



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 21 550 T2** 2008.04.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 432 819 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 21 550.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/04258**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 760 417.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/031612**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.09.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.04.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.06.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **01.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.04.2008**

(30) Unionspriorität:

0123856 05.10.2001 GB

(73) Patentinhaber:

**GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont,
Buckinghamshire, GB; Cancer Research
Technology Ltd., London, GB**

(74) Vertreter:

**Hammonds Rechtsanwälte Patentanwälte, 80539
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**PINES, Jonathon Noe Welcome/Canc, Tennis
Court Road Cambridge CB2 1QR, GB; THOMAS,
Nicholas Amersham Biosciences UK Ltd, Cardiff,
South Glamorgan CF14 7YT, GB; JONES, Anne
Elizabeth Amersham Biosciences, Cardiff, South
Glamorgan CF14 7YT, GB; GOODYER, Ian David
Amersham Biosciences UK Lt, Cardiff, South
Glamorgan CF14 7YT, GB; FRANCIS, Michael John
Amersham Biosciences UK, Cardiff, South
Glamorgan CF14 7YT, GB; ISMAIL, Rahman Aziz
Amersham Biosciences UK, Cardiff, South
Glamorgan CF14 7YT, GB; KENDALL, Jonathan
Mark Amersham Biosciences U, Cardiff, South
Glamorgan CF14 7YT, GB**

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR BESTIMMUNG DER ZELLYKLUSPOSITION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen neuen, nicht-destruktiven und dynamischen Prozess zum Bestimmen der Zellzyklusposition lebender Zellen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eukariotische Zellteilung findet statt durch einen stark regulierten Zellzyklus, umfassend aufeinanderfolgende Phasen, die genannt werden G1, S, G2 und M. Unterbrechung des Zellzyklus oder der Zellzyklussteuerung kann zu zellulären Abnormalitäten oder Erkrankungszuständen, wie Krebs, führen, die auf mehrfache genetische Änderungen zurückzuführen sind, die Wachstums-beschränkte Zellen zu hoch invasiven Zellen umwandeln, die gegenüber normaler Steuerung des Wachstums unempfindlich sind. Der Übergang normaler Zellen zu Krebszellen kann auftreten durch Verlust einer korrekten Funktion in der DNA-Replikation und in DNA-Reperaturmechanismen. Alle teilenden Zellen unterliegen einer Anzahl von Steuerungsmechanismen, bekannt als Zellzyklus-Prüfpunkte, die die Genomintegrität aufrecht erhalten durch Einfangen oder Induzieren der Zerstörung von abnormalen Zellen. Die Untersuchung der Zellzyklus-Progression und -Steuerung ist demzufolge von signifikantem Interesse beim Entwerfen von Antikrebs-Arzneimitteln (Flatt, P.M. and Pietenpol, J.A. Drug Metab. Rev., (2000), 32(3-4), 283-305; Buolamwini, J.K. Current Pharmaceutical Design, (2000), 6, 379-392).

[0003] Die genaue Bestimmung des Zellzyklusstatus ist ein Schlüsselerfordernis für das Untersuchen zellulärer Prozesse, die den Zellzyklus beeinflussen oder abhängen von der Zellzyklusposition. Derartige Messungen sind besonders entscheidend bei Anwendungen des Arzneimittelscreenings, bei denen:

- i) Substanzen, die direkt oder indirekt die Zellzyklusprogression modifizieren, erwünscht sind, z.B. für eine Untersuchung als mögliche Antikrebsbehandlungen;
- ii) Arzneimittelkandidaten überprüft werden müssen auf unerwünschte Effekte auf die Zellzyklusprogression; und/oder
- iii) der Verdacht besteht, dass ein Mittel aktiv oder inaktiv gegenüber Zellen in einer besonderen Phase des Zellzyklus ist.

[0004] Traditionell wurde der Zellzyklusstatus für Populationen bestimmt durch Flusszytometrie unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die den DNA-Gehalt von Zellkernen anfärben (Barlogie, B. et al, Cancer Res., (1983), 43(9), 3982-97). Durchflusszytometrie ergibt eine quantitative Information über den DNA-Gehalt von Zellen und erlaubt daher die Bestimmung der relativen Anzahl der Zellen in den G1-, S- und G2- + M-Phasen des Zellzyklus. Jedoch ist diese Analyse ein destruktiver, nicht-dynamischer Prozess und erfordert eine serielle Probennahme einer Population, um den Zellzyklusstatus mit der Zeit zu bestimmen. Außerdem untersuchen Standard-Durchflusszytometrietechniken die gesamte Zellpopulation in der Probe und ergeben begrenzte Daten über individuelle Zellen, was die Studie des Zellzyklusstatus verschiedener Zelltypen, die innerhalb der Probe unter Analyse vorhanden sein können, ausschließt.

[0005] EP 798386 beschreibt ein Verfahren zur Analyse des Zellzyklus von Zellunterpopulationen, die in heterogenen Zellproben vorhanden sind. Dieses Verfahren nutzt eine sequentielle Inkubation der Probe mit fluoreszierend markierten monoklonalen Antikörpern, um spezielle Zelltypen und ein Fluorochrom zu identifizieren, das speziell an Nukleinsäuren bindet. Dies ermöglicht die Bestimmung der Zellzyklusverteilung von Unterpopulationen von Zellen, die in der Probe vorhanden sind. Jedoch, da dieses Verfahren Durchflusszytometrie nutzt, ergibt es immer noch nicht-dynamische Daten und erfordert, dass serielle Messungen mit getrennten Zellproben ausgeführt werden, um Variationen im Zellzyklusstatus einer Zellpopulation mit der Zeit nach dem Einwirken eines Mittels, das auf Effekte der Zellzyklusprogression untersucht wird, zu bestimmen.

[0006] Ein weiterer Nachteil der Durchflusszytometrietechniken bezieht sich auf die indirekte und abgeleitete Zuordnung der Zellzyklusposition von Zellen, basierend auf dem DNA-Gehalt. Da der DNA-Gehalt von Zellkernen durch den Zellzyklus auf eine vernünftig vorhersagbare Weise variiert, d.h. Zellen in G2 oder M besitzen den zweifachen DNA-Gehalt von Zellen in G1, und eine Zellen-DNA-Synthese durchlaufende in einer S-Phase eine Zwischenmenge DNA aufweisen, ist es möglich, die relative Verteilung von Zellen zwischen verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu überwachen. Jedoch ermöglicht die Technik keine Präzision beim Bestimmen der Zellzyklusposition beliebiger individueller Zellen auf Grund einer Uneindeutigkeit beim Zuordnen von Zellen zu G2- oder M-Phasen und weiterer Ungenauigkeit, die auf eine inhärente Variation im DNA-Gehalt von Zelle zu Zelle innerhalb einer Population zurückzuführen ist, was eine genaue Unterscheidung zwischen Zellen aus-

schließt, die nahe der Grenze zwischen benachbarten Phasen des Zellzyklus sind. Zusätzlich erfordern Variationen im DNA-Gehalt und beim DNA-Färben zwischen verschiedenen Zelltypen von verschiedenen Geweben oder Organismen, dass die Technik optimiert wird auf jeden Zelltyp, und können einen direkten Vergleich von Daten zwischen Zelltypen oder zwischen Experimenten kompliziert machen (Herman, *Cancer* (1992), 69(6), 1553-1556). Durchflusszytometrie ist deshalb geeignet zum Untersuchen der gesamten Zellzyklusverteilung von Zellen innerhalb einer Population, kann aber nicht verwendet werden, um den präