikus transzillesztő enzim előállítására, ahogyan a későbbiekben ismertetjük.

A találmány szerinti ribozim szubsztrátspecifitása, azaz a ribozimnak azon képessége, hogy egy bizonyos RNS-t mint szubsztrátot célba vegyen, a megcélzott (szubsztrát) RNS-re fajlagos komplementer szekvenciáknak a ribozim 5' végéhez való fuzionáltatásából adódik.

A találmány szerinti ribozim irányított transzillesztő fajlagossága, azaz egy kívánt idegen szekvencia és a megcélzott RNS szekvenciája közötti transzillesztésre való fajlagosság egy új 3' exonnak a ribozim 3' végénél történő biztosításából adódik. A tervezés további részleteit alább megadjuk.

Az I. csoportba tartozó intronok szerkezetének és katalitikus tulajdonságainak megváltoztatására az ilyen intronok túlnyúló szekvenciáit exonszekvenciák helyettesítik úgy, hogy az intronnak csak a katalitikus magja, a ribozim marad meg. A kapott módosított ribozim a szubsztrát RNS-ekkel kölcsönhatásba léphet. Ha az intron csonkított formáit (azaz a katalitikus magot, azaz a ScaI helynél, az utolsó öt nukleotid eltávolításával megcsonkított intront) a natív ribozim 5' illesztő csatlakozásának megfelelő szekvenciákkal inkubáljuk, a hely az illesztés első lépésének megfelelően guanozintól függő hasításon megy keresztül.

A találmány szerinti ribozim manipulálásához a következő négy alapelvet kell meggondolni.

Először: egy hasítási helyet kell választani a megcélzott RNS-en belül. A végső transzillesztő komplexben a P1 duplexnek csak az 5' részét adja a megcélzott RNS. Csak egyetlen konzervatív maradék, az uracil szükséges közvetlenül 5' irányban a kívánt hasítási hely mellett. Ez az egyetlen szekvenciabeli szükséglet a megcélzott RNS-ben. Érett mRNS megcélozható, és a transzillesztő reakció inkább a sejt citoplazmájában megy végbe, mint a sejtmagban a pre-mRNS-sel szemben. Ez szükségtelenné teszi a nagy ribozimkoncentrációt a sejtmagban.

Másodszor: miután egy meghatározott célszekvenciát választottunk, kompenzáló szekvenciaváltozásokat kell létrehozni a ribozim 5' szekciójában, hogy alkalmas P1 hélix alakuljon ki a megcélzott és ribozim RNS-ek között. Igen kívánatos, hogy a P1 hélix U:G bázispárt tartalmazzon a hasítandó 5' helynél és a hélix bázisától a 4., (előnyösen) 5. vagy 6. helynél helyezkedjék el [Doudna J. A. et al., „RNS Structure, Not Sequence Determines The 5' Splice-Site Specificity of Group I Intron", Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 7402–7406 (1989)]. A natív *T. thermophila* intron esetén a P1 további 3 bázispárral továbbterjed az 5' hasítási helynél, és egy előnyös kiviteli formában a találmány szerinti transzillesztő ribozimban ezt fenntartjuk. Hogy a transzhatékony legyen, a szubsztrátnak és az endoribonukleotid intron RNS-eknek bázispárosodniuk kell, hogy olyan P1 hélix alakuljon ki, amely ingadozó U:G bázispárt tartalmaz. A megcélzott RNS hasítása a közvetlenül az U:G bázispár után (3' irányban) levő foszfodiészterkötésnél megy végbe. A filogenetikus összehasonlítások és mutációs analízisek azt mutatják, hogy az 5' hasítási helynél levő konzervatív uracil közvetlen környezetében levő szekvenciák lényegtelenek a katalízis szempontjából, feltételezve, hogy a P1 hélix bázispárosodása megmarad.

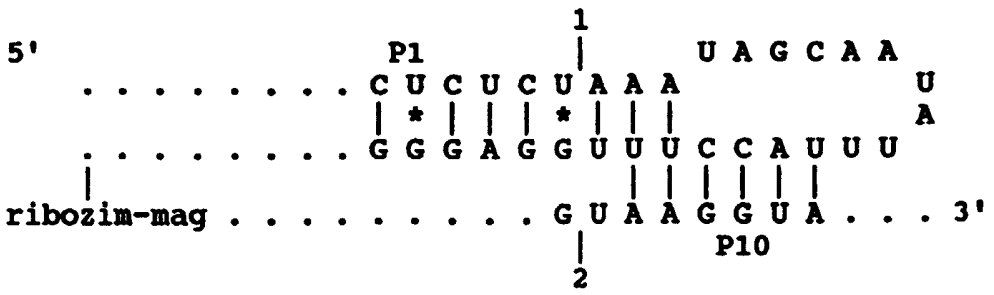
Harmadszor: meg kell választani a 3' kapcsolóhelyen túlnyúló exonszekvenciákat, és szükség esetén a ribozim 5' szekciójában igazításokat kell végrehajta-

ni, hogy stabil P10 hélix alakuljon ki. A P10 hélix szükség esetén nélkülözhető, jelenléte azonban elősegíti az illesztést, és a találmány szerinti megoldás előnyös kiviteli módjában jelen van a P10 hélix [Suh E. R. et al., „Base Pairing Between the 3' Exon and an Internal Guide Sequence Increases 3' Splice Site Specificity in the *Tetrahymena* Self-Splicing rRNA Intron", Mol. Cell. Biol. *10*, 2960–2965 (1990)]. A P1 és P10 hélixek átlapolnak a *T. thermophila* IGS intronnal, és mind az 5', mind a 3' illesztőhelyet követő 2. és 3. maradék komplementer az IGS azonos maradékaival (lásd a 2. ábrát). Ez számos előnnyel járhat, sok természetes, I. csoportba tartozó intron azonban nem mutatja ezt a tulajdonságot, így a 3' exonszekvencia kiválasztása elsősorban kísérleti megfontolásokon alapszik. E megfontolások az illesztőhely kiválasztásának rugalmas voltát mutatják. Így például, ha két szekvenciának egy adott pontnál való kapcsolása kívánatos, az ilyen pontnál levő szekvencia nem mutálható vagy módosítható más módon transzillesztéssel. Akár a P1, akár a P10 megrövidíthető, ha az átfedő szekvenciák másképpen nem járulnak hozzá a kívánt illesztőhelyhez.

Úgy tűnik, hogy a 3' illesztőhely kiválasztásának követelményei főleg magában az intron (ribozim) szerkezetében rejlenek, beleértve a P9.0 hélixet és a kapcsolódó guanozinmaradékot, amely a 3' intronhatárt megadja. A P9. 0 teljes mértékben az intronszekvenciákban van, és segít meghatározni a szomszédos 3' illesztőhelyet. A transzillesztés megtervezéséhez a P9.0 hélix és az intronon belüli funkcionális RNS-elemek maradéka nem változik. A P9.0 hélix szerkezeti jellemzői ismertek [Michel F. et al., „The Guanozine Binding Site of the Tetrahymena Ribozyme", Nature *342*, 391–395 (1989)]. A P10 hélix kialakulásához és a hatékony illesztéshez azonban túlnyúló szekvenciákra van szükség a 3' exonban, amint ezt a mutációs analízis mutatja.

Negyedszer: egy komplementer szekvenciával rendelkező régiót helyezünk a transzillesztő ribozim 5' terminálisához a megcélzott RNS iránti affinitása és specificitása fokozása érdekében. Amint a későbbiekben látható, önkényesen körülbelül 40 maradék hosszúságot használtunk. Ettől eltérő hossz is használható, feltételezve, hogy ez nem káros a kívánt hatásra nézve.

Így például az alábbi T. *thermophila* önillesztő intronból kiindulva:



(a fenti diagramban – és a leírásban található további ribozimdiagramokban – „1" és „2" az első, illetve második illesztőhelyet jelöli)

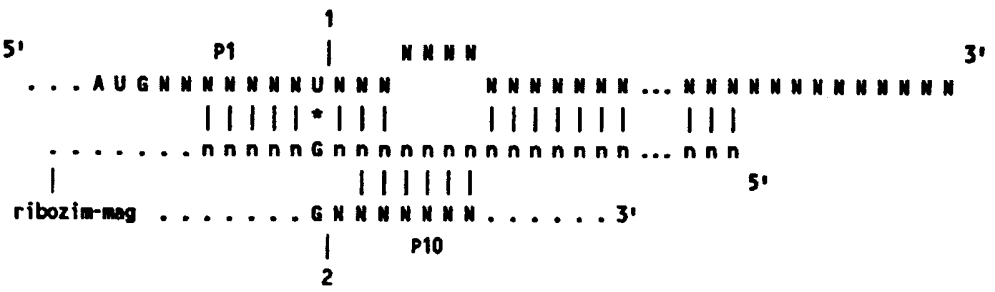
(1) az „5'" helyet egy, a kiválasztott megcélzott RNS-en belüli uracilmaradék szomszédságában választjuk. A komplementeritás szempontjából figyelembe vett szekvenciák nem közvetlenül azok, amelyek a P1 hélixképződésben részt vesznek, hanem például 5 nukleotiddal el vannak választva, amelyek szintén részt vesznek a P10 képződésében;

(2) a kiválasztott RNS-re komplementer szekvenciák fuzionálva vannak az I. csoportba tartozó, önillesztő intron 5' végéhez. A ribozim és a megcélzott RNS közötti bázispárosodás lehetővé teszi P1 hélix kialakulását;

(3) a kiválasztott „3' exon" szekvenciák fuzionálva vannak a ribozim 3' részéhez, megtartva a konzervatív P10 hélixet; és

(4) a megcélzott RNS affinitásának fokozására kívánt esetben a kiterjesztett szekvenciakomplementeritás egy szekciója fuzionáltatva van a ribozim 5' részéhez, ami lehetővé teszi 30–40 bázispár kialakulását.

A kapott transzillesztő ribozimnak a megcélzott RNS-hez való igazodását az alábbiakban mutatjuk be. A megcélzott RNS-szekvenciát a felső sorban ábrázoltuk. A ribozimszekvencia alatta látható, ahol az 5' és 3' végeknél levő nukleotidok hibridizációja és a ribozim P1 és P10 hélixe látható.



A találmány értelmében olyan transzillesztő ribozimok tervezhetők, amelyek lényegében véve bármely RNS-szekvenciát képesek transzilleszteni a megcélzott RNS-re. Nem szükséges, hogy a megcélzott molekula tartalmazzon intronszekvenciát, vagy hogy a ribozim egy intron legyen a megcélzott szekvenciában. A tervezéshez a stratégia magában foglalhatja (1) a kívánt megcélzott RNS azonosítását, (2) a kívánt megcélzott RNS vagy egy része klónozását és/vagy szekvenálását, (3) egy kívánt kódolószekvencia kiválasztását a megcélzott RNS-be való transzillesztéshez, (4) a találmány szerinti, megcélzott molekulával hibridizálódni képes ribozim konstruálását a fenti elvek szerint, (5) annak igazolását, hogy a találmány szerinti ribozim szubsztrátként hasznosítani fogja a megcélzott molekulát a kívánt fajlagos transzillesztő reakcióban és (6) a ribozim inszertálását a kívánt gazdasejtbe.

A megcélzott RNS kiválasztása rávilágít a transzillesztő reakció kívánt céljára. Ha a reakció célja egy bizonyos RNS inaktiválása, akkor az ilyen RNS-t egy olyan helynél kell transzilleszteni, ami az ilyen RNS által kódolt minden funkcionális peptid domént elront, és egy olyan helynél, ami nem eredményezi a nem kívánt genetikai szekvencia folyamatos kifejeződését. Ha az ilyen RNS-t kódoló génnek több allélje létezik, a ribozimot előnyösen úgy tervezzük, hogy a megcélzott RNS-t olyan helynél inaktiválja, amely az összes kifejezett formánál közös. Eljárhatunk úgy is, hogy több ribozimot juttatunk a sejtbe, amelyek mindegyike úgy van megtervezve, hogy a megcélzott RNS-nek egy bizonyos allél formáját inaktiválja.

Ha a megcélzott RNS-t csak inaktiválni és nem egy új, kívánt RNS-szekvencia kifejeződését akarjuk, nem szükséges, hogy a ribozim által adott idegen RNS olyan szekvenciát vigyen be, amely transzlatálható a gazdasejt által, és olyan szekvencia, amely transzlációs stopkodonokat tartalmaz, csonkított intronként, például olyan intronribozimként alkalmazható, amely a ScaI helynél van csonkítva.

Ha a transzillesztő reakció célja az, hogy egy gazdasejtet egy genetikai jellemzővel lássunk el, akkor a megcélzott RNS kiválasztása a genetikai jellemző kívánt expressziós mintájára fog rávilágítani. Ha az kívánatos, hogy a gazdaszervezet a genetikai jellemzőt folyamatosan fejezze ki, akkor a megcélzott RNS-nek szintén folyamatosan kell kifejeződnie. Ha az kívánatos, hogy a genetikai jellemző szelektív módon fejeződjön ki kívánt növekedési, hormonális vagy környezeti körülmények között, akkor a megcélzott RNS-nek szintén szelektív módon kell kifejeződnie ilyen körülmények között.

Nem szükséges, hogy magának a ribozimnak a kifejeződése kívánt növekedési, hormonális vagy környezeti körülményekre szelektív módon korlátozott legyen, ha az ilyen ribozim szubsztrátja amúgy sincs jelen a gazdaszervezetben, mivel a ribozimot magát nem transzlatálja a gazdaszervezet. Így a találmány szerinti ribozim által adott RNS-sel kódolt szekvenciák addig nem transzlatálódnak egy gazdaszervezetben, amíg a transzillesztés meg nem történik, és az ilyen eseményt a gazdaszervezetben levő ribozimszubsztrát kifejeződése szabályozhatja.

Kívánt esetben a ribozim kifejeződését úgy manipulálhatjuk, hogy ugyanazokra a faktorokra való válaszként következzék be, mint amelyek egy szabályozott megcélzott molekula kifejeződését indukálják, vagy manipulálhatjuk úgy, hogy a szabályozás egy másik szintje legyen jelen, ami a transzillesztési eseményt azokra a körülményekre korlátozza, amelyek között a sejtben mind a ribozim, mind a megcélzott molekula szelektív módon, de különböző faktorok által indukálódik, ahol a faktorok kombinációja a nem kívánt esemény. Az ilyen szabályozás lehetővé teszi, hogy a gazdaszervezet a ribozim által megcélzott molekulát olyan körülmények között fejezze ki, amelyek között maga a ribozim nem fejeződik ki.

A ribozim doménjének azt a szekvenciáját, amely a megcélzott RNS-sel hibiridizálódik, a megcélzott RNS szekvenciája határozza meg. A megcélzott RNS szekvenciáját az ilyen RNS-t kódolószekvenciák klónozása után vagy a megcélzott RNS által kódolt peptid szekvenálása után határozzuk meg, a peptid szekvenciájából kikövetkeztetve a kódoló RNS szekvenciáját. A megcélzott RNS kódolószekvenciájának klónozására a technika állása szerint ismert klónozó módszerek alkalmazhatók.

Egy kívánt, a megcélzott RNS-be transzillesztendő szekvencia (a továbbiakban: „transzillesztett szekvencia") kiválasztása rávilágít a transzillesztés céljára. Ha olyan transzillesztés kívánatos, ami nem eredményezi új genetikai szekvencia kifejeződését, akkor a transzillesztett szekvenciának nem kell transzlatálható proteinszekvenciát kódolnia. Ha olyan transzillesztés kívánatos, ami nem eredményezi új genetikai szekvencia, különösen új peptid- vagy proteinszekvencia kifejeződését, akkor a transzillesztett szekvencia tartalmazhat még transzlációs vagy stopkodonokat és más olyan információkat, amelyek az RNS korrekt transzlációs feldolgozásához kellenek a gazdasejtben. Ha a transzillesztés eredményeképpen egy bizonyos proteintermék kívánatos, akkor szükség lehet arra, hogy a kialakult fúzióban az aminosavleolvasási keretet megtartsuk.

A találmány szerinti ribozim fajlagosságának azonosítását és igazolását úgy végezzük, hogy a feltételezett ribozim képességét megvizsgáljuk arra nézve, hogy a kívánt transzillesztő reakciót csak a kívánt megcélzott szekvencia jelenlétében katalizálja-e. A transzillesztő reakciónak nem szabad végbemennie, ha csak nem megcélzott RNS-szekvenciák vannak jelen, amelyekre a ribozim nem (vagy csak kevésbé) válaszol. A jellemzést egy marker segítségével végezhetjük úgy, hogy a korrekt (vagy inkorrekt) ribozimaktivitás könnyebben megfigyelhető. A legtöbb esetben elégséges, ha a ribozimot a megcélozni szándékolt molekulával *in vitro* teszteljük, majd egy gazdasejtet transzformálunk vele *in vivo* hatásainak tanulmányozására.

Ha az a kívánatos, hogy a gazdaszervezet egy RNS-ét eliminálju k, ennek a lehető legteljesebbnek kell lennie. Ha az a kívánatos, hogy a gazdaszervezet számára egy új genetikai szekvenciát biztosítsunk, a találmány szerinti transzillesztő reakciónak nem kell teljesnek lennie. A találmány szerinti megoldásnak előnye,

hogy az ilyen genetikai szekvenciáról transzlatált peptid biológiai aktivitásától függően a valóságosan végbemenő transzillesztés egészen különböző lehet mindaddig, míg elegendő mRNS-t és így a gazdaszervezet számára kívánt célnak megfelelő kódolt polipeptidet biztosító transzillesztés végbemegy.

A találmány szerinti ribozim transzkripciója egy gazdasejtben az után következik be, hogy a ribozimgént a gazdasejtbe bejuttattuk. Ha a ribozim stabil fenntartása a gazdasejtben nemkívánatos, ez a ribozim kémiai vagy enzimatikus úton szintetizálható, és a sejtbe mechanikai úton, például mikroinjektálással, liposzómaközvetítette transzfekcióval, elektroporációval vagy kalcium-foszfátos kicsapással bejuttatható. Ha a ribozimot kódoló gén stabil fenntartása kívánatos, ez úgy is elérhető, ha stabilan inszertálunk legalább egy DNS-másolatot a gazdaszervezet kromoszómájába, vagy ha a ribozim egy DNS-másolatát egy olyan plazmidon juttatjuk be a gazdaszervezetbe, amely ott stabilan fennmarad.

A találmány szerinti ribozimot a gazdaszervezet kromoszómájába előnyösen egy olyan expressziós kazetta részeként inszertáljuk, amely a ribozim gazdasejtben való transzkripcióját szabályozó transzkripciós regulátor elemeket tartalmaz. Ilyen elemek lehetnek például egy promoter, fokozó vagy UAS-elem és egy transzkripciós terminátor szignál. Poliadenilezésre nincs szükség, mivel a ribozim nem transzlatálódik. Poliadenilezési szignál azonban jelen lehet a transzillesztendő elemet kódolószekvenciával kapcsolatban.

Az olyan ribozim kifejeződését, amelynek a kódolószekvenciája stabilan van inszertálva egy gazdaszervezet kromoszómájába, a ribozim kódolószekvenciájával működőképesen kapcsolt promoterszekvencia szabályozza. A ribozim kifejeződését irányító promoter bármely, a gazdasejtben funkcionáló promoter lehet, prokariótasejtekben prokarióta promoterek, míg eukariótasejtekben eukarióta promoterek kívánatosak. A promoterek olyan diszkrét modulokból állnak, amelyek a transzkripciós aktiválást és/vagy a promoter represszióját irányítják a gazdasejtben. Az ilyen modulok elegyíthetők és összeházasíthatók a ribozim promoterében úgy, hogy a ribozim megfelelően fejeződjék ki a gazdaszervezetben. Eukarióta promoterként bármely, az eukariótasejtekben funkcionáló promotert alkalmazhatunk, különösen az RNS-polimeráz I, II vagy III specifitás valamelyikét. Ha a ribozimot sokféle eukariótasejtben kívánjuk kifejezni, olyan promotert kell választani, amely a legtöbb eukariótasejtben funkcióképes, ilyen például az rRNS és a tRNS promoter, vagy sokféleképpen kifejeződő mRNS promoterét, például egy aktin gén vagy glikolitikus gén promoterét. Ha a ribozimot csak bizonyos sejtben vagy szövetben kívánjuk kifejezni, csak ilyen sejtben vagy szövetben funkcióképes, sejtspecifikus (vagy szövetspecifikus) promoter elemeket kell választani.

A transzillesztő reakció kémiailag azonos, attól függetlenül, hogy in *vivo* vagy *in vitro* megy végbe. Az *in vivo* transzillesztő reakció azonban a megcélzott molekula és a ribozim jelenlétében sikeresen végbemegy, mivel a gazdasejtben rendszerint vannak jelen kofaktorok.

A transzillesztő ribozimok és a találmány szerinti módszerek olyan génaktivitás termelésére használhatók, amelyek a megcélzott sejt genetikai módosítására és/vagy elpusztítására alkalmazhatók. Így például a találmány szerinti transzillesztő reakció alkalmazható arra, hogy toxikus proteineket juttassunk be egy kívánt sejtbe. A sejtek érzékenységét a megcélzott RNS és a ribozim kifejeződését szabályozó elemek megválasztásával határozzuk meg. Így például egy olyan ribozimot, amely egy toxikus proteint kódoló RNS-szekvenciát helyez át, úgy lehet manipulálni, hogy a ribozim kifejeződése egy működőképesen kapcsolt promoter jellemzőitől függjön. A találmány szerinti megoldás egy előnyös kiviteli alakja esetén a diftériatoxin A peptidet a ribozimnak az a része kódolja, amelyet a gazdaszervezetben egy kívánt megcélzott molekulára áthelyezünk. A ribozim és a diftériatoxin peptid A lánc feltételes kifejeződése a gazdasejt pusztulását eredményezi. Más alkalmazható peptidtoxinok például a ricin, exotoxin A és herpesz-timidin-kináz [Evans G. A., Genes & Dev. *3*, 259–263 (1989)]. Emellett a különböző litikus enzimek szintén képesek a sejtmetabolizmust megzavarni. Így például a gombaribonukleáz alkalmazható a növényekben hímsterilitás kialakítására [Mariani C. et al., Nature, *347*, 737–741 (1990)]. Bizonyos szövetek elroncsolhatók a megcélzott RNS korlátozott kifejeződése következtében. Ezenkívül, ha megcélzott molekulaként vírus-RNS-t alkalmazunk, a vírusrezisztencia új formája, illetve terápiás módszerek alakíthatók ki.

Szövetspecifikus génexpresszió szabályozására és/vagy ektópiás eltávolításra szolgáló biner rendszer tervezhető a találmány szerinti ribozim felhasználásával. Így például alkalmazhatók olyan *Drosophila* vonalak, amelyek egy szövetben kifejezik a GAL4 élesztő transzkripciós aktivátort, valamint P-elem-fokozó befogóvektorokat hasznosító térspecifikus mintázatok. A GAL4 helyett bármilyen transzkripciós aktivátor alkalmazható, a találmányt nem kívánjuk a GAL4-re korlátozni. A DTA-szekvencia transzillesztésére képes fúziós ribozimot kódoló gén a GAL4–UAS szabályozása alá helyezhető és genetikailag stabil módon inszertálható *Drosophilába*. Az ilyen ribozim GAL4 hiányában nem fog kifejeződni *Drosophilában*. Ennek megfelelően, ha egy, az ilyen ribozimkonstrukciót genetikailag hordozó *Drosophila* gazdaszervezetet egy, a GAL4-et szövetspecifikus módon kifejező *Drosophila* gazdaszervezettel keresztezünk, olyan utódot kapunk, amely GAL4 kifejeződésének indukálására a sejtpusztulás olyan lefolyását mutatja, ami hasonló a GAL4 kifejeződés lefolyásához.

Emellett, ha a ribozimmal a GAL4 mRNS transzillesztését célozzuk meg, a ribozim kapcsolóaktivitása inaktiválja a GAL4 kifejeződését, és a ribozim kifejeződése önszabályozó lehet.

Proribozimok

A fentiekben ismertetett transzillesztő ribozim három fuzionált szekvenciaelemből áll: egy 5' „antiszensz" területből, amely komplementer a megcélzott RNS-sel; a katalitikus területből, amely egy önillesztő, I. csoportbeli intronon alapszik; és 3' „exon" szekven-

ciákból. Az 5' terület képes bázispárosodni a kiválasztott megcélzott RNS-sel, hogy az I. csoportbeli intron katalitikus szekvenciájának közelébe hozza. Az I. csoportbeli intron szerkezete olyan kémiai környezetet biztosít, ami a megcélzott RNS-nek a 3' „exon"-szekvenciákkal való pontos kapcsolása katalizálásához alkalmas. A megfelelő megcélzott RNS hiányában azonban a ribozimszekvenciák a 3' „exon"-kapcsolódásoknál történő hasítást katalizálhatják {hasonló hidrolízis látható az I. csoportbeli önillesztő intronoknál [Zaug et al., Science *231*, 470–475 (1986)]}, és a ribozim és heterológ RNS-szekvenciák (esetleg a sajátjukat is beleértve) átmeneti bázispárosodásán keresztül szabálytalan illesztéseket katalizálhatnak. Az ilyen mellékreakciók és szabálytalan illesztések nemkívánatosak és károsak lehetnek. Így például, ha egy toxin *in vivo* feltételes szállítására transzillesztést alkalmazunk, a szabálytalan transzillesztés a toxinaktivitás nemkívánatos kifejeződését eredményezheti. A 3' „exon"-kapcsolódás spontán hasítása csökkentheti a transzillesztés hatékonyságát.

E problémák elkerülése érdekében a transzillesztő RNS-ek „proribozim" formáját konstruáltuk meg, ahol például a P8 hélixet megszakítjuk. A proribozimokat úgy konstruáltuk, hogy extra önkomplementer szekvenciákat tartalmazzanak, amelyek a ribozim katalitikus központjának a téves hajtogatódását eredményezik. A proribozimok a megcélozni szándékozott RNS hiányában inaktívak; az aktív formák csak a ribozim és a megcélzott RNS-ek bázispárosodása után képződnek, ami a ribozimban a zavaró szekunder szerkezetek kiszorítását eredményezi. A proribozimok a megcélzott RNS hiányában katalitikusan inertek, a nemkívánatos önhasítást, önillesztést és szabálytalan transzillesztő reakciókat *in vivo* és *in vitro* megakadályozzák (lásd 12. ábra).

Az ismertetett proribozimok egyformán meg vannak szakítva, így a transzillesztő aktivitás inaktív formáját képviselik. Így a proribozimok csekély önhasító aktivitással rendelkeznek. Csak a megcélzott RNS-sel való specifikus kölcsönhatásuk következtében reaktiválódnak, és így ezek szubsztrátaktivált ribozimok, amelyek kevésbé katalizálják a transzillesztést egy megcélozni nem szándékozott RNS-re. transzillesztő ribozimok új génaktivitások *in vivo* szállítására vannak szánva, és a nem kívánt mellékreakciók és szabálytalan illesztések előfordulásának minden csökkentése kívánatos és szükséges lehet.

Példaképpen a P8 hélix megszakítását mutatjuk be transzillesztő proribozimként, azonban a katalitikus aktivitáshoz szükséges bármilyen más hélixek is alkalmazhatók.

Ugyanilyen megközelítés alkalmazható más ribozimok tervezésénél is, azaz egy katalitikus szempontból fontos szerkezet konformitásának a megszakítása olyan módon, hogy csak egy szándékolt szubsztrát RNS-sel való bázispárosodás állítsa helyre az aktív ribozim képződését. Így például egy „kalapácsfej" típusú endoribonukleáz hurokszekvenciája [Haseloff et al., Nature *334*, 585–591 (1988)] kiterjeszthető és komplementerré tehető a ribozim egyik „antiszensz" karjával – a P8 hélix fent ismertetett módosításához hasonlóan. Az endoribonukleázaktivitás csak a kiválasztott megcélzott RNS-sel való bázispárosodás, a megszakító szekunder szerkezet áthelyeződése és a katalízishez szükséges őshurokszerkezet újraképződése után mutatkozik meg. Ez hatékonyan növelné a ribozimnak a megcélzott molekulája iránti specificitását.

Emellett egy proribozim aktiválásának nem kell a szubsztráttal való bázispárosodáson alapulnia. Ehelyett az aktivitáshoz egy kiválasztott harmadik RNS vagy ssDNS, sőt egy protein lehet szükséges. Egy további bázispárosodás vagy RNS-protein kölcsönhatás lehet szükséges egy aktív ribozimkomplex képződéséhez. Ilyen további komponensek hozzáférhetősége meghatározza a ribozim aktivitását, és ezek alkalmazhatók a ribozim szelektivitásának megváltoztatására.

A találmány szerinti ribozim vagy proribozim egy gazdasejtbe, prokarióta vagy eukarióta, különösen növényi vagy emlősgazdasejtbe, még közelebbről humán sejtbe vezethető be, tenyészetben vagy *in vivo*, az illető gazdasejtnek megfelelően, ismert módon. A találmány szerinti ribozimok úgy is manipulálhatók, hogy vírusok elpusztítására legyenek alkalmasak. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti ribozimot vagy proribozimot genetikailag stabil módon biztosítjuk egy gazdasejt számára egy vírustámadás előtt. A megfelelő vírussal való fertőzés vagy a latens vírus kifejeződése az ilyen gazdasejtben (ami a ribozim vagy proribozim megcélzott RNS-ének megjelenését eredményezi a gazdasejtben) a ribozim katalitikus aktivitását, és a megcélzott vírus-RNS elroncsolását és/vagy egy toxin termelését stimulálja transzkapcsoláson keresztül, ami a vírussal fertőzött sejt pusztulását eredményezi. Egy másik megvalósítási mód szerint a ribozim vagy proribozim manipulálható és pakolható magába a vírusba. Az ilyen megvalósítási mód különösen kutatási célra tervezett vírusok esetén lehet hasznos, ahol a ribozimot vagy proribozimot arra tervezzük, hogy egy bizonyos vírus RNS-funkcióját roncsolja el, és így az RNS hiányában tanulmányozható legyen a vírusfunkció. Ribozimokat hordozó vírusok alkalmazhatók hordozóként gazdasejtek kívánt ribozim- vagy proribozimaktivitással való átfertőzésére.

Hím- vagy nősterilitás hozható létre mezőgazdaságilag fontos fajokban a találmány szerinti ribozimok vagy proribozimok segítségével. Így például dohányban hímsterilitás hozható létre úgy, hogy a TA29 vagy TA13 mRNS-t [tobacco anther-specific genes=dohány-hímpor-specifikus gén; Seurinck J. et al., Nucl. Acids Res. *18*, 3403 (1990)] találmány szerinti ribozim vagy proribozim segítségével célozunk meg, amely a DTA 3' exont transzilleszti a megcélzott molekulákba.

Termesztett növények formája manipulálható oly módon, hogy szöveteket szelektív módon roncsolunk el vagy módosítunk a találmány szerinti ribozimok vagy proribozimok segítségével. Így például mag nélküli gyümölcsök hozhatók létre a mag raktározófehérje mRNS-ének találmány szerinti ribozimmal vagy proribozimmal történő megcélzása útján, amely a DTA 3' exont transzilleszti a megcélzott molekulákba.

Transzgenikus növények megvédhetők fertőzésekkel szemben vírusspecifikus ribozimok vagy proribozimok kifejezésével a megfertőzött sejt elpusztítása céljából. Ez a „hiperszenzitív válasz" mesterséges formája. Így például uborka-mozaikvírus burokfehérje mRNS megcélozható a találmány szerinti ribozimmal vagy proribozimmal, amely a DTA 3' exont transzlleszti a megcélzott molekulákba.

Mikroorganizmuspopulációk rezisztenssé tehetők bizonyos patogénekkel szemben a találmány szerinti ribozimok vagy proribozimok bejuttatásával. Így például sajtgyártó baktériumok rezisztenssé tehetők fágfertőzéssel szemben úgy, hogy a fág-RNS-t egy baktériumtoxin-génnel vagy egy lítikus enzimet kódoló 3' exonnal célozzuk meg, amelyeket a találmány szerinti ribozim vagy proribozim biztosít, amely a fertőzés után korai lízist okozva megzavarja a fág replikációját.

Víruspatogének konstruálhatók úgy, hogy a transzillesztés által toxikus aktivitást szállítsanak. Ily módon bizonyos sejttípusok célozhatók meg eltávolítás, így például rák- vagy vírusterápia céljából. Így például HIV-mRNS célozható meg a találmány szerinti ribozimmal vagy proribozimmal, amely a DTA 3' exont hordozza vírus vagy liposzóma szállítása céljából.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

CAT–LacZ-transzillesztő ribozim konstruálása és jellemzése

I. *A találmány szerinti ribozim PCR amplifikálása és klónozása*

A fenti irányelveket követve egy transzillesztő fúziós ribozimot terveztünk, amely az *E. coli* β-galaktozidáz (LacZ) mRNS aminoterminális kódolószekvenciájának egy részét egy, a kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT) mRNS-ben levő helyre transzlleszti (1. 3. ábra). A *T. thermophila* ribozimmag túlnyúló új szekvenciájának a szekcióját és a 3' exont oligonukleotidként szintetizáltuk. Az érintetlen ribozimszekvenciát ezután egymás utáni polimeráz láncreakciókkal szereltük össze, a szintetikus adaptor oligonukleotidokat használva primerként ribozim és β-galaktozidáz DNS-templátokkal (más módszerek is léteznek, de ez a legkényelmesebb).

Olyan ribozim konstruálására, amely képes a β-galaktozidáz (LacZ) α-peptidet kódoló szekvenciát egy, a kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT) 5' kódolószekvenciájában levő helyre illeszteni, három oligonukleotidot szintetizáltunk.

1. oligonukleotid:

5'-GGCCA AGCTT CTTTA CGATG CCATT GGGAT ATATC AACGG TGGTA TAAAC CCGTG GTTTT TAAAA GTTAT CAGGC ATGCA CC-3' (2. szekvencia)

2. oligonukleotid:

5'-GATTA GTTTT GGAGT ACTCG TACGG ATTCA CGGCC GTCGT TTTAC AA-3' (3. szekvencia)

3. oligonukleotid:

5'-GGCCG AATTC TTACA ATTTC CATTC AGGCT GCGCA ACTGT TGG-3' (4. szekvencia)

200 pmol 2. oligonukleotidhoz és 200 pmol 3. oligonukleotidhoz hozzáadtunk 0,1 μg PvuII-vel hasított pGEM DNS-t (amely LacZ α-peptid-szekvenciát tartalmazott), és az elegyet 100 μl következő összetételű oldatban PCR-amplifikálásnak vetettük alá:

50 mmol/l KCl,
10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3,
1,5 mmol/l $MgCl_2$,
0,4 mmol/l dNTP-k,
0,1% zselatin és
5 egység TaqI DNS-polimeráz,

és az elegyet a következő ciklus 30-szor történő ismétlésével inkubáltuk: 1 percig 94 °C-on, 2 percig 50 °C-on és 2 percig 72 °C-on.

A pGEM4 plazmid kereskedelmileg kapható Promega Corporation cégtől (Madison WI, USA).

A 210 bázispár hosszúságú amplifikált terméket alacsony gélesítési hőmérsékletű agarózon elektroforézissel tisztítottuk, és egy második PCR-amplifikálási körben primerként használtuk.

A PCR-amplifikálás második köre után 2,0 μg 210 bázispár hosszúságú amplifikált terméket, 200 pmol 1. oligonukleotidot és 0,1 μg 450 bázispár hosszúságú, *a T. termophila* IVS-t tartalmazó fragmenst összekevertünk, és PCR-amplifikálásnak vetettünk alá a fenti körülmények között. A kapott 660 bázispár hosszúságú terméket EcoRI és HindIII restrikciós endonukleázzal emésztettük, és pGEM4 plazmidvektorba klónoztuk. A CAT–LacZ α-peptidribozim DNS teljes szekvenciáját az 5. szekvencia és a 3B. ábra mutatja.

A klónozott szekvenciákat tartalmazó klónozóvektorokat ismert módon [Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Guide, 2. kiadás, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory kiadó] XL1/Blue baktérium gazdaszervezetbe (Stratagene, La Jolla, California) transzformáltuk és ott szaporítottuk. Más, a vektort stabilan megtartó baktérium-gazdaszervezet is használható azonban, így például JM109.

A gazdasejtből a plazmid további elemzésre ismert módon extrahálható (Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Guide, 2. kiadás, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory kiadó).

II. *A klónozott ribozim és megcélzott RNS-ek in vitro transzkripciója*

A klónozott szekvenciákat ismert módon tisztítottuk a baktérium-gazdaszervezetből, és a plazmidot olyan restrikciós endonukleázokkal linearizáltuk, amelyek nem hasítják a ribozimszekvenciát (például EcoRI), és T7 RNS-polimerázzal 100 μl következő összetételű oldatban transzkriptáltuk:

5 μg linearizált plazmid DNS,
40 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5,
6 mmol/l $MgCl_2$,
2 mmol/l spermidin,
10 mmol/l NaCl,
10 mmol/l DTT,

1 mmol/l NTP-k (ahol jelzett RNS-re volt szükség,
20 μCi [α-^{32}P]UTP-tartalommal),
100 egység RN-ázin,
50 egység RNS-polimeráz.

A reakcióelegyet 37 °C-on 2 óra hosszat inkubáltuk.

Az RNS-transzkriptumokat 5%-os poliakrilamidgél-elektroforézissel tisztítottuk 7 mol/l karbamidtartalmú TBE gél használatával. Az aktív *T. thermophila* IVA szekvenciákat tartalmazó RNS-ek a transzkripció során a 3' intron-exon kapcsolódásnál néhány spontán hasadáson mennek keresztül. A fragmenseket elektroforetikus tisztítással eltávolítjuk a későbbi transzkapcsoló vizsgálatokban végzett elemzés egyértelművé tétele érdekében.

III. *In vitro transzillesztő reakciókörülményei*

A megcélzott és/vagy transzillesztő ribozimokat a következő körülmények között inkubáltuk:

0,1–0,5 μg RNS-komponens (a mennyiség a kísérlet típusától függ, a ribozim rendszerint a megcélzott molekulának ötszöröse),
30 mmol/l Tris–HCl, pH 7,5,
100 mmol/l NaCl,
2 mmol/l GTP,
5 mmol/l $MgCl_2$,
5 μl-ben, 40 °C-on, 60 percig.

A reakcióelegyet 95 μl 0,1 mmol/l Na_2EDTA, 200 mmol/l NaCl összetételű oldattal hígítottuk és etanollal kicsaptuk. Az RNS-eket ez után TBE-puffert, 7 mol/l karbamidot és 25% formamidot tartalmazó 5%-os poliakrilamidgélen autoradiográfiásan elemeztük.

IV. *Endonukleázaktivitás vizsgálata*

A ribozim és a megcélzott molekula bázispárosodása után a transzillesztés első lépése a megcélzott RNS szándékozott 5' kapcsolóhelynél végbemenő, guanozin által közvetített hasítása. Az összeolvasztás és a transzillesztés például egy 30 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l $MgCl_2$, 2 mmol/l GTP összetételű pufferben, 42 °C-on végezhető. Mivel a 3' illesztőhely nélkülözhető e reakció szempontjából, a megcsonkított transzillesztő ribozimoknak nagy specificitású endoribonukleázokként kell viselkedniük. Ezen aktivitás tesztelése érdekében a fent ismertetett (5. szekvencia és 3. ábra) CAT–LacZ α-peptid transzillesztő ribozim megrövidített *in vitro* transzkriptumait CAT mRNS-szekvenciákkal inkubáltuk. A CAT–LacZ ribozim kazetta egy HindIII–EcoRI fragmensen helyezkedik el. A ScaI hasítási hely egy, a 3' illesztőhelytől 5 bázissal fölfelé elhelyezkedő helyzetet jelöl. A ribozim specifikusan hasította a megcélzott RNS-t a kívánt helynél, és a kívánt méretű fragmensek képződtek.

V. *Transzillesztő reakció*

A CAT–LacZ α-peptid ribozim azon képességének igazolására, hogy katalizálja a 3' exonszekvenciák ligálását az 5' illesztőhelyhez, különböző formákat inkubáltunk radioaktívan jelzett CAT RNS-ekkel. Ribozim transzkriptumokat szintetizáltunk DNS-templátokról, amelyeket a ribozim magjának a végétől kezdődő és az exonszekvenciáig terjedő, különböző helyzetek valamelyikében a 3' végen csonkítottunk. A jelzett CAT-tal végzett inkubálással a kívánt illesztési termékeket kaptuk, amelyek a 3' exonszekvencia kiterjedésétől függően eltérő hosszúságúak voltak.

Emellett az *in vitro* transzkripció során a CAT–LacZ α-peptid ribozimmolekulák bizonyos része a 3' illesztőhelynél spontán hasadáson ment keresztül, az érintetlen *T. thermophila* intronhoz hasonlóan. Ezeket a hasítási formákat, amelyek a 3' illesztőhely melletti guanozincsoportnál végződtek, szintén inkubáltuk CAT RNS-sel. Ebben az esetben maga a ribozim a CAT RNS egy 3' részéhez van ligálva, ami egy körülbelül 550 nukleotid hosszúságú terméket ad. Ez a reakció hasonló az érintetlen intron öncirkularizációjához, és a többi transzillesztő reakciókban ugyanez a ligálási termék található.

VI. *A transzillesztés pontossága*

Egy CAT–LacZ α-peptid transzillesztő reakció termékét reverz transzkripciónak vetettük alá, és a peptid illesztőhelyének két oldalára komplementer két oligonukleotiddal polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk. Az amplifikált szekvenciákat klónoztuk és szekvenáltuk. Az egyes rekombinánsok nem mutatták az illesztett termékek várt szekvenciájának variációit. Az érintetlen intron tanulmányozása azt mutatta, hogy az illesztés nagy pontossággal megy végbe.

Ennek megfelelően a fenti kísérletek azt mutatták, hogy egy, a találmány szerinti irányelvek alapján tervezett transzillesztő ribozim pontos, hatékony *in vitro* transzillesztésre képes.

2. példa

Növényvírus-rezisztenciát biztosító transzillesztő ribozim tervezése

Az uborka-mozaikvírus (CMV) egy nagymértékben elterjedt vírus, amelynek számos ismert törzse létezik. Kilenc szekvenciális törzs mutatható ki az RNS 3 és a szubgenomiális mRNS 4 [7–25. szekvenciák; 4(A) és 5. ábra] által kódolt burokprotein cisztronjának kezdeti területénél. Két konzervatív szekvenciájú, a burokprotein AUG startkodonjától lefelé elhelyezkedő helyet választottunk ki. A 4(B) ábrán bemutatjuk és az alábbiakban ismertetjük az olyan ribozim konstruálásához alkalmas oligonukleotidokat, amelyek képesek transzillesztení a DTA Ile-mutáns formáját a CMV burokprotein mRNS-re.

A 4(C) és (D) ábrán bemutatott transzillesztő ribozimokat a 4(B) ábrán bemutatott CMV vírusszekvenciákkal céloztuk meg, és ez nem csak a CMV RNS-molekulák hasítását fogja eredményezni, hanem a diftériatoxin A kifejeződését is a megfertőzött sejtekben. A 4. ábrán bemutatott transzillesztő kazetták ismert módon bármely CMV-re érzékeny növényfajtára átvihetők, és a CMV-fertőzéssel transzgenikus utódok hívhatók létre. A ribozimot úgy kell tervezni, hogy vírusfertőzés legyen szükséges az RNS transzillesztésével történő toxintermelés beindításához, mivel maga a ribozim nem transzlatálódik. A fertőzött sejtek lokalizált pusztulása, ami a toxin kifejeződésének eredménye, határt tud szabni a vírus replikálódásának és terjedésének az olyan növényben, amely mesterséges hiperszenzitív választ ad.

3. példa

Gal4 diftériatoxin A lánc transzillesztő ribozim konstruálása és jellemzése

A találmány értelmében, az 1. példa szerinti módon egy fúziós ribozimot terveztünk, amely egy Gal4 diftériatoxin A lánc transzillesztő ribozim (6. ábra). E ribozim szekvenciáját a 6. szekvencia mutatja. A GAL4–DTA ribozimkazetta egy SalI–XhoI fragmens. A ScaI hasítási hely egy, a 3' illesztőhelytől 5 bázissal fölfelé elhelyezkedő helyzetet jelöl. Ez a ribozim a diftériatoxin A láncát kódoló szekvenciát képes kapcsolni egy, a GAL4 mRNS 5' régiójában levő helyre. Ez a transzillesztő aktivitás mind *in vitro* (lásd fent), mind *in vivo* (lásd az alábbiakban) aktív. A GAL4–DTA ribozim és bármely olyan transzillesztő ribozim sikeres tervezésének fontos kritériuma, amely egy toxikus terméket kódoló szekvenciát transzilleszt, nemcsak a transzillesztés hatékony és precíz katalízisének biztosítása, hanem az is, hogy a toxikus termék, például DTA kifejeződése a transzillesztés hiányában ne következzék be.

A ribozim katalitikus részét a fent vázolt elvek alapján konstruáljuk, és az 5' és 3' kapcsolóhelyeket a GAL4, illetve DTA 5' kódolóterületén belül választjuk meg. A 3' exonszekvencia egy DTA gén 3' exonszekvenciájának felel meg, amelyet eukariótákban expresszióra használnak, kivéve az eltávolított első AUG kodont és néhány közbeeső aminosav kodonját. A DTA eredeti C. *diphtheriae* formája szintén ebben az 5' régióban tér el, CUG kodont hasznosít a transzláció beindításához. Az eredeti DTA-szekvencia szintén tartalmaz egy szignálpeptid vezetőszekvenciát, amely itt hiányzik.

Ezek a ribozimmolekulák a 3' illesztőhelynél spontán hasításon mehetnek keresztül. Tekintettel a DTA extrém toxicitására, fontos, hogy bármely felszabaduló 3' exonszekvencia ne késztesse toxikus transzlációs termékek képződését. A 3' exon egy leolvasókeretben levő metionint tartalmaz a 13-helyzetnél, amely elképzelhetően felszabadít egy csonkított, de toxikus peptidet. E lehetőség megszüntetésére a vad típusú szekvenciában ($Rz\text{-}DTA_{Met}$) az ennél a helyzetnél levő metionint két ribozimkonstrukcióban izoleucinra ($Rz\text{-}DTA_{Ile}$), illetve leucinra ($Rz\text{-}DTA_{Leu}$) cseréltük (6. ábra).

4. példa

A találmány szerinti ribozim in vivo aktivitása

I. *Bevezetés*

A fenti elvek alapján tervezett ribozim *in vivo* aktivitása és azon képessége igazolására, hogy a gazdaszervezet számára új génaktivitást biztosítson, Gal4 diftériatoxin A lánc transzillesztő ribozimot (3. példa, 6. ábra) alkalmaztunk egy gazdaszervezet számára a nagymértékben toxikus diftériatoxin A termék biztosítására. Gazdaszervezetként *Drosophilát* alkalmaztunk, és kívánatos volt, hogy a találmány szerinti ribozim kifejeződését szövetspecifikus módon szabályozzuk a *Drosophila* gazdaszervezetben.

A diftériatoxint *Corynebacterium diphteriae* választja ki, amely B fágra lizogén. A toxin egyetlen polipeptid formájában képződik, amely proteolízissel A és B lánccá alakul. Az A lánc (DTA) egy potenciális ADP ribozilázaktivitást tartalmaz, amely az EF–2 eukarióta transzlációs meghosszabbító faktorra specifikus. Ezen enzimből már néhány molekula jelenléte elég ahhoz, hogy a transzlációt leállítsa, és különböző eukariótasejtek pusztulását idézze elő. A B lánc intracelluláris szállítást tesz lehetővé azáltal, hogy a toxint mannózcsoportok megkötésével a sejt felületi receptoraihoz kapcsolja, a sejten belül felszaporodik, és vezikuláris fúzióval a citoplazmába kerül.

A B lánc hiányában az A lánc sokkal kevésbé toxikus, ha extracellulárisan van jelen. Ezen tulajdonsága, valamint extrém toxicitása alapján vetődött fel alkalmazhatósága ektópiás eltávolítási kísérletekben. Így például DTA-t kódolószekvenciákat transzgenikus egerekben fejeztünk ki, a kifejeződést fejlődő szemekben opsin promoter alkalmazásával vezetve. A kifejlődő egerek vakok, szemük deformált [Breitman M. L., Science *238*, 1563–1565 (1987)]. Más kísérletekben egérhasnyálmirigy eltávolítását végeztük [Palmiter R. D. et al., Cell *50*, 435–443 (1987)], Wert S. E. et al., Am. Rev. Resprir. Dis. *141* (No. 4, 2. rész) A695 (1990) helyen alveoláris sejtek olyan kiméragén segítségével végzett eltávolítását ismertetik, amelyek a promotert és a humán felületaktív C protein génjének (amelyet a II. típusú alveoláris sejtek fejeznek ki) 5' túlnyúló szekvenciáját, valamint a DTA-gént tartalmazzák.

E megközelítés alapján azonban nem lehet fenntartani vagy szaporítani olyan transzformált organizmusokat, amelyek szigorúbb vagy letális fenotípust mutatnak. Emellett bizonyos fajok, például *Drosophila* érintetlen DTA-szekvenciákkal történő transzformálását mindeddig még nem ismertették. A DTA-gén ilyen transzformáció során megbízhatatlan módon végbemenő kifejeződése a sejt azonnali pusztulásához vezet.

II. *Drosophila rendszer*

A génkifejeződés *Drosophilában* történő megcélzására egy általános módszert dolgoztunk ki. Először is a rendszer az egyes olyan törzsek gyors generációváltását teszi lehetővé, amelyekben az ektópiás génkifejeződés különböző szövetekre vagy sejttípusokra irányítható: az enhanszer detektor technikát [O'Kane C. J. és Gehring W. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9123–9127 (1987); Bellen et al., Genes and Development, *3*, 1288–1300 (1989); Bier et al., Genes and Development *3*, 1273–1287 (1989)] hasznosítjuk transzkripciós aktivátor protein embriókban, lárvákban és kifejlett rovarokban legkülönfélébb formában történő kifejeződésére. Másrészt a módszerrel az aktivátort határozott vonalakban elkülönítjük a megcélzott génjétől annak biztosítására, hogy az egyes szülővonalak életképesek legyenek: az egyik vonalban az aktivátor protein van jelen, de nem tartalmaz aktiválható megcélzott gént, míg a másik vonalban a megcélzott gén csöndes. Ha a két vonalat keresztezzük, a megcélzott gén csak a keresztezés utódjában tűnik fel, lehetővé téve, hogy a domináns fenotípust (beleértve a letalitást) kényelmesen tanulmányozzuk.

Ahhoz, hogy csak az érdekes gént fejezzük ki ektópiásan, olyan transzkripciós aktivátorra van szükség,

amely legyekben nem rendelkezik endogén célmolekulával. Egy élesztőaktivátor, a Gal4 képes aktiválni a transzkripciót legyekben, de csak olyan promoterekről, amelyek Gal4 kötőhelyet hordoznak [Fischer et al., Nature *332*, 853–865 (1988)]. A génkifejeződés megcélzásához a Gal4-et bizonyos sejtekre korlátozzuk, kétféle módon: a Gal4 transzkripciót jellemzett légypromoterrel vezetjük, vagy egy enhanszer nélküli Gal4 gént integrálunk random módon a *Drosophila* genomba, genomiális enhanszerek különböző elrendezésében szabályozás alá vonva. A Gal4 által történő transzaktiválás vizsgálatára a Gal4-et kifejező legyeket olyan legyekkel keresztezzük, amelyek lacZ gént hordoznak, amelynek a transzkripcióját a Gal4 kötőhelyek hajtják [Fischer et al., Nature *332*, 853–865 (1988)]. A β-galaktozidáz csak olyan sejtekben fejeződik ki, amelyekben először kifejeződik a Gal4. A lacZ szövet- és sejtspecifikus transzaktiválását olyan törzsekben igazoltuk, amelyekben a Gal4 kifejeződik, és amelyekben különböző mintázatokat hoztunk létre.

Ezzel a rendszerrel most már lehetséges, hogy

1) Gal4 kötőhelyeket bármely kódolószekvenciától fölfelé helyezzünk el;
2) a gént csak olyan sejtekben aktiváljuk, amelyekben a Gal4 kifejeződik;
3) megfigyeljük az ilyen szokásostól eltérő kifejeződés fejlődésre gyakorolt hatását.

Olyan esetekben, ahol az ektópiás kifejeződés letális, a módszer lehetővé teszi, hogy a két szülővonal (egyrészt a Gal4-et kifejező, másrészt a csöndes, promoterében Gal4 kötőhelyet tartalmazó gént hordozó) stabilan szaporodjon. A fenotípus azután a keresztezéssel kapott utódokban tanulmányozható.

III. *Vektorok*

A kísérletekben kiindulási anyagként alkalmazott vektorok:

1) *pGATB és pGATN* (9. ábra): e vektorokat egy promoter nélküli Gal4 géntől fölfelé elhelyezkedő promoterek klónozására használjuk.

A vektorokat úgy konstruálták, hogy vagy egy egyedi NotI vagy egy BamHI hely legyen inszertálva a Gal4 kódolórégiótól fölfelé. Ha egy promotert kapcsolunk a Gal4 kódolószekvenciához, a gén kihasítható a pHSREM vektor vázból [Knipple és Marsella-Herrick, Nucl. Acids Res. *16*, 7748 (1988)] és egy P-elem vektorba vihető. Az Rh2 promoter ebbe a vektorba van klónozva [Mismer et al., Genetics *120*, 173–180 (1988)], és olyan legyeket hoztunk létre, amelyekben a Gal4 csak szemekben fejeződik ki.

2) *pGawB*: ez egy Gal4 vektor az enhanszer detektálásban való felhasználásra.

Egy enhanszer nélküli Gal4 gént szubklónoztunk a plwB vektorba [Wilson et al., Genes and Development *3*, 1301–1313 (1989)], így a pGawB vektort kaptuk. A plwB-t először HindIII-mal emésztettük a lacZ gén és a P-transzpozáz gén N-terminusának eltávolítására. Ezeket a P-transzpozáz gén TATA boxa mögött a teljes Gal4 kódolórégióval helyettesítettük.

3) *pUAST* (10. ábra): ezt a plazmidot a Gal UAS-től lefelé elhelyezkedő kódolószekvencia klónozására használtuk.

Egy olyan vektort konstruáltunk a P-elem vektorban, a pCaSpeR3-ban [C. Thummel, Univ. of Utah Medical Center, Salt Lake City, Utah], amelybe gének szubklónozhatók a Gal4 UAS (Upstream Activation Sequence) mögé. Öt Gal4 kötőhelyet inszertáltunk, majd a hsp70 TATA boxot és transzkripciós startkodont, egy polilinkert, az SV40 intront és poliadenilezési helyet. Az egyedülálló helyek, ahová gének vagy cDNS-ek inszertálhatók: EcoRI, Bg1II, NotI, XhoI, KpnI és XbaI.

IV. *Drosophila törzsek*

A kísérletekben alkalmazott *Drosophila* törzsek jellemzésére használt genetikai technika jól ismert („Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*", D. Lindsley és E. H. Grell).

A P-elem transzpozonokat az olyan „jumpstarter" törzsek alkalmazásával mobilizáljuk, amelyek a harmadik kromoszómán delta2-3-at, egy defektív P-elemet hordoznak, amely egy alkotóelemként aktív transzpozáz magas szintjét fejezi ki [Robertson et al., Genetics *118*, 451–470 (1988)]. A három alaptörzset, amelyeket az inszerciós vonalak kialakítására és térképezésére használunk, a Drosophila Stock Center (Indiana University Department of Biology, Jordan Hall A 503, Bloomington, Indiana 47405, USA) intézetnél deponáltuk (a törzsek három kromoszómájának genetikai jellemzőit pontosvesszővel választottuk el):

1.: y w; +/+; Sb P[ry$^+$, delta2-3]/TM6, Ubx
2.: w; +/+; TM3, Sb/CxD (deponálási szám: 3665)
3.: w; CyO/Sco; +/+ (deponálási szám: 3666).

Így például az 1. törzsben az első kromoszóma (az X kromoszóma) homozigóta a yellow-ra és white-ra nézve („y w"), a második kromoszóma vad típusú („+/+"), míg a harmadik kromoszóma hordozza a Stubble gént („Sb"), a P-elem transzpozon rosy gént („ry$^+$") és a delta2-3-at, míg a második harmadik kromoszóma balanszer inverziókat hordoz („/TM6, Ubx").

V. *Gal4 kifejeződési minták generálásának stratégiája*

A. *A transzformánsok izolálására alkalmazott módszer vázlata*

Konstrukciókat injektálunk az alaptörzsből származó embriókba;

♀♀ y w/y w; delta2-3,Sb/TM6,Ubx x ♂♂ y w/Y; delta2-3,Sb/TM6,Ubx

FO; külön vonalakat hozunk létre

♀ y w/y w; delta2-3,Sb/TM6,Ubx x ♂ y w/Y; +/+

vagy

♂ y w/Y; delta2-3,Sb/TM6,Ubx x ♀ y w/y w; +/+

F1; Kiválasztjuk a [w±] és [Sb±] utódokat, és alaptörzset alapítunk

♀ y w/y w; +/TM6,Ubx × ♂ y w/Y;+/+

vagy

♂ y w/Y; +/TM6,Ubx × ♀ y w/y w; +/+

B. *Az enhanszer nélküli Gal4 inszert ugratásának vázlata*

1. Ugratás az X-kromoszómáról

♀♀ FM3/FM7, w; +/+ × ♂♂ y w/Y: delta2-3,Sb/TM6,Ubx

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w+] × ♂♂ FM7/Y; delta2-3,Sb/+

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w+];delta2-3,Sb/+ × ♂♂ y w/Y; +/+

♀ FM7,w/y w; delta2-3,Sb/+ × ♂ y w/Y +/+

Kiválasztjuk a [w+] és [B] utódokat, és alaptörzset alapítunk.

2. Ugratás a delta2-3 kromoszómáról

♀♀ y w/y w × ♂♂ y w/Y; P[Gal4,w+], delta2-3,Sb/+

Kiválasztjuk a [w+] és [Sb] utódokat és alaptörzset alapítunk.

C. *Kromoszómaszegregáció*

Az inszertek szegregálódásának elemzésére két alaptörzset használtunk:

w; +/+; TM3,Sb/CxD és w; CyO/Sco;+/+.

Módszer

Nagyszámú olyan törzs kialakítására, amelyek Gal4-t fejeznek ki sejt- vagy szövetspecifikus módon, enhanszer detektálóvektorokat készítettünk, amelyek a Gal4 gén különböző változatait hordozták. rosy (ry+) és white (w+) P-elem vektorokba [p1ArB és p1wB módosított verziói; Wilson et al., Genes and Development, *3*, 1301–1313 (1989)] két gént, a teljes hosszúságú proteint, illetve a csonkított proteint kódoló gént klónoztuk. Kiválogató mintaként ry+-t, illetve w+-t használva a vektorokat a delta2-3 gén beiktatásával mobilizáltuk [Robertson et al., Genetics *118*, 461–470 (1988)]. A Gal4 kifejezési mintájának vizualizálására a Gal4 inszerciós vonalakat olyan törzzsel kereszteztük, amely a lacZ gént a Gal4 UAS szabályozása alatt hordozta [Fischer et al., Nature *332*, 853–865 (1988)]. Az ezen keresztezésekből származó embriókat, lárvákat és kifejlett rovarokat β-galaktozidáz kifejezésre nézve vagy egy enzimvizsgálatban X-gal és egy szubsztrát segítségével, vagy a β-galaktozidáz elleni monoklonális antitestek megfestésével vizsgáltuk át. Az UAS–lacZ konstrukció által kódolt β-galaktozidáz a citoplazmában lokalizálódik.

Mintegy 500 Gal4-inszerciós törzset vizsgáltunk át, és sok olyan törzset azonosítottunk, amelyek alkalmazhatók bizonyos szövetekben kifejeződő gének aktiválására, így például epidermális csíkok, mezoderma, központi idegrendszer és perifériás idegrendszer. Sok más vonal nyálmirigyekben, valamint más szövetekben fejezi ki a β-galaktozidázt. Lehetséges, hogy az enhanszer nélküli Gal4 transzpozon konstruálása során véletlenül egy pozíciófüggő nyálmirigy enhanszer generálódott.

VI. Minták átvizsgálása

Törzsek száma	Nincs festődés	Nyál-mirigy	Más szövet	%
9	+	–	–	5,8
45	–	+	–	28,8
81	–	+	+	51,9
21	–	–	+	13,5
156				100,0

Egy gén (X gén) meghatározott mintában történő aktiválására egy Gal4 inszerciós vonalat választunk, és egy olyan törzzsel keresztezzük, amely az X gént a GAL UAS mögé klónozva tartalmazza.

VII. *Ribozim nélküli GAL4/UAS rendszer összefoglalása*

A Gal4/UAS rendszer egy, a génaktiválást szabályozó kétrészes rendszer. A módszer sokoldalú, lehet szövetspecifikus, és nem mutat kifejezési alapértéket, kivéve talán – amint a korábbiakban ismertettük – az UAS–DTA konstrukciók esetén. Alkalmazható jellemzett gének ektópiás kifejezésére, módosított, egyébként az organizmusra nézve letális gének kifejezésére, és más fajokból származó gének kifejezésére, azoknak *a Drosophilak* fejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása céljából. Mivel a módszer lehetővé teszi domináns, funkciót nyerő mutánsok kialakítását, episztázis tesztek és látható, illetve letális fenotípusok enhanszerei és szuppresszorai iránti átvizsgálása végezhetők el. A Gal4 rendszer szintén lehetővé teszi toxikus termé-

kek kifejezését, a sejt- és szövetspecifikus eltávolítás következményeinek tanulmányozására.

VIII. *Gal4-et kifejező, találmány szerinti DTA-ribozimot tartalmazó Drosophila alkalmazása*

A DTA proteint kódolószekvenciát hordozó fúziós ribozim kifejezését a GAL4 UAS (upstream activator sequence) szabályozása alá helyeztük a pUAST-ben (10. ábra). Amint fentebb említettük, módosított P-elem enhanszercsapda vektorokat alkalmazva számos stabil *Drosophila* vonalat konstruáltunk, amelyek mind kifejezik a Gal4 élesztő transzkripciós aktivátort a fejlődő legyekben, meghatározott helyi és időbeli minta szerint. Bármely a GAL4 UAS szabályozása alatt álló gén transzformálható és egyenként fenntartható, majd indukálható bizonyos *Drosophila* szövetekben genetikai keresztezéssel olyan vonalakká, amelyek kifejezik a Gal4-t (7. ábra). Nem lehetett azonban a Gal4 rendszer DTA önmagában való kifejezésének előnyét további módosítás nélkül kihasználni, mivel az UAS–DTA transzformánsok termelése a DTA megbízhatatlan kifejeződésén keresztül bonyolult.

Úgy találtuk, hogy ezen kételemes rendszer használata a DTA kifejezésének transzillesztő ribozimon (6. ábra) keresztül történő kondicionált kifejezésének eszközeként megoldja ezeket a problémákat. Az olyan sejtekben, amelyek GAL4-et fejeznek ki, a GAL4 protein biztosítja azt az aktivitást, amely a ribozimtranszkripcióhoz szükséges, és a GAL4 mRNS képezi a megcélzott molekulát a transzillesztéshez, ami a DTA termeléséhez kell.

Drosophila embriókba ismert módon ribozimszekvenciák injektálhatók, amelyek a fent ismertetett módon UAS-promoter szabályozása alá vannak helyezve. Az Rz–DTA_{Met} konstrukciót kapott embriók elpusztultak, míg normál transzformált legyeket kaptunk mind Rz–$DTAI_{Ile}$, mind Rz–DTA_{Leu} konstrukció embrióknak történő injektálásával. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a belső AUG kodon valóban iniciációs kodonként hatott az injektálás után a toxikus termék transzlációjánál. A kodon a javasolt NAD+ kötőhely mellett helyezkedik el a DTA-szekvenciában, valamint a távolról rokon A exotoxinban, egy, a Pseudomonas aeruginosából származó másik EF–2 specifikus ADP-ribozilázban levő konzervatív szekvenciák mellett.

Az Rz–DTA_{Ile} és Rz–DTA_{Leu} szekvenciákat a GAL4 UAS szabályozása alatt tartalmazó transzgenikus legyeket a GAL4-et meghatározott kifejezési mintában termelő legyekkel kereszteztük. Így például az egyik jellemzett vonalban, az 1J3 vonalban a GAL4 gént a szőrzet génjének közelébe inszertáltuk, így annak kifejezési mintázatát tükrözte. A szőrzet génjének terméke epidermális csíkokban termelődik számos hasűri szelvényekben az embriogenezis során. Ha egy, a GAL4-et a szőrzet géntermékének megfelelő mintában kifejező 1J3-ba UAS által vezérelt LacZ gént vezettünk be, a β-galaktozidáz az azonos számú szelvényeken belül lokalizálódott. Ha az Rz–DTA_{Leu} gént tartalmazó legyeket ezzel a GAL4-et kifejező vonallal kereszteztük, normál utódok képződtek. Ha azonban Rz–DTA_{Ile} gént tartalmazó legyeket kereszteztünk GAL4-et kifejező vonallal, az utódok fejlődése megállt az embriogenezis során. Sötétebb színű foltok voltak láthatók az embriók felhámján, az alatta levő sejtek elhalásának megfelelő helyeken. Amikor a felhámpreparátumokat megvizsgáltuk, az azonos számú dentális foltok töredezettek voltak, illetve hiányoztak, különösen a 4., 6. és 8. szelvényen (11. ábra). A sejtpusztulás más mintája volt megfigyelhető, ha Rz–DTA_{Ile} gént tartalmazó legyeket eltérő GAL4-et kifejező génekkel kereszteztünk.

5. példa

Proribozimok tervezése

A proribozimok tervezéséhez szolgáló tesztként a fentiekben ismertetett CAT–LacZ transzillesztő ribozimot módosítottuk (2. ábra). Filogenetikus összehasonlítások és mutációs analízisek [áttekintésként lásd Cech, Ann. Rev. Biochem. *59*, 543–568 (1990)] azt mutatták, hogy az I. csoportba tartozó önillesztő intorok magterülete nagymértékben konzervatív és az aktivitás szempontjából fontos (8. ábra). Transzillesztő proribozimok tervezéséhez az ezen terület közvetlen szomszédságában levő P8 hélixet elroncsoltuk. Az első kísérletekben 13, illetve 18 nukleotidot tartalmazó új szekvenciákat vezettünk be a P8 hélix 5' szálába és hurkába az 1., illetve 2. proribozim kialakítására. Az extra nukleotidok komplementerek voltak a ribozim 5' „antiszensz" részére, míg a túlnyúló szekvenciákat úgy alakítottuk, hogy tartsák meg (1) a P8 alapjának aktuális szekvenciáját és (2) a P8-on belüli lehetséges bázispárosodás mértékét (13. ábra). A P8 hélixbe inszertált szekvenciák és a proribozim 5' „antiszensz" területe közötti komplementeritás mértéke olyan, hogy az új hélix várhatóan előnyösen a P8 hélix naszcensz transzkriptuma lesz. Ezen alternatív hélix képződése kapcsán várható az is, hogy a ribozim katalitikus magján belüli túlnyúló szekunder és esetleg tercier kölcsönhatásokat megszakítja. Így a proribozim téves hajtogatódása katalitikus inaktiválást eredményez (14. ábra). A proribozimnak a megcélozni szándékozott RNS-sel való bázispárosodása azonban elmozdítja a P8-„antiszensz" bázispárosodást, különválasztja az „antiszensz" szekvenciákat, és lehetővé teszi a P8 hélix és az aktív katalitikus domén újraképződését. A P8-„antiszensz" hélix elmozdítása nagyobb mennyiségű bázispárt eredményez, és a katalitikus domén megfelelő hajtogatódását teszi lehetővé, ami energetikailag előnyös.

CAT–LacZ proribozimok

A két CAT–LacZ proribozim klónozott szekvenciáját az előbbiekben ismertetett PCR-mutagenezissel konstruáltuk, és az RNS-t *in vitro* transzkripcióval állítottuk elő. Megfigyeltük, hogy a CAT–LacZ transzillesztő ribozim a 3' illesztőhelynél hasítódik a transzkripció során az intronszekvencia által katalizált hidrolízis eredményeképpen. Hasonló hidrolízis figyelhető meg a nem módosított *Tetrahymena thermophila* intron *in vitro* transzkriptumaiban is. Ezzel szemben az eltérő CAT–LacZ proribozimok transzkriptumai stabilabbak, kevés hasadás következik be ugyanolyan körülmények között (15. ábra). Ez arra utal, hogy a proribozimok inaktívak, ami akkor várható, ha a katalitikus szekvenciák tévesen hajtogatódnak. A proribozimok csonkított formáit a

CAT RNS-re specifikus endoribonukleázaktivitásra nézve teszteltük. CAT–LacZ proribozim RNS-t az ScaI helynél csonkított templátokról írtuk át a 3' illesztési hely és a LacZ szekvenciák eltávolítására. Mind a ribozim, mind a proribozim RNS-ek stabilak a 3' illesztési hely eltávolítása után. A csonkított proribozimok CAT RNS-sel végzett inkubálása a megcélzott RNS specifikus hasítását eredményezte, és a várt méretű fragmenseket kaptuk (16. ábra). 37 °C, 45 °C és 50 °C hőmérsékletnél vizsgáltuk a specifikus hasítóaktivitást.

A GAL4–DTA transzillesztő ribozim proribozim formáját szintén elkészítettük (17. ábra). 20 nukleotidos régiókat (amelyek az „antiszensz" régióra komplementerek) inszertáltunk a P8 hélix 5' szálába és hurkába. A két proribozim a módosított P8 hélixekben lehetséges bázispárosodások mértékében különbözött, és a GAL–DTA 1. proribozim egy hosszabb törzzsel és a hurokban kevesebb (3) hozzáférhető bázissal rendelkezett. A GAL4–DTA 2. proribozim P8 hélixe nagyon hasonlít a CAT–LacZ 2. proribozimhoz, nagyobb hurokkal (14 bázis) rendelkezik, és az „antiszensz" régióra komplementer szekvenciákat tartalmaz. A GAL4–DTA proribozimok transzkriptumai stabilabbak, mint a nem módosított ribozimoké. Különösen a 2. proribozim érintetlen marad olyan körülmények között végzett inkubálás után, amelyek a ribozim forma lényegében teljes önhasadását okozza (50 °C-on 30 perc, 10 mmol/l $MgCl_2$, 2 mmol/l GTP, lásd 18. ábrát).

SZEKVENCIALISTA

(1) Általános információ:
- (i) Bejelentő:
- (ii) Bejelentés címe: Sejtek eltávolítása transzkapcsoló ribozimok segítségével
- (iii) Szekvenciák száma: 56
- (iv) Levelezési cím:
  - (A) Címzett:
  - (B) Utca:
  - (C) Város:
  - (D) Állam:
  - (E) Ország:
  - (F) Irányítószám:
- (v) Komputerrel olvasható forma:
  - (A) Hordozó típusa:
  - (B) Komputer:
  - (C) Operátorrendszer:
  - (D) Szoftver:
- (vi) A jelen bejelentés adatai:
  - (A) A bejelentés száma:
  - (B) A bejelentés napja:
  - (C) Osztály:
- (vii) Az elsőbbségi bejelentés adatai:
  - (A) A bejelentés száma: US 07/642 330
  - (B) A bejelentés napja: 1991. 01. 17.
- (viii) A képviselő adatai:
  - (A) Név:
  - (B) Regisztrálási szám:
  - (C) Aktaszám:
- (ix) Telekommunikációs információk:
  - (A) Telefon:
  - (B) Telefax:

(2) Információk az 1. szekvenciához:
- (i) Szekvenciajellemzők:
  - (A) Hossz: 517 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Szálszám: kettős
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: DNS
- (xi) Szekvencia leírása: 1. szekvencia:

TGACGCAATT CAACCAAGCG CGGGTAAACG GCGGGAGTAA CTATGACTCT 50

CTAAATAGCA ATATTTACCT TTGGAGGGAA AAGTTATCAG GCATGCACCT 100

CCTAGCTAGT CTTTAAACCA ATAGATTGCA TCGGTTTAAA AGGCAAGACC 150

GTCAAATTGC GGGAAAGGGG TCAACAGCCG TTCAGTACCA AGTCTCAGGG 200

GAAACTTTGA CATGGCCTTG CAAAGGGTAT GGTAATAAGC TGACGGACAT 250

GGTCCTAACC ACGCAGCCAA GTCCTAAGTC AACAGATCTT CTGTTGATAT 300

GGATGCAGTT CACAGACTAA ATGTCGGTCG GGGAAGATGT ATTCTTCTCA 350

TAAGATATAG TCGGACCTCT CCTTAATGGG AGGTAGCGGA TGAATGGATG 400

CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT ATGCGAAAGT ATATTGATTA 450

GTTTTGGAGT ACTCGTAAGG TAGCCAAATG CCTCGTCATC TAATTAGTGA 500

CGCGCATGAA TGGATTA 517

(2) Információk a 2. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 82 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 2. szekvencia:

GGCCAAGCTT CTTTACGATG CCATTGGGAT ATATCAACCG TGGTATAAAC 50
CCGTGGTTTT TAAAAGTTAT CAGGCATGCA CC 82

(2) Információk a 3. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 47 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 3. szekvencia:

GATTAGTTTT GGAGTACTCG TACGGATTCA CGGCCGTCGT TTTACAA 47

(2) Információk a 4. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 43 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 4. szekvencia:

GGCCGAATTC TTACAATTTC CATTCAGGCT GCGCAACTGT TGG 43

(2) Információk az 5. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 623 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 5. szekvencia:

GGGAGACCGG AAGCTTCTTT ACGATGCCAT TGGGATATAT CAACGGTGGT 50

ATAAAGCCGT GGTTTTTAAA AGTTATCAGG CATGCACCTG GTAGCTAGTC 100

TTTAAACCAA TAGATTGCAT CGGTTTAAAA GGCAAGACCG TCAAATTGCG 150

GGAAAGGGGT CAACAGCCGT TCAGTACCAA GTCTCAGGGG AAACTTTGAG 200

ATGGCCTTGC AAAGGGTATG GTAATAAGCT GACGGACATG GTCCTAACCA 250

CGCAGCCAAG TCCTAAGTCA ACAGATCTTC TGTTGATATG GATGCAGTTC 300

ACAGACTAAA TGTCGGTCGG GGAAGATGTA TTCTTCTCAT AAGATATAGT 350

CGGACCTCTC CTTAATGGGA GCTAGCGGAT GAAGTGATGC AACACTGGAG 400

CCGCTGGGAA CTAATTTGTA TGCGAAAGTA TATTGATTAG TTTTGGAGTA 450

CTCGTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC 500

CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG 550

CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC 600

GCAGCCTGAA TGGAAATTGT AAG 623

(2) Információk a 6. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 1038 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 6. szekvencia:

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGGAAGATG TATTCTTCTC ATAAGATATA GTCGGACCTC TCCTTAATGG 360

GAGCTAGCGG ATGAAGTGAT GCAACACTGG AGCCGCTGGG AACTAATTTG TATGCGAAAG 420

TATATTGATT AGTTTTGGAG TACTCGTCTC GATGATGTTG TTGATTCTTC TAAATCTTTT 480

GTGATTGAAA ACTTTTCTTC GTACCACGGG ACTAAACCTG GTTATGTAGA TTCCATTCAA 540

AAAGGTATAC AAAAGCCAAA ATCTGGTACA CAAGGAAATT ATGACGATGA TTGGAAAGGG 600

TTTTATAGTA CCGACAATAA ATACGACGCT GCGGGATACT CTGTAGATAA TGAAAACCCG 660

CTCTCTGGAA AAGCTGGAGG CGTGGTCAAA GTGACGTATC CAGGACTGAC GAAGGTTCTC 720

GCACTAAAAG TGGATAATGC CGAAACTATT AAGAAAGAGT TAGGTTTAAG TCTCACTGAA 780

CCGTTGATGG AGCAAGTCGG AACGGAAGAG TTTATCAAAA GGTTCGGTGA TGGTGCTTCG 840

CGTGTAGTGC TCAGCCTTCC CTTCGCTGAG GGGAGTTCTA GCGTTGAATA TATTAATAAC 900

TGGGAACAGG CGAAAGCGTT AAGCGTAGAA CTTGAGATTA ATTTTGAAAC CCGTGGAAAA 960

CGTGGCCAAG ATGCGATGTA TGAGTATATG GCTCAAGCCT GTGCAGGAAA TCGTGTCAGG 1020

CGATCTTTGT GACTCGAG 1038

(2) Információk a 7, szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 134 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 7. szekvencia:

GTTTAGTTGT TCACCTGAGT CGTGTGTTTT GTATTTTGCG TCTTAGTGTG 50
CCTATGGACA AATCTGGATC TCCCAATGCT AGTAGAACCT CCCGGCGTCG 100
TCGCCCGCGT AGAGGTTCTC GGTCCGCTTC TGGT 134

(2) Információk a 8. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 134 bázis
(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 8. szekvencia:

GTTTAGTTGT TCACCTGAGT CGTGTTTTCT TTGTTTTGCG TCTCAGTGTG 50
CCTATGGACA AATCTGGATC TCCCAATGCT AGTAGAACCT CCCGGCGTCG 100
TCGCCCGCGT AGAGGTTCTC GGTCCGCTTC TGGT 134

(2) Információk a 9. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 152 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 9. szekvencia:

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT TTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50
TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAC AAATCTGAAT CAACCAGTGC 100
TGGTCGTAAC CGTCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCCCCT 150
CC 152

(2) Információk a 10. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 152 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 10. szekvencia:

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT GTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50
TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAT AAATCTGAAT CAACCAGTGC 100
TGGTCGTAAC CGTCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCTCCT 150
CC 152

(2) Információk a 11. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 131 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 11. szekvencia:

AGAGAGTGTG TGTGCTGTGT TTTCTCTTTT GTGTCGTAGA ATTGTGTCGA 50
GTCATGGACA AATCTGAATC AACCAGTGCT GGTCGTAACC GTCGACGTCG 100
TCCGCGTCGT GGTTCCCGCT CCGCCCCCTC C 131

(2) Információk a 12. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 154 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 12. szekvencia:

GTTATTGTCT ACTGATTGTA TAAAGAGTGT GTGTGTGCTG TGTTTTCTCT 50
TTTACGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 100
GCTGGTCGCA ACCGTCGACG TCGTCCGCGT CGTGGTTCCC GCTCCGCCCC 150
CTCC 154

(2) Információk a 13. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 154 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 13. szekvencia:

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAHAGTGT GTGTGTGCTG TGTTTTCTCT 50
TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGT ATCAACCAGT 100
GCTGGTCGTA ACCGTCGACG TCGTTTGCGT CGTGGTTCCC GCTCCGCCTC 150
CTCC 154

(2) Információk a 14. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 130 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 14. szekvencia:

GAGTGTGTAT GTGCTGTGTT TTCTCTTTTG TGTCGTAGAA TTGAGTCGAG 50
TCATGGACAA ATCTGAATCA ACCAGTGCTG GTCGTAACCG TCGACGTCGT 100
CCGCGTCGTG GTTCCCGCTC CGCCCCCTCC 130

(2) Információk a 15. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 152 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 15. szekvencia:

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAHAGTGT GTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50
TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAC AAATCTGATA CAACCAGTGC 100
TGGTCGTAAC CATCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCCCCT 150
CC 152

(2) Információk a 16. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 78 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 16. szekvencia:

GGAGGGGGCG GAGCGGGAAC CACGACGCGG ACGACGTCGA CGGTTACGAC 50
CAGCCCTGGT AGATTCAGAT TTGTCCAT 78

(2) Információk a 17. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 49 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 17. szekvencia:

TTTGCGTCTT AGTGTGCCTA TGGACAAATC TGGATCTCCC AATGCTAGT 49

(2) Információk a 18. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 49 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 18. szekvencia:

TTTGCGTCTC AGTGTGCCTA TGGACAAATC TGGATCTCCC AATGCTAGT 49

(2) Információk a 19. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 19. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 20. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 20. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ATAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 21. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 21. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 22. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 22. szekvencia:

TTTACGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 23. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 23. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 24. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 24. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 25. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 56 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 25. szekvencia:

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50
GCTGGT 56

(2) Információk a 26. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 59 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 26. szekvencia:

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50
AGTGCTGCA 59

(2) Információk a 27. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 51 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 27. szekvencia:

GCACTGGTTG ATTCAGATTT GTCCATGACT CGACTCAATT CTACGACACA 50
A 51

(2) Információk a 28. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 59 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 28. szekvencia:

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50
AGTGCTGCA 59

(2) Információk a 29. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 23 bázis
(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 29. szekvencia:
AGCATTGGTA TCATCAGGTT TGT 23

(2) Információk a 30. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 21 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 30. szekvencia:
GTTGATGATG TTGTTGATTC T 21

(2) Információk a 31. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 10 aminosav
(B) Típus: aminosav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid
(xi) Szekvencia leírása: 31. szekvencia:
Met Asp Lys Phe Asp Asp Val Val Asp Ser
5 10

(2) Információk a 32. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 30 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 32. szekvencia:

ATGGACAAAT TTGATGATGT TGTTGATTCT 30

(2) Információk a 33. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 59 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 33. szekvencia:

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50
AGTGCTGCA 59

(2) Információk a 34. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 17 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 34. szekvencia:
AGCCATCCTT GGTTCAG 17

(2) Információk a 35. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 15 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 35. szekvencia:
GTAAGGGTGG ATGTT 15

(2) Információk a 36. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 10 aminosav
(B) Típus: aminosav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid
(xi) Szekvencia leírása: 36. szekvencia:
Met Asp Lys Ser Glu Leu Arg Val Asp Val
1 5 10

(2) Információk a 37. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 30 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 37. szekvencia:

ATGGACAAAT CTGAATTAAG GGTGGATGTT 30

(2) Információk a 38. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 70 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 38. szekvencia:

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGATG GAAAACTTTT 50
CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) Információk a 39. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 11 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid

(xi) Szekvencia leírása: 39. szekvencia:
Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys
1 5 10

(2) Információk a 40. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 70 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 40. szekvencia:

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGATT GAAAACTTTT 50
CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) Információk a 41. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 70 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 41. szekvencia:

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGTTG GAAAACTTTT 50
CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) Információk a 42. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 78 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 42. szekvencia:

ATGAAGCTTC TCGATGATGT TGTTGATTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA 50
AAACTTTTCT TCGTACCACG GGACTAAA 70

(2) Információk a 43. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 26 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid
(xi) Szekvencia leírása: 43. szekvencia:

Met Lys Leu Leu Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val
1 5 10 15
Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys
20 25

(2) Információk a 44. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 41 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 44. szekvencia:

ATGGAGAAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT C 41

(2) Információk a 45. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid
(xi) Szekvencia leírása: 45. szekvencia:

Met Glu Lys Lys Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Lez Gln Arg
1 5 10 15
Arg Asp
17

(2) Információk a 46. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 51 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 46. szekvencia:

ATGGACAAAA AAATTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA 50
C 51

(2) Információk a 47. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 40 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 47. szekvencia:

ATGAAGCTAC TGTCTTCTAT CGAACAAGCA TGCGATATTT 40

(2) Információk a 48. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 20 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: peptid
(xi) Szekvencia leírása: 48. szekvencia:

Met Lys Leu Leu Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val
1 5 10 15
Met Glu Asn Phe Ser
20

(2) Információk a 49. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 60 bázis
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: egyszeres
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: nukleinsav
(xi) Szekvencia leírása: 49. szekvencia:

ATGAAGCTTC TCGATGATGT TGTTGATTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA 50
AAACTTTTCT 60

(2) Információk az 50. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 72 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lieáris
(ii) Molekula típusa: RNS
(xi) Szekvencia leírása: 50. szekvencia:

AUGGAGAAAA AAAUCACUGG AUAUACCACC GUUGAUAUAU CCCAAUGGCA 50
UCGUAAAGAA CAUUUUGAGG CA 72

(2) Információk az 51. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 479 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: RNS
(xi) Szekvencia leírása: 51. szekvencia:

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGG AAGAUGUAUU CUUCUCAUAA CAUAUAGUCG GACCUCUCCU UAAUGGGAGC 360

UAGCGGAUGA AGUGAUGCAA CACUGGAGCC GCUGGGAACU AAUUUGUAUG CGAAAGUAUA 420

UUGAUUAGUU UUGGAGUACU CGUACGGAUU CACUGGCCGU CCUGUUACAA CGUCGUGAC 479

(2) Információk az 52. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 479 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: RNS
(xi) Szekvencia leírása: 52. szekvencia:

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGG AAGAUGUAUU CUUCUCAUAA CAUAUAGUCG GACCUCUCCU UAAUGGGAGC 360

UAGCGGAUGA AGUGAUGCAA CACUGGAGCC GCUGGGAACU AAUUUGUAUG CGAAAGUAUA 420

UUGAUUAGUU UUGGAGUACU CGUACGGAUU CACUGGCCGU CCUGUUACAA CGUCGUGAC 479

(2) Információk az 53. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 480 bázispár
(B) Tipus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: RNS
(xi) Szekvencia leírása: 53. szekvencia:

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGA CCGUUGAUAU AUGGUUCAUA ACAUAUAGUC GGACCUCUCC UUAAUGGGAG 360

CUAGCGGAUG AAGUGAUGCA ACACUGGAGC CGCUGGGAAC UAAUUUGUAU GCGAAAGUAU 420

AUUGAUUAGU UUUGGAGUAC UCGUACGGAU UCACUGGCCG UCCUGUUACA ACGUCGUGAC 480

(2) Információk az 54. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 487 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: RNS
(xi) Szekvencia leírása: 54. szekvencia:

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGA CCGUUGAUAU AUCCCAAACG GUUCAUAACA UAUAGUCGGA CCUCUCCUUA 360

AUGGGAGCUA GCGGAUGAAG UGAUGCAACA CUGGAGCCGC UGGGAACUAA UUUGUAUGCG 420

AAAGUAUAUU GAUUAGUUUU GGAGUACUCG UACGGAUUCA CUGGCCGUCC UGUUACAACG 480

UCGUGAC 487

(2) Információk az 55. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 1044 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 55. szekvencia:

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGGAACAAC ATGCGATATT GTTCTCATAA GATATAGTCG GACCTCTCCT 360

TAATGGGAGC TAGCGGATGA AGTGATGCAA CACTGGAGCC GCTGGGAACT AATTTGTATG 420

CGAAAGTATA TTGATTAGTT TTGGAGTACT CGTCTCGATG ATGTTGTTGA TTCTTCTAAA 480

TCTTTTGTGA TTGAAAACTT TTCTTCGTAC CACGGGACTA AACCTGGTTA TGTAGATTCC 540

ATTCAAAAAG GTATACAAAA GCCAAAATCT GGTACACAAG GAAATTATGA CGATGATTGG 600

AAAGGGTTTT ATAGTACCGA CAATAAATAC GACGCTGCGG GATACTCTGT AGATAATGAA 660

AACCCGCTCT CTGGAAAAGC TGGAGGCGTG GTCAAAGTGA CGTATCCAGG ACTGACGAAG 720

GTTCTCGCAC TAAAAGTGGA TAATGCCGAA ACTATTAAGA AAGAGTTAGG TTTAAGTCTC 780

ACTGAACCGT TGATGGAGCA AGTCGGAACG GAAGAGTTTA TCAAAAGGTT CGGTGATGGT 840

GCTTCGCGTG TAGTGCTCAG CCTTCCCTTC GCTGAGGGGA GTTCTAGCGT TGAATATATT 900

AATAACTGGG AACAGGCGAA AGCGTTAAGC GTAGAACTTG AGATTAATTT TGAAACCCGT 960

GGAAAACGTG GCCAAGATGC GATGTATGAG TATATGGCTC AAGCCTGTGC AGGAAATCGT 1020

GTCAGGCGAT CTTTGTGACT CGAG 1044

(2) Információk az 56. szekvenciához:
(i) Szekvenciajellemzők:
(A) Hossz: 1047 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Szálszám: kettős
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekula típusa: DNS
(xi) Szekvencia leírása: 56. szekvencia:

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGCAAACAT GCGATATTTG CCGTTTGTCA TAAGATATAG TCGGACCTCT 360

CCTTAATGGG AGCTAGCGGA TGAAGTGATG CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT 420

ATGCGAAAGT ATATTGATTA GTTTTGGAGT ACTCGTCTCG ATGATGTTGT TGATTCTTCT 480

AAATCTTTTG TGATTGAAAA CTTTTCTTCG TACCACGGGA CTAAACCTGG TTATGTAGAT 540

TCCATTCAAA AAGGTATACA AAAGCCAAAA TCTGGTACAC AAGGAAATTA TGACGATGAT 600

TGGAAAGGGT TTTATAGTAC CGACAATAAA TACGACGCTG CGGGATACTC TGTAGATAAT 660

GAAAACCCGC TCTCTGGAAA AGCTGGAGGC GTGGTCAAAG TGACGTATCC AGGACTGACG 720

AAGGTTCTCG CACTAAAAGT GGATAATGCC GAAACTATTA AGAAAGAGTT AGGTTTAAGT 780

CTCACTGAAC CGTTGATGGA GCAAGTCGGA ACGGAAGAGT TTATCAAAAG GTTCGGTGAT 840

GGTGCTTCGC GTGTAGTGCT CAGCCTTCCC TTCGCTGAGG GGAGTTCTAG CGTTGAATAT 900

ATTAATAACT GGGAACAGGC GAAAGCGTTA AGCGTAGAAC TTGAGATTAA TTTTGAAACC 960

CGTGGAAAAC GTGGCCAAGA TGCGATGTAT GAGTATATGG CTCAAGCCTG TGCAGGAAAT 1020

CGTGTCAGGC GATCTTTGTG ACTCGAG 1047

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás polinukleotidmolekula előállítására, amely egy fúziós RNS transzillesztő ribozimot kódol, *azzal jellemezve,* hogy összekapcsolunk

(1) egy olyan első RNS-szekvenciát, amely alkalmas arra, hogy a ribozimot egy transzkripciós aktivátor proteint kódoló megcélzott RNS-hez való hibridizálásra bírja, és

(2) egy olyan második RNS-szekvenciát, amely a ribozim transzillesztő aktivitásának eredményeképpen kolineárisan a megcélzott RNS-re átvihető,

ahol a polinukleotidmolekula működőképesen kapcsolódik egy olyan transzkripciós regulátor elemhez, amelyet a transzkripciós aktivátor protein specifikusan felismer, és a transzkripciós aktivátor protein és a transzkripciós regulátor elem kapcsolódása a polinukleo-

tidmolekula transzkripciójának aktiválódását eredményezi.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy transzkripcióaktivátorként GAL4-et alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy második RNS-szekvenciaként olyan szekvenciát alkalmazunk, amely egy, a gazdasejtre nézve toxikus peptidet kódol.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy peptidként DTA-peptidet alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy DTA-peptidként egy mutáns peptidszekvenciát alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mutáns peptidszekvenciaként a 40. szekvencián bemutatott aminosavszekvenciát alkalmazzuk.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mutáns peptidszekvenciaként a 41. szekvencián bemutatott aminosavszekvenciát alkalmazzuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy első RNS-szekvenciaként egy, a GAL4 RNS-hez hibridizálódó szekvenciát, míg második RNS-szekvenciaként a DTA-peptidet kódolószekvenciát alkalmazzuk.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy polinukleotidmolekulaként RNS-t állítunk elő.

10. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy polinukleotidmolekulaként DNS-t állítunk elő.

11. Eljárás polinukleotidmolekula előállítására, amely egy ribozim expressziós kazettát tartalmaz, *azzal jellemezve,* hogy a kazettát stabilan inszertáljuk egy gazdaszervezet genomjába, ahol a kazetta egy olyan promoter szekvenciáját tartalmazza, amely az ilyen gazdaszervezetben képes működni, működőképesen kapcsolva az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid kódolószekvenciájához.

12. Eljárás gazdaszervezet transzformálására, *azzal jellemezve,* hogy a transzformálást egy, a 11. igénypont szerinti polinukleotidmolekulával végezzük.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a transzformálást egy vírussal történő transzfektálással végezzük.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy gazdaszervezetként prokariótasejtet alkalmazunk.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy gazdaszervezetként eukariótasejtet alkalmazunk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy eukariótasejtként növényi sejtet alkalmazunk.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy eukariótasejtként állati sejtet alkalmazunk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy állati sejtként *Drosophila* sejtet alkalmazunk.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy állati sejtként emlőssejtet alkalmazunk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy emlőssejtként humán sejtet alkalmazunk.

21. Eljárás *in vitro* transzillesztésre, *azzal jellemezve,* hogy

(1) egy transzillesztő reakcióelegyben egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulát, amely egy második polinukleotidmolekulával hibridizálni képes,

(2) egy második polinukleotidmolekulával hozunk érintkezésbe, és

(3) a második polinukleotidmolekula transzillesztését katalizáljuk.

22. Eljárás *in vivo* transzillesztésre, *azzal jellemezve,* hogy

(1) egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulát bejuttatunk egy gazdasejtbe,

(2) a gazdasejtben kifejezzük a polinukleotidmolekula által kódolt ribozimot,

(3) a gazdasejtben kifejezzük az említett ribozim egy szubsztrátját, és

(4) a gazdasejtben a ribozim szubsztráttal történő transzillesztését katalizáljuk.

23. Eljárás egy megcélzott RNS aktivitásának inaktiválására, *azzal jellemezve,* hogy

(1) egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulát egy transzillesztő reakcióelegyben, ahol a ribozim egy megcélzott RNS-sel szemben olyan katalitikus aktivitással rendelkezik, amely a megcélzott RNS funkcióinak inaktiválását eredményezi,

(2) a megcélzott RNS-t érintkezésbe hozzuk az eleggyel, és

(3) olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik a polinukleotid katalitikus aktivitásának kifejeződését.

24. Eljárás egy gazdasejt kívánt genetikai szekvenciával történő *in vivo* ellátására, *azzal jellemezve,* hogy

(1) egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulát egy gazdasejtbe juttatunk, ahol a polinukleotidmolekula egy, a gazdasejtben megcélzott RNS-sel szemben katalitikus aktivitással rendelkezik, és a ribozim képes transzilleszteni a kívánt genetikai szekvenciát,

(2) a megcélzott RNS-t bejuttatjuk a gazdasejtbe, és

(3) olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik, hogy a ribozim a kívánt genetikai szekvenciát transzillessze a megcélzott RNS szekvenciájába.

25. Eljárás sejtek eltávolítására többsejtű növények és állatok esetén, *azzal jellemezve,* hogy egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulával megfertőzünk egy embriógazdasejtet, ahol a ribozim egy, a gazdasejtre nézve toxikus peptid szekvenciáját kódolja, és a ribozim képes transzilleszteni az említett szekvenciát egy, a gazdasejtben levő megcélzott molekulára.

26. Eljárás hím- vagy női sterilitás létrehozására növényekben, *azzal jellemezve,* hogy egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidmolekulát a növény csírasejtjébe juttatunk, ahol a ribozimot egy olyan RNS-re célozzuk, amely proteinként kifejezve a

növény termékenysége szempontjából szükséges, és az említett proteint kifejező sejtet eltávolítjuk.

27. Eljárás növények növényi patogének elleni immunizálására, *azzal jellemezve,* hogy egy, a 9. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotiddal növényi sejteket transzformálunk, ahol a polinukleotid olyan transzillesztő szekvenciát kódol, amely a növény számára immunitást biztosít a patogénnel szemben, és ahol a növény sejtjének patogénnel való fertőzése a sejt eltávolítását eredményezi.

28. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

29. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

30. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

31. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

32. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

33. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

34. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

35. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

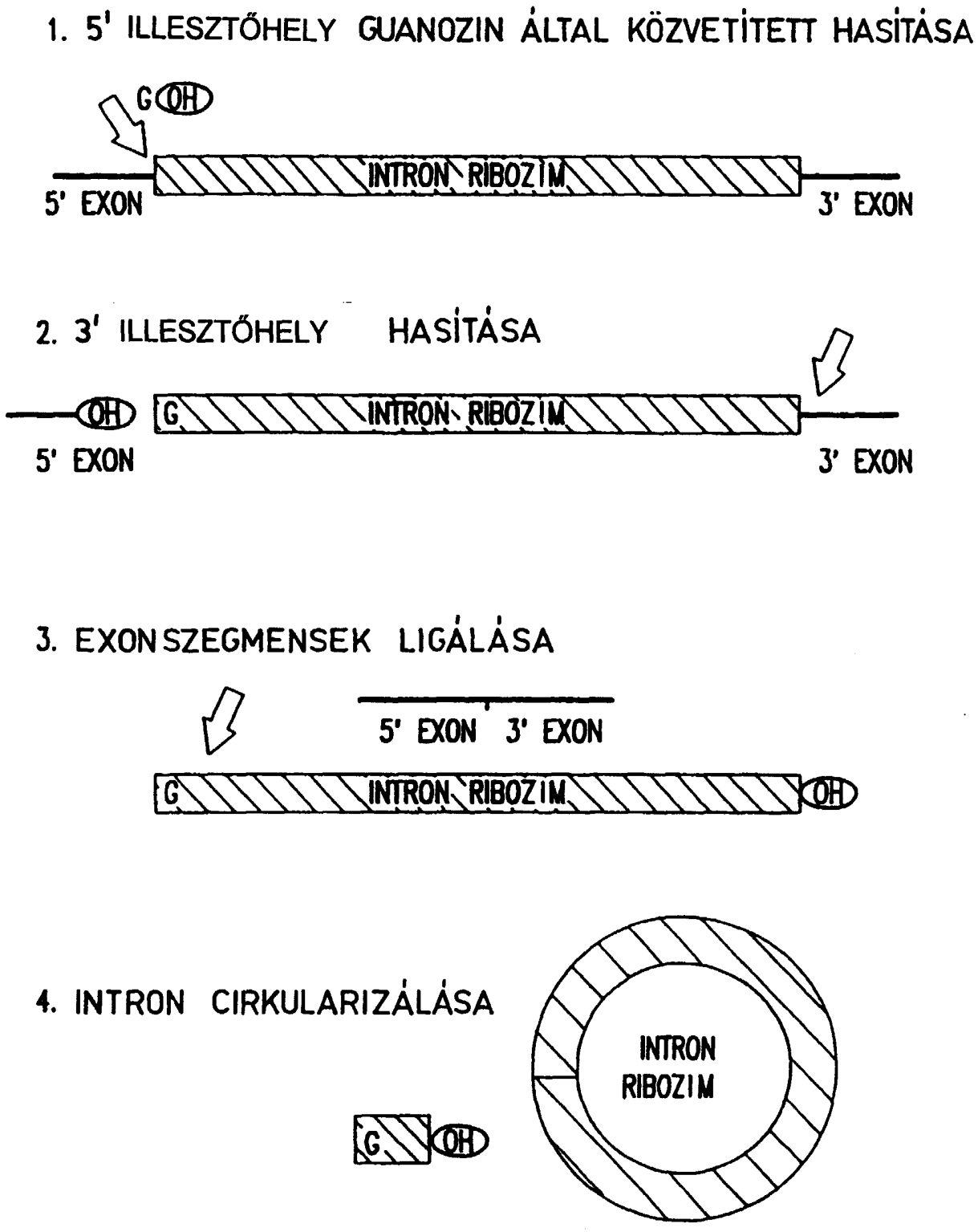
36. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

37. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

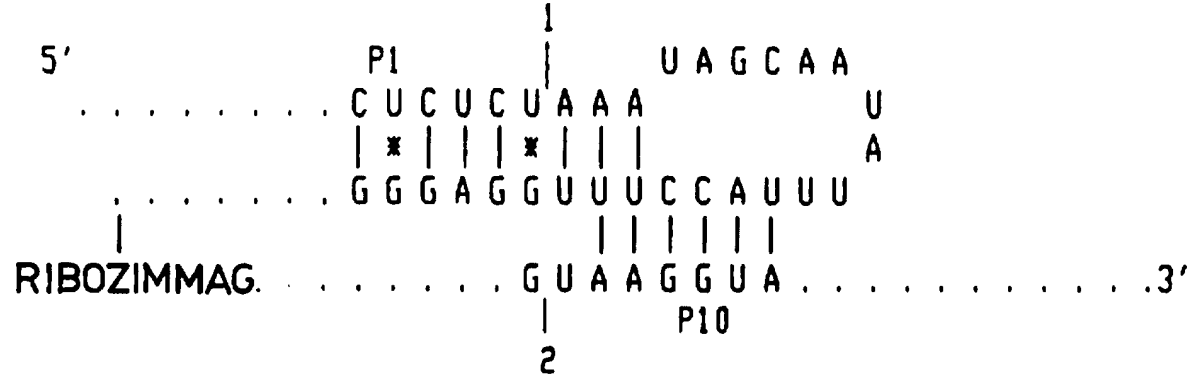
38. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

39. A 26. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.

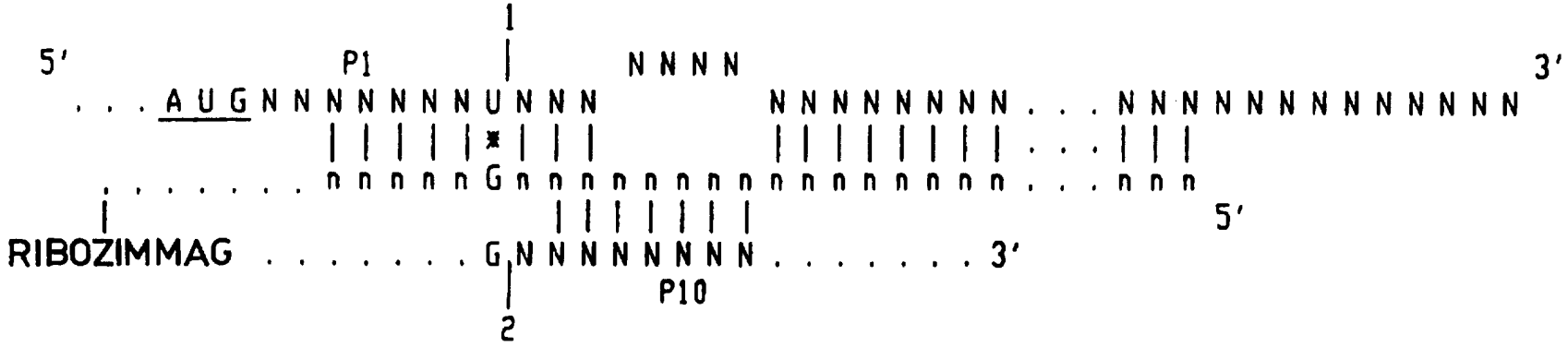
40. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy ribozimként egy proribozimot kódoló molekulát állítunk elő.


1. 5' ILLESZTŐHELY GUANOZIN ÁLTAL KÖZVETÍTETT HASÍTÁSA
G
OH
INTRON RIBOZIM
5' EXON
3' EXON
2. 3' ILLESZTŐHELY HASÍTÁSA
OH
G
INTRON RIBOZIM
5' EXON
3' EXON
3. EXONSZEGMENSEK LIGÁLÁSA
5' EXON 3' EXON
G
INTRON RIBOZIM
OH
4. INTRON CIRKULARIZÁLÁSA
G
OH
INTRON
RIBOZIM

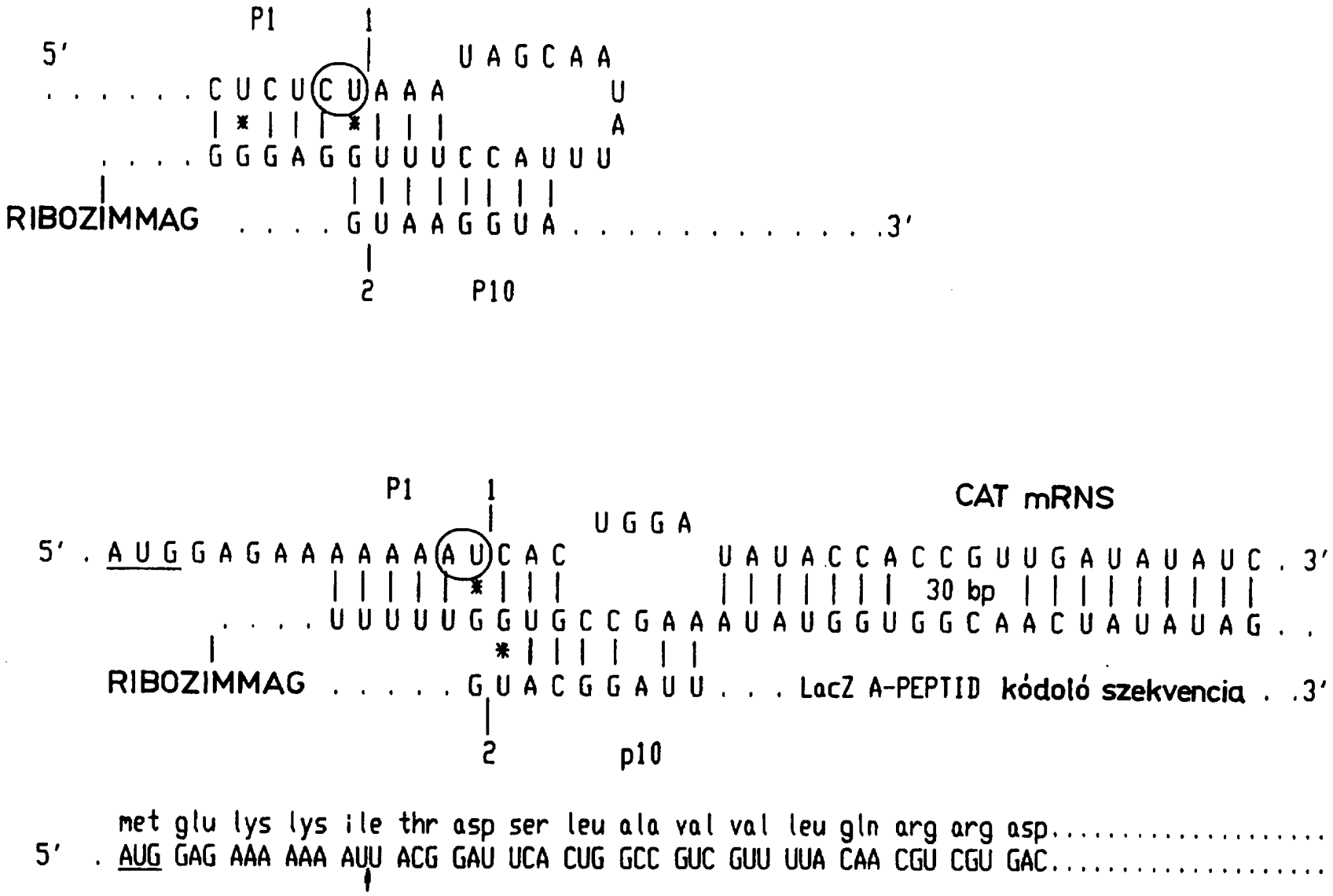
1. ábra



2A. ábra



2B. ábra


P1
1
5'
U A G C A A
. . . . . C U C U C U A A A U
. . . . G G G A G G U U U C C A U U U
RIBOZIMMAG . . . . G U A A G G U A . . . . . .3'
2
P10
P1
1
CAT mRNS
U G G A
5' . A U G G A G A A A A A A A U C A C U A U A C C A C C G U U G A U A U A U C . 3'
30 bp
. . . . U U U U U G G U G C C G A A A U A U G G U G G C A A C U A U A U A G . .
RIBOZIMMAG . . . . . G U A C G G A U U . . . LacZ A-PEPTID kódoló szekvencia . .3'
2
p10
met glu lys lys ile thr asp ser leu ala val val leu gln arg arg asp.....
5' . AUG GAG AAA AAA AUU ACG GAU UCA CUG GCC GUC GUU UUA CAA CGU CGU GAC.....

3A. ábra

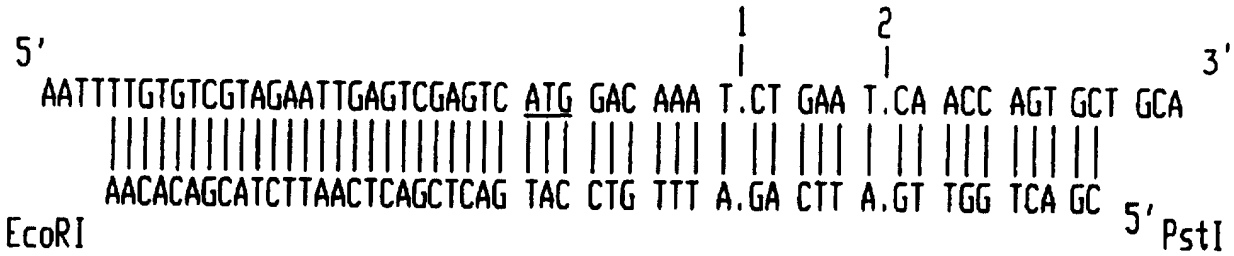
```
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
  1 GGGAGACCGG AAGCTTCTTT ACGATGCCAT TGGGATATAT CAACGGTGGT ATAAAGCCGT  60
 61 GGTTTTTAAA AGTTATCAGG CATGCACCTG GTAGCTAGTC TTTAAACCAA TAGATTGCAT 120
121 CGGTTTAAAA GGCAAGACCG TCAAATTGCG GGAAAGGGGT CAACAGCCGT TCAGTACCAA 180
181 GTCTCAGGGG AAACTTTGAG ATGGCCTTGC AAAGGGTATG GTAATAAGCT GACGGACATG 240
241 GTCCTAACCA CGCAGCCAAG TCCTAAGTCA ACAGATCTTC TGTTGATATG GATGCAGTTC 300
301 ACAGACTAAA TGTCGGTCGG GGAAGATGTA TTCTTCTCAT AAGATATAGT CGGACCTCTC 360
361 CTTAATGGGA GCTAGCGGAT GAAGTGATGC AACACTGGAG CCGCTGGGAA CTAATTTGTA 420
421 TGCGAAAGTA TATTGATTAG TTTTGGAGTA CTCGTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC 480
481 AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC 540
541 CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC 600
601 GCAGCCTGAA TGGAAATTGT AAG                                         623
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
```

3B. ábra

CMW – izolátumok

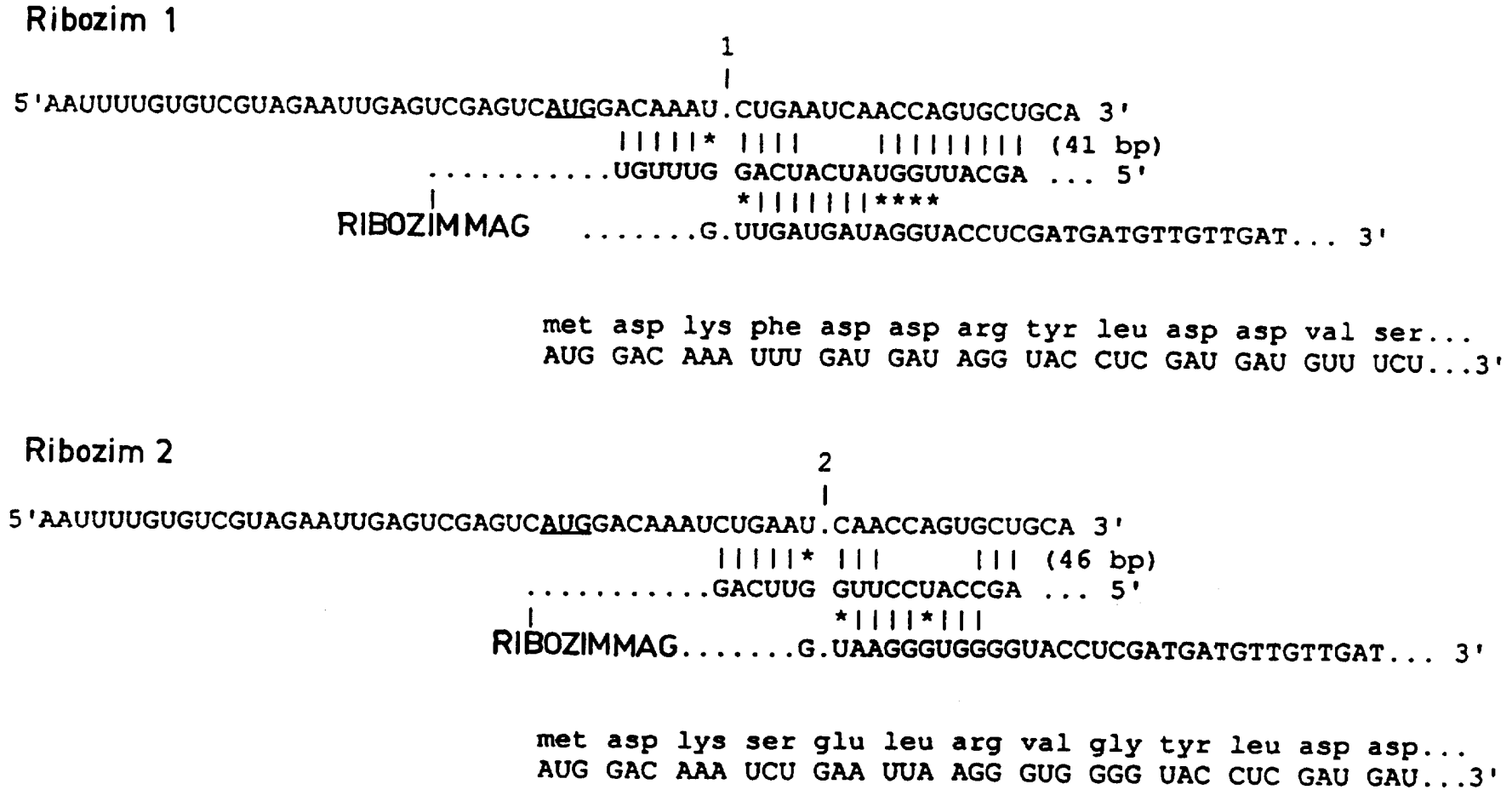
```
                                                                  1         2
                                                                  |         |
WD      UUUGCGUCU.......UAGUGUGCCU AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU
Q       UUUGCGUCUCAG.......UGUGCCU AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU
Fny     UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
M       UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAU AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
I       UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
O       UUUACGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
Y       UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
D       UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
C       UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
    5'                                                                                3'
```

4A. ábra

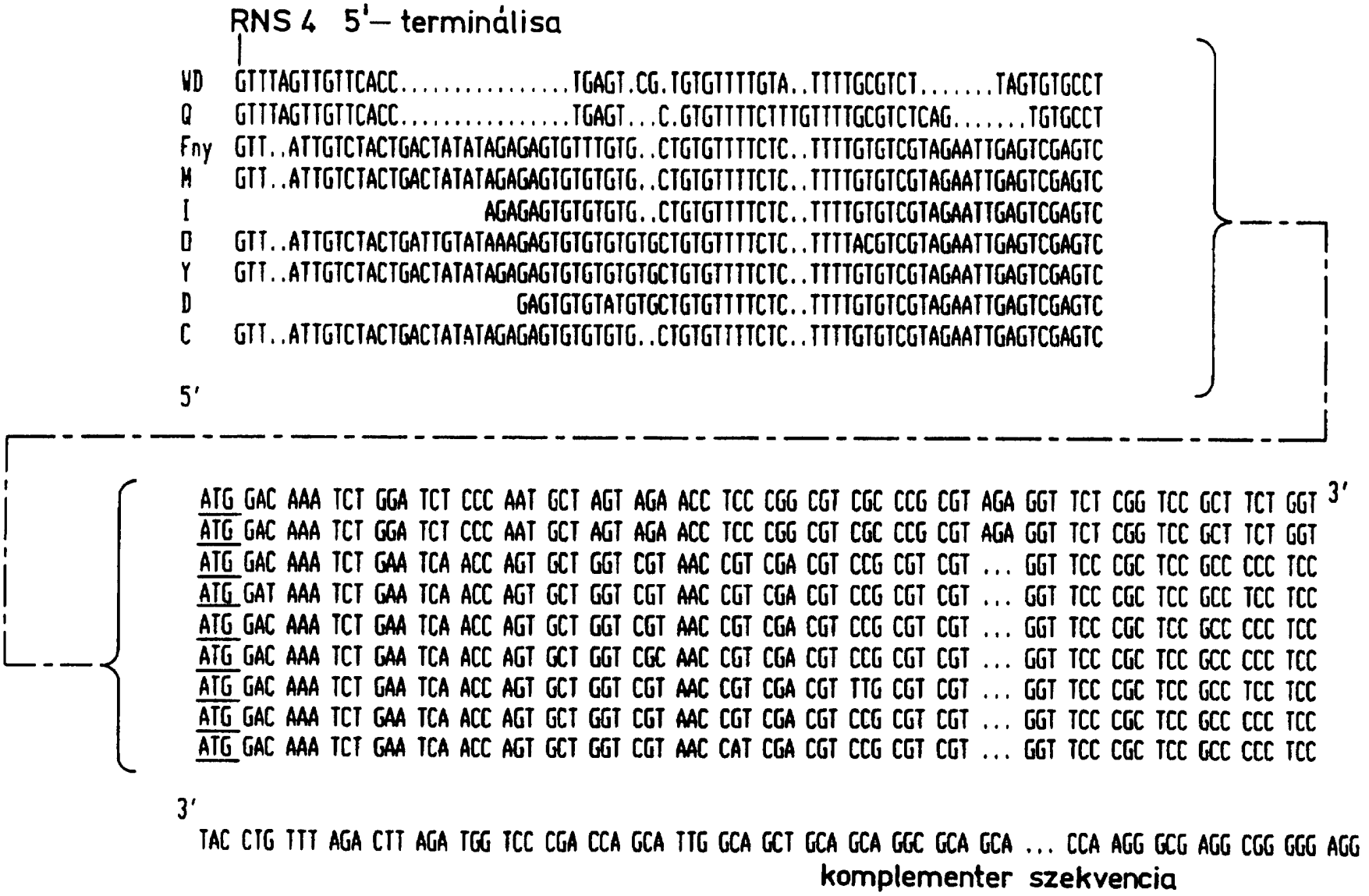


```
                                                  1       2
5'                                                |       |                 3'
  AATTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC ATG GAC AAA T.CT GAA T.CA ACC AGT GCT GCA
      ||||||||||||||||||||||||| ||| ||| ||| | || ||| | || ||| ||| ||
      AACACAGCATCTTAACTCAGCTCAG TAC CTG TTT A.GA CTT A.GT TGG TCA GC
EcoRI                                                                  5'PstI
```

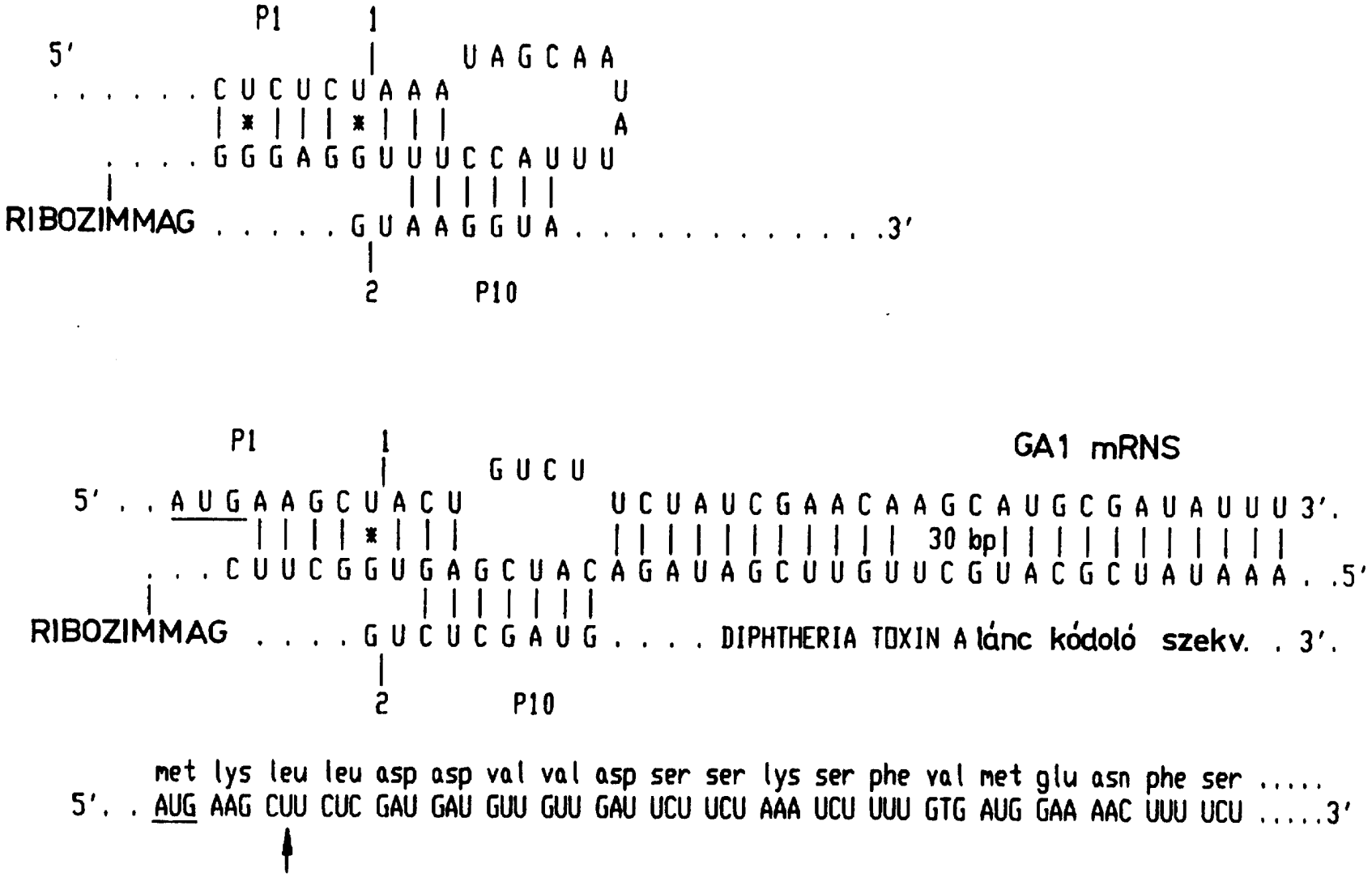
4B. ábra


Ribozim 1
1
5'AAUUUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUCAUGGACAAAU.CUGAAUCAACCAGUGCUGCA 3'
|||||* |||| ||||||||| (41 bp)
.....UGUUUG GACUACUAUGGUUACGA ... 5'
*|||||||****
RIBOZIMMAG .....G.UUGAUGAUAGGUACCUCGATGATGTTGTTGAT... 3'
met asp lys phe asp asp arg tyr leu asp asp val ser...
AUG GAC AAA UUU GAU GAU AGG UAC CUC GAU GAU GUU UCU...3'
Ribozim 2
2
5'AAUUUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUCAUGGACAAAUCUGAAU.CAACCAGUGCUGCA 3'
|||||* ||| ||| (46 bp)
.....GACUUG GUUCCUACCGA ... 5'
|||||||
RIBOZIMMAG.....G.UAAGGGUGGGGUACCUCGATGATGTTGTTGAT... 3'
met asp lys ser glu leu arg val gly tyr leu asp asp...
AUG GAC AAA UCU GAA UUA AGG GUG GGG UAC CUC GAU GAU...3'

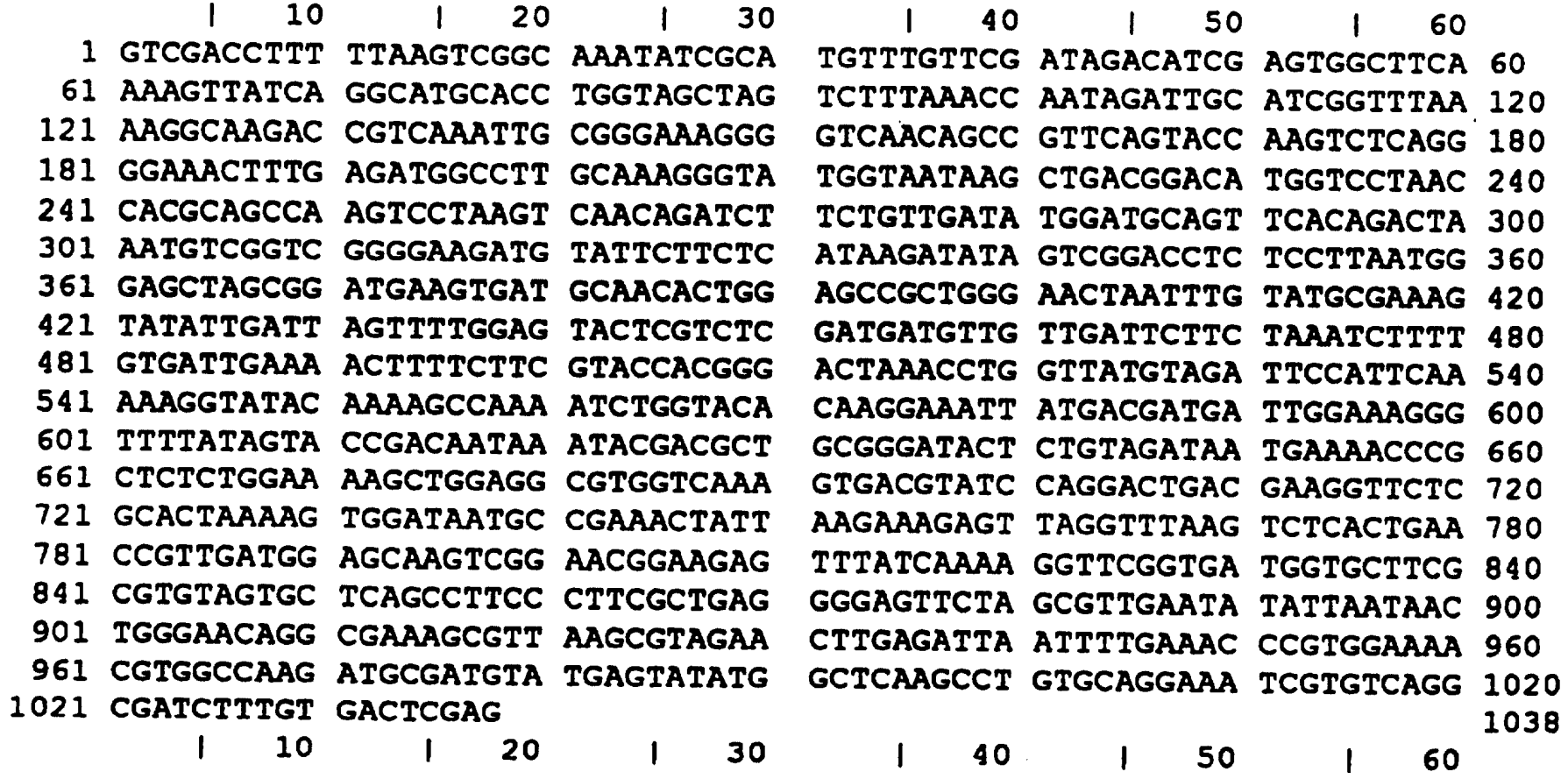
4C. ábra


RNS 4 5'– terminálisa
WD GTTTAGTTGTTCACC.....TGAGT.CG.TGTGTTTTGTA..TTTTGCGTCT.....TAGTGTGCCT
Q GTTTAGTTGTTCACC.....TGAGT...C.GTGTTTTCTTTGTTTTGCGTCTCAG.....TGTGCCT
Fny GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTTTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
M GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
I AGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
D GTT..ATTGTCTACTGATTGTATAAAGAGTGTGTGTGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTACGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
Y GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
D GAGTGTGTATGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
C GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
5'
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT 3'
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAT AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGC AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT TTG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CAT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
3'
TAC CTG TTT AGA CTT AGA TGG TCC CGA CCA GCA TTG GCA GCT GCA GCA GGC GCA GCA ... CCA AGG GCG AGG CGG GGG AGG
komplementer szekvencia

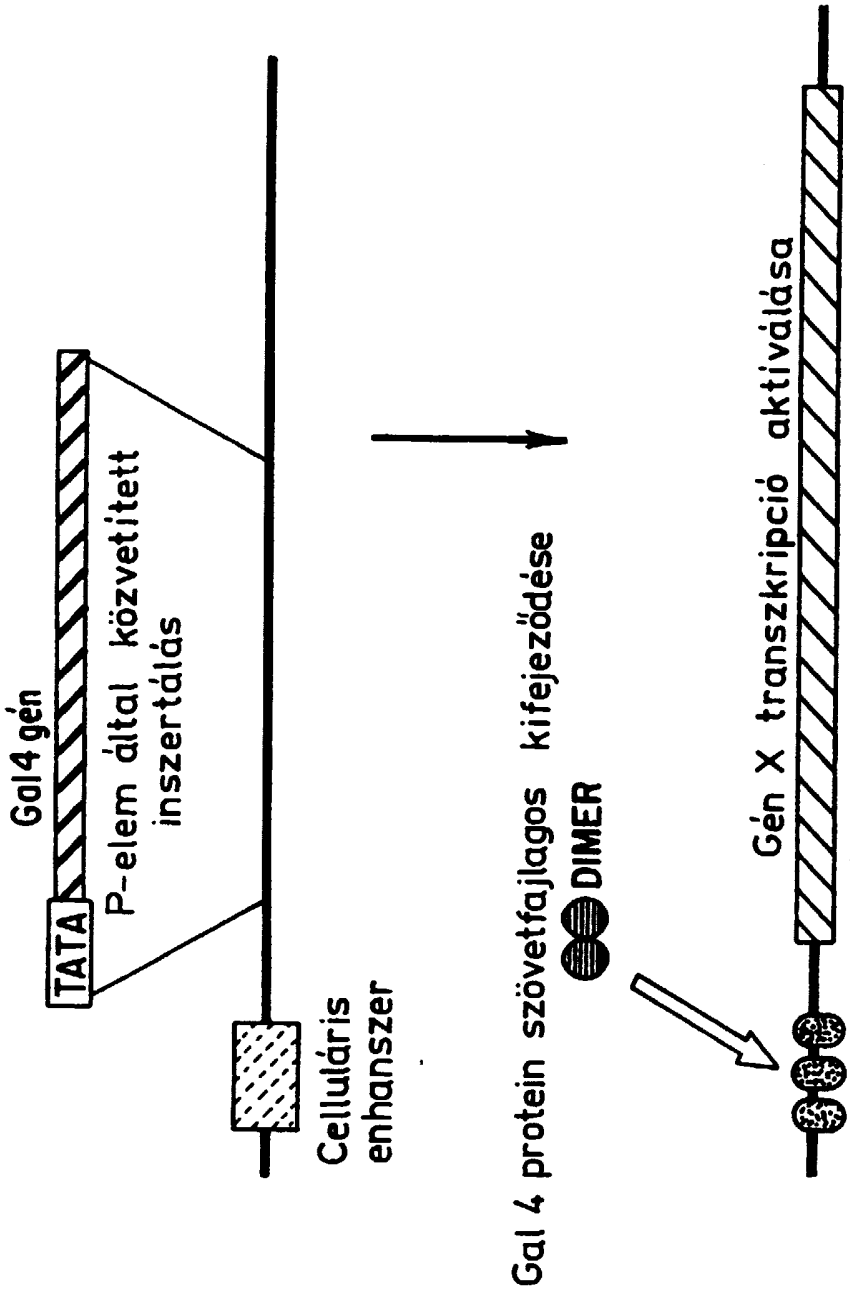
5. ábra


P1
1
5'
U A G C A A
. . . . . C U C U C U A A A U
A
. . . . G G G A G G U U U C C A U U U
RIBOZIMMAG . . . . . G U A A G G U A . . . . . .3'
2
P10
P1
1
G U C U
GA1 mRNS
5' . . A U G A A G C U A C U U C U A U C G A A C A A G C A U G C G A U A U U U 3'.
30 bp
. . . C U U C G G U G A G C U A C A G A U A G C U U G U U C G U A C G C U A U A A A . .5'
RIBOZIMMAG . . . . G U C U C G A U G . . . . DIPHTHERIA TOXIN A lánc kódoló szekv. . 3'.
2
P10
met lys leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser .....
5'. . AUG AAG CUU CUC GAU GAU GUU GUU GAU UCU UCU AAA UCU UUU GTG AUG GAA AAC UUU UCU .....3'

6A. ábra


| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60
1 GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60
61 AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120
121 AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180
181 GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240
241 CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300
301 AATGTCGGTC GGGGAAGATG TATTCTTCTC ATAAGATATA GTCGGACCTC TCCTTAATGG 360
361 GAGCTAGCGG ATGAAGTGAT GCAACACTGG AGCCGCTGGG AACTAATTTG TATGCGAAAG 420
421 TATATTGATT AGTTTTGGAG TACTCGTCTC GATGATGTTG TTGATTCTTC TAAATCTTTT 480
481 GTGATTGAAA ACTTTTCTTC GTACCACGGG ACTAAACCTG GTTATGTAGA TTCCATTCAA 540
541 AAAGGTATAC AAAAGCCAAA ATCTGGTACA CAAGGAAATT ATGACGATGA TTGGAAAGGG 600
601 TTTTATAGTA CCGACAATAA ATACGACGCT GCGGGATACT CTGTAGATAA TGAAAACCCG 660
661 CTCTCTGGAA AAGCTGGAGG CGTGGTCAAA GTGACGTATC CAGGACTGAC GAAGGTTCTC 720
721 GCACTAAAAG TGGATAATGC CGAAACTATT AAGAAAGAGT TAGGTTTAAG TCTCACTGAA 780
781 CCGTTGATGG AGCAAGTCGG AACGGAAGAG TTTATCAAAA GGTTCGGTGA TGGTGCTTCG 840
841 CGTGTAGTGC TCAGCCTTCC CTTCGCTGAG GGGAGTTCTA GCGTTGAATA TATTAATAAC 900
901 TGGGAACAGG CGAAAGCGTT AAGCGTAGAA CTTGAGATTA ATTTTGAAAC CCGTGGAAAA 960
961 CGTGGCCAAG ATGCGATGTA TGAGTATATG GCTCAAGCCT GTGCAGGAAA TCGTGTCAGG 1020
1021 CGATCTTTGT GACTCGAG 1038
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60

6B. ábra


Gal4 gén
TATA
P-elem által közvetített inszertálás
Celluláris enhanszer
Gal 4 protein szövetfajlagos kifejeződése
DIMER
Gén X transzkripció aktiválása
UPSTEAM ACTIVATOR SEQUENCES (UAS)

7. ábra

Transzillesztett Gal 4–DTA mRNS transzlációja

5' ↓

ATG AAG CTT CTC GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT AAA TCT TTT GTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 3

met lya leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys

3' exonok transzlációja

Rz-DTA$_{met}$ 5' TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3'

met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys

Rz-DTA$_{ile}$ 5' TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATT GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3'

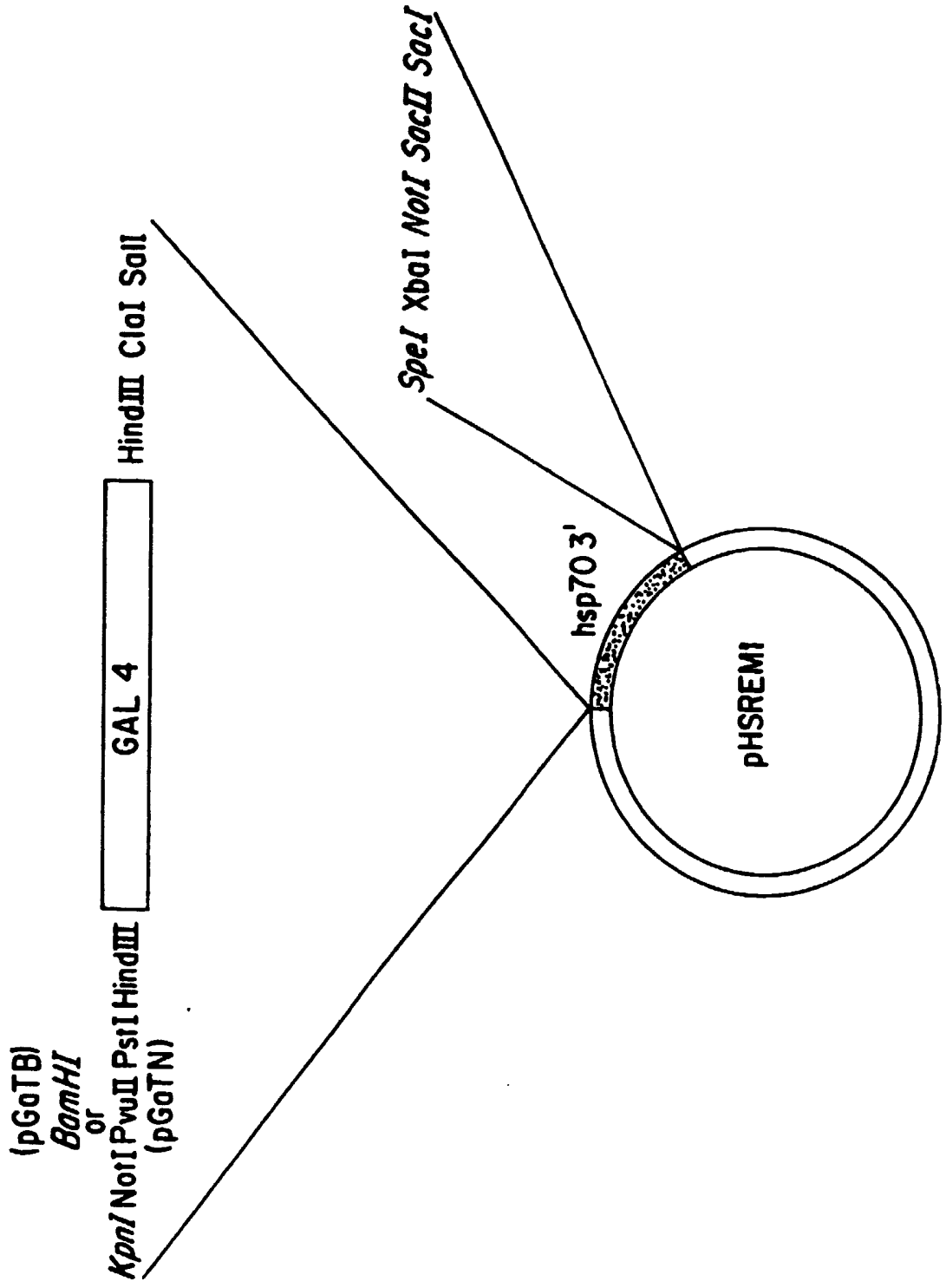
ile

Rz-DTA$_{leu}$ 5' TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG TTG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3'

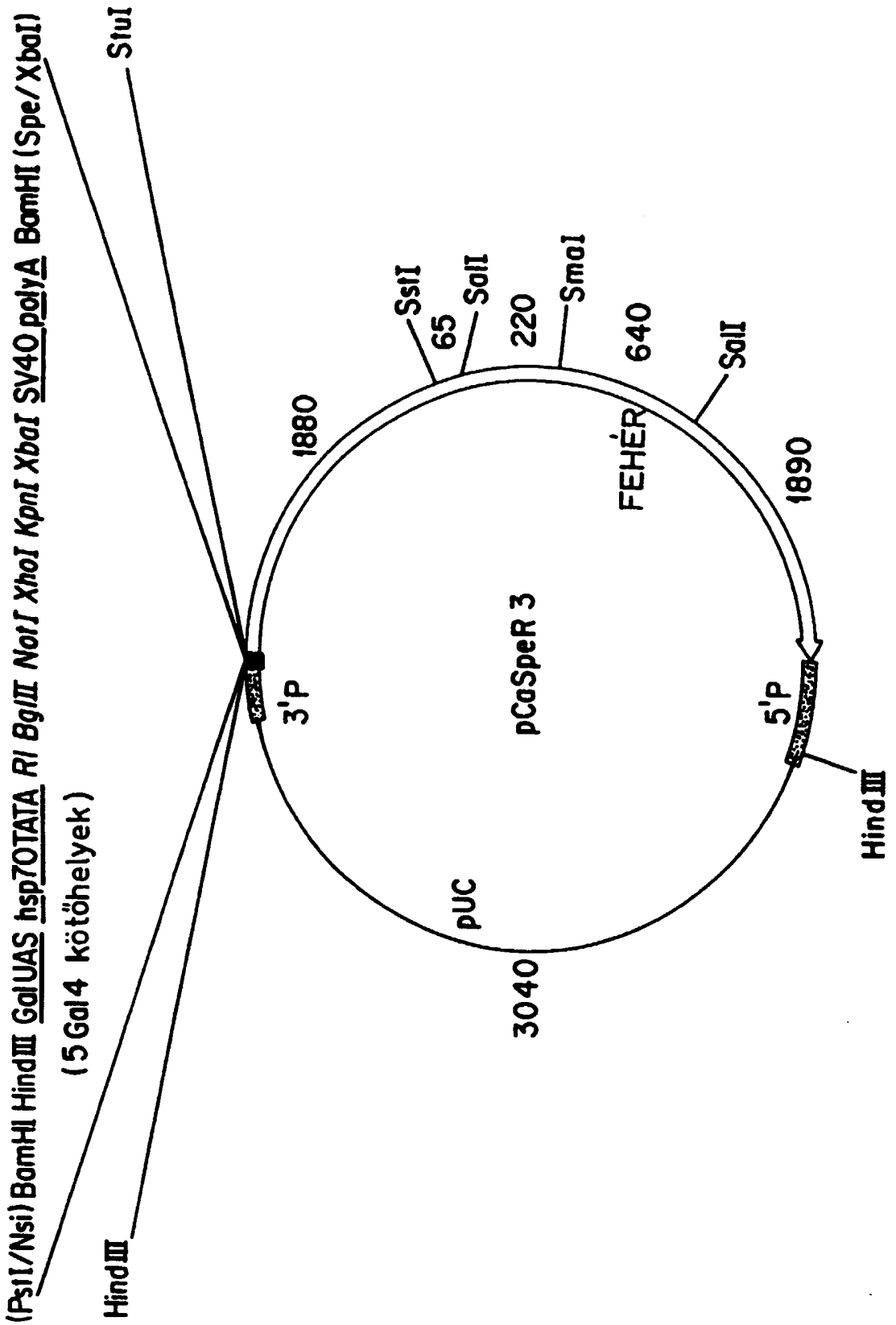
leu

8. ábra

HU 218 733 B
Int. Cl.7: C 12 P 19/34


(pGoTB)
BamHI
or
KpnI NotI PvuII PstI HindIII
(pGoTN)
GAL 4
HindIII ClaI SalI
SpeI XbaI NotI SacII SacI
hsp70 3'
pHSREM1

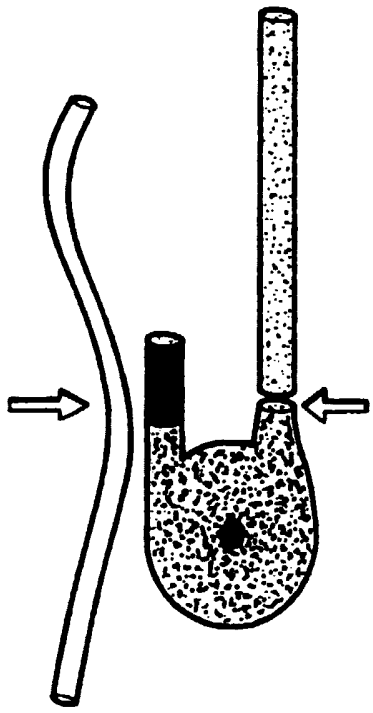
9. ábra


(PstI/NsiI) BamHI HindIII GalUAS hspTOTATA RI BglII NotI XhoI KpnI XbaI SV40 polyA BamHI (Spe/XbaI)
(5 Gal4 kötőhelyek)
StuI
HindIII
1880
SstI
65
SalI
220
SmaI
640
SalI
FEHÉR
1890
3'P
pCaSpeR 3
5'P
HindIII
pUC
3040

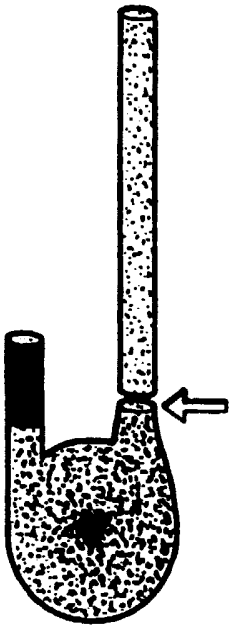
10. ábra



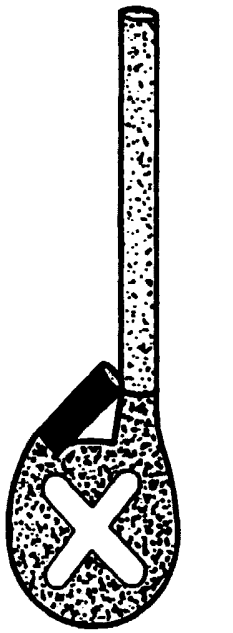
11. ábra



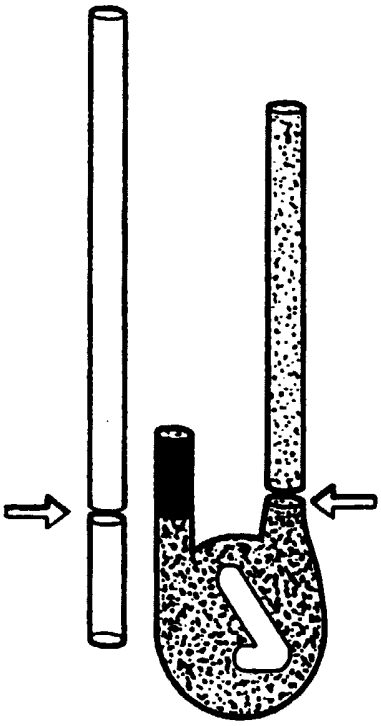
12A. ábra



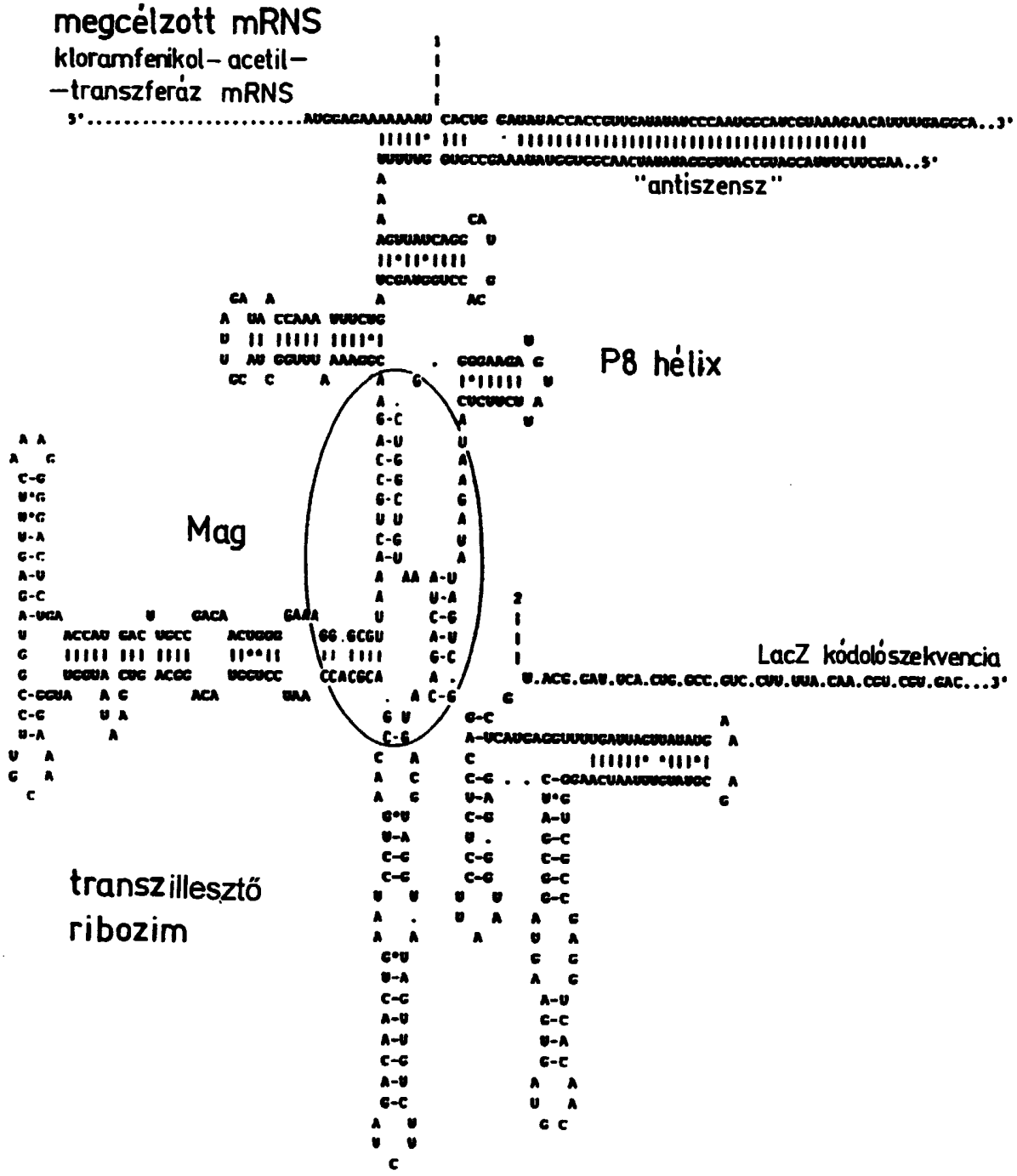
12B. ábra



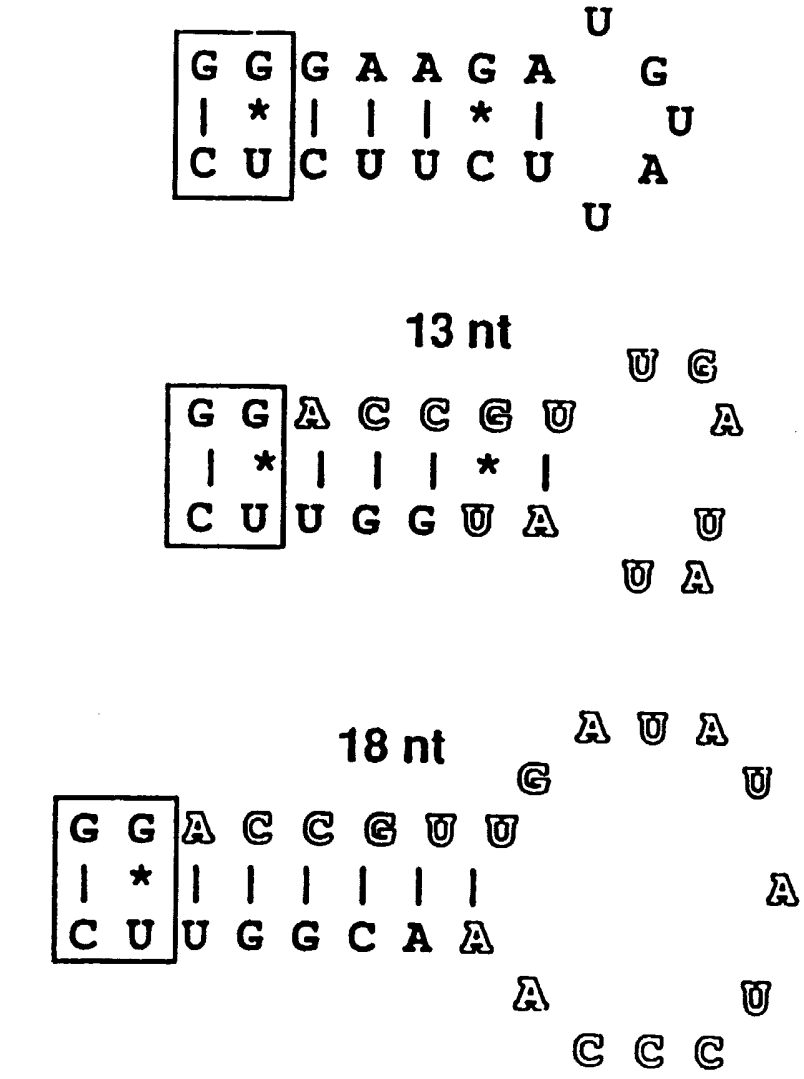
12C. ábra



12D. ábra

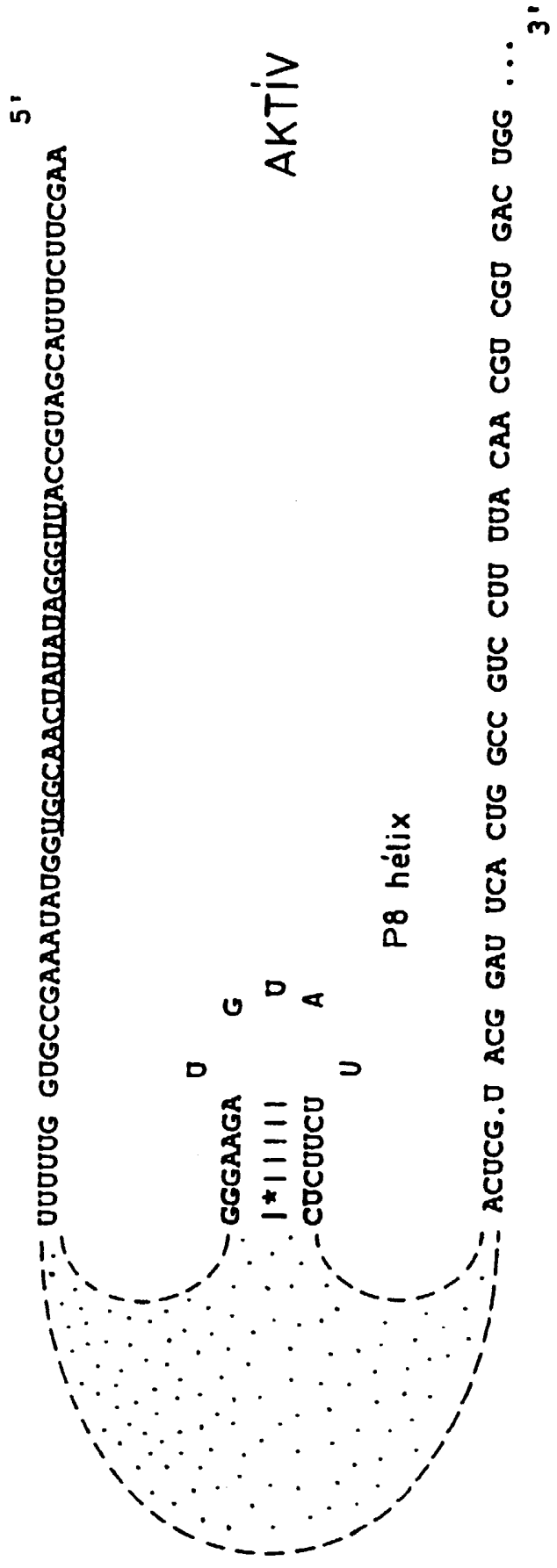

megcélzott mRNS
kloramfenikol-acetil-
-transzferáz mRNS
"antiszensz"
P8 hélix
Mag
LacZ kódolószekvencia
transzillesztő
ribozim

13A. ábra

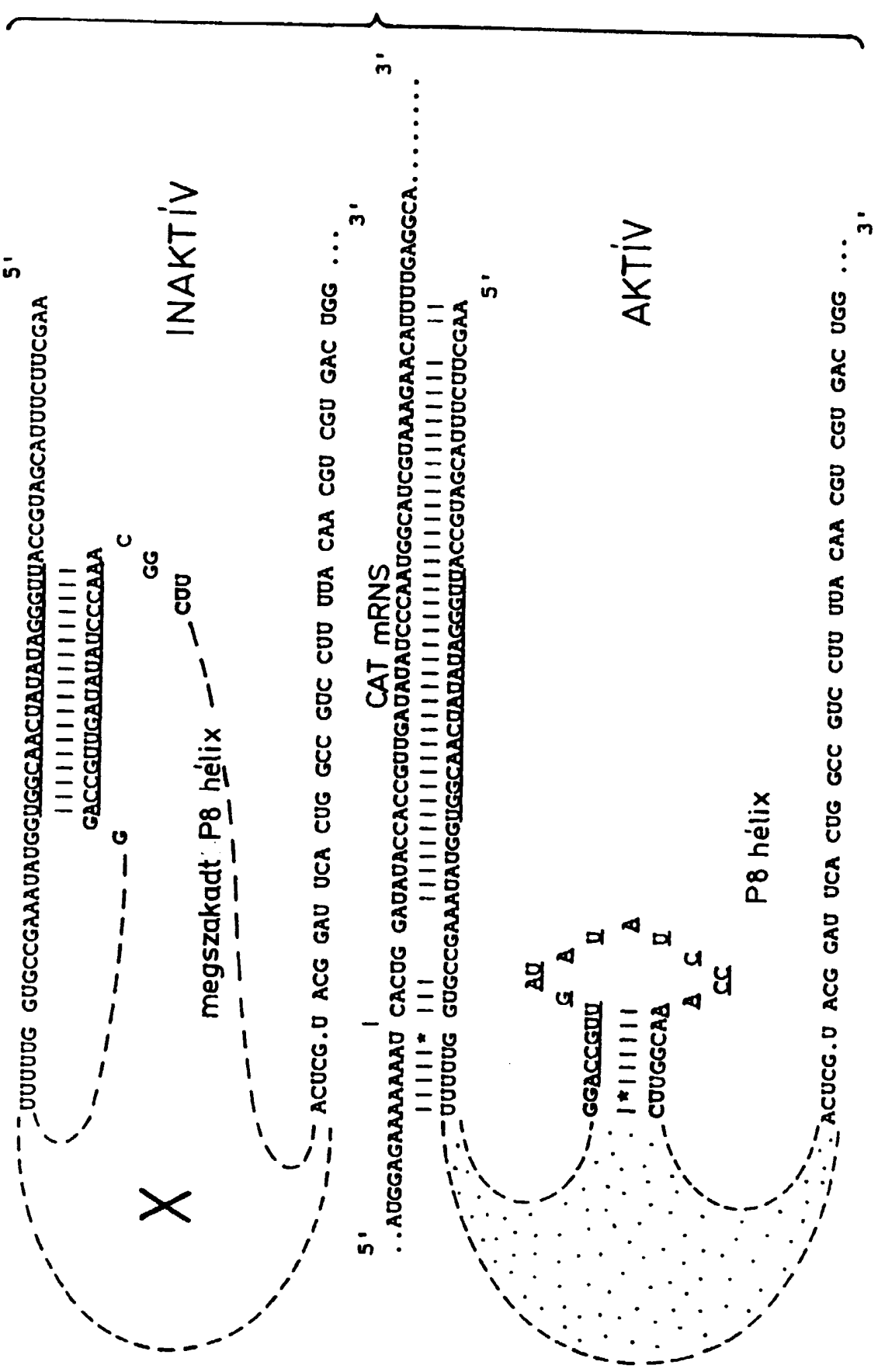


N = „antiszensz"– re komplementer

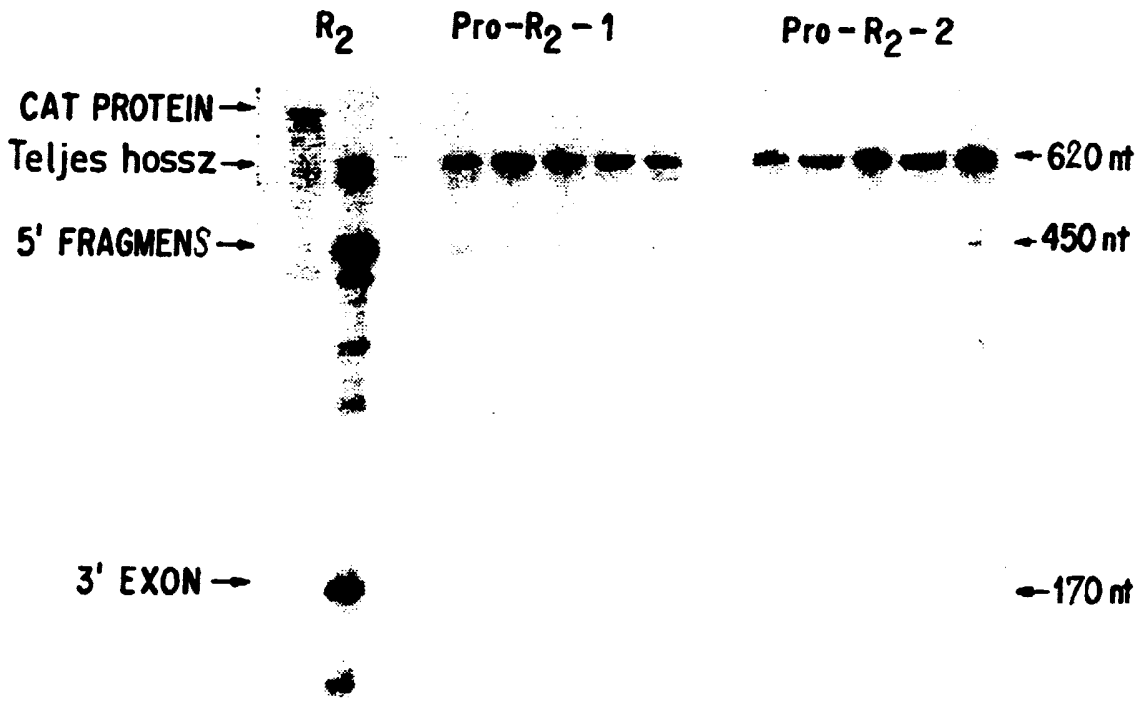
13B. ábra


5'
UUUUUG GUGCCGAAAUAUGGUGGCAACUAUAUAGGGUUACCGUAGCAUUUCUUCGAA
GGGAAGA
CUCUUCU
U
U
G
U
A
ACUCG.U ACG GAU UCA CUG GCC GUC CUU UUA CAA CGU CGU GAC UGG ...
3'
P8 hélix
AKTÍV

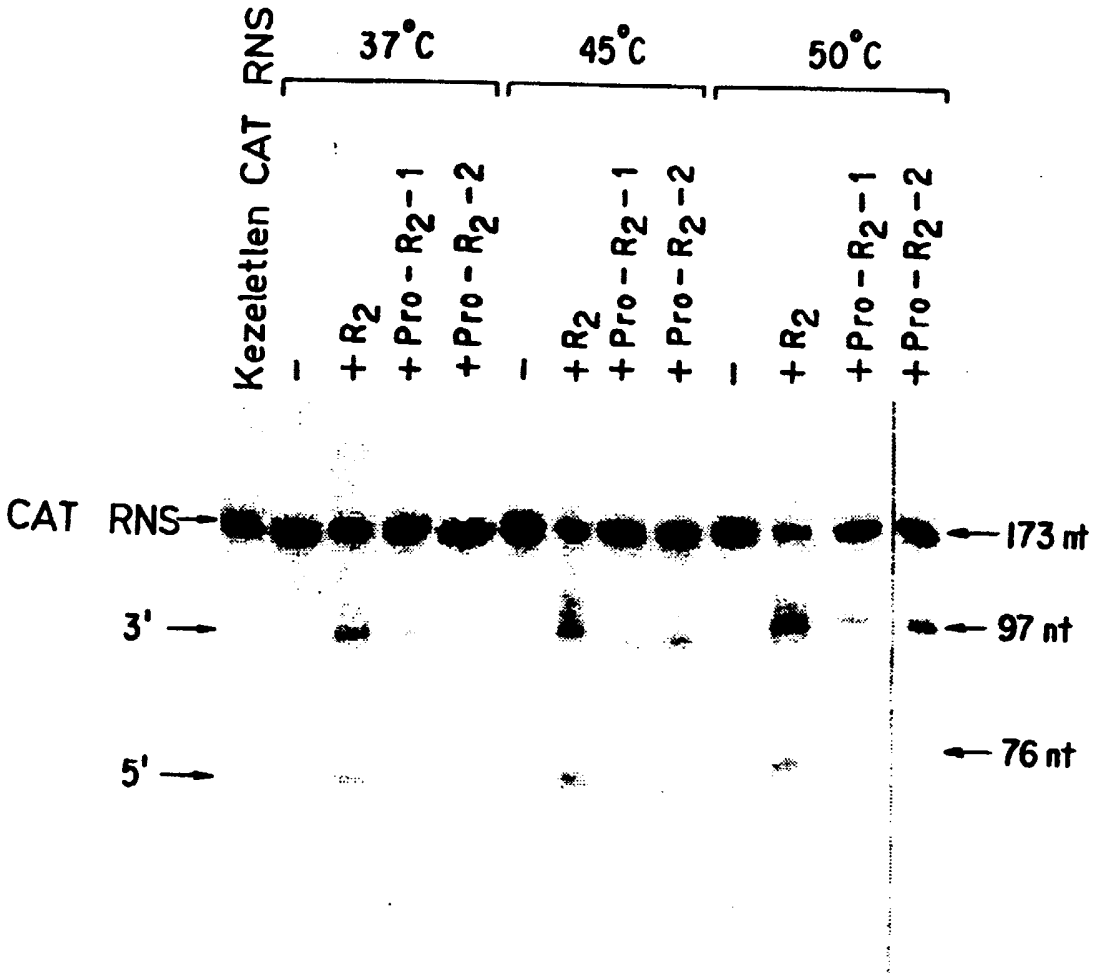
14A. ábra



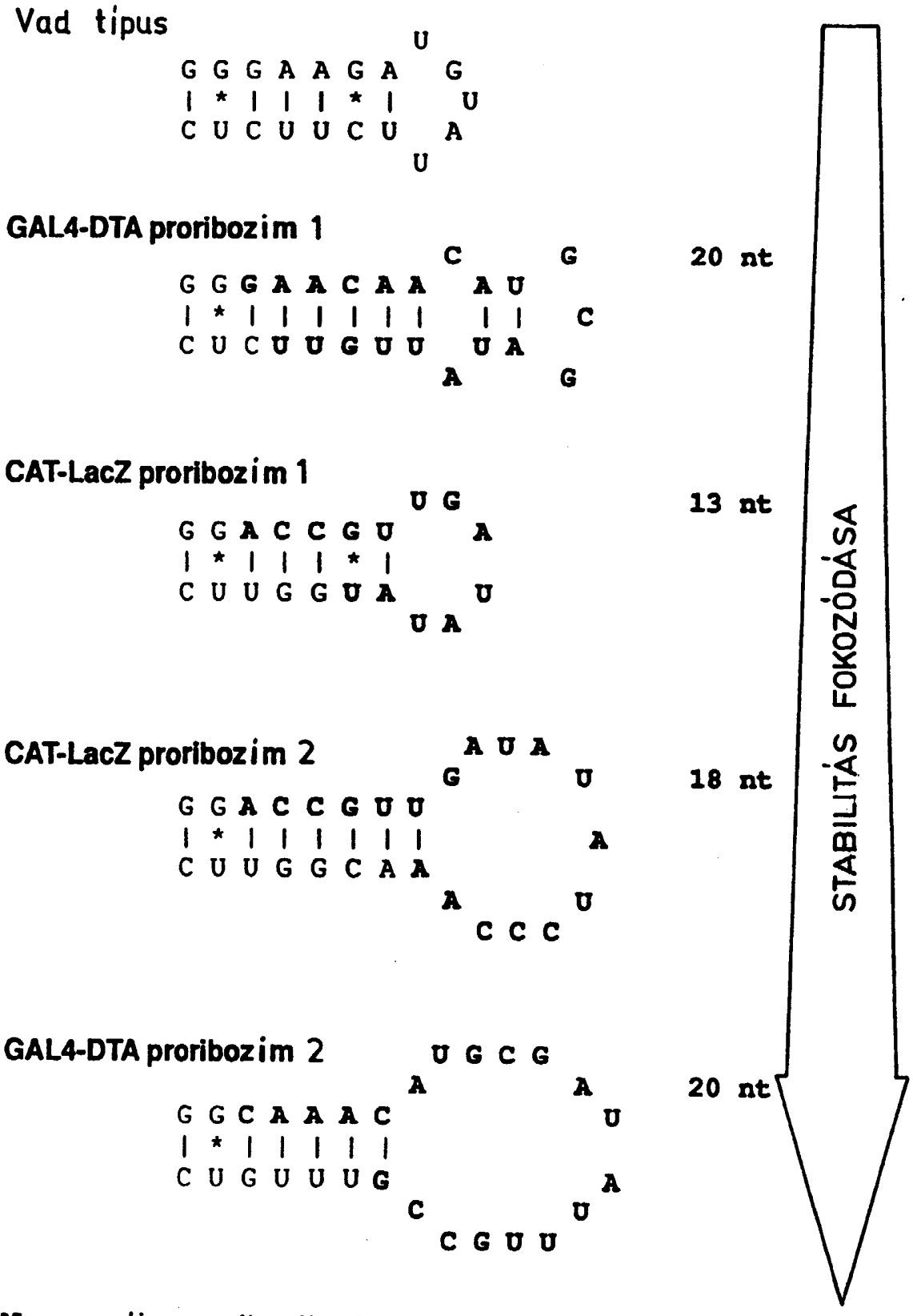
14B. ábra


R2
Pro-R2-1
Pro-R2-2
CAT PROTEIN
Teljes hossz
5' FRAGMENS
3' EXON
620 nt
450 nt
170 nt

15. ábra

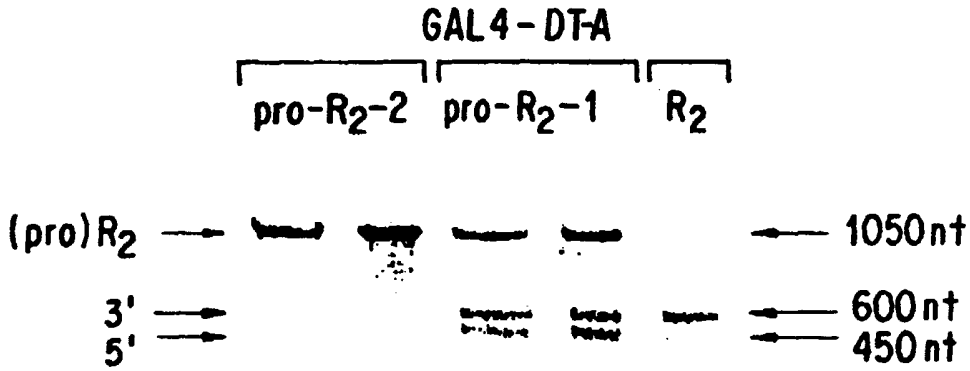

RNS
37°C
45°C
50°C
Kezeletlen CAT
-
+ R2
+ Pro - R2 - 1
+ Pro - R2 - 2
CAT RNS
3'
5'
173 nt
97 nt
76 nt

16. ábra



N = „antiszensz" ribozimra komplementer

17. ábra



18. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest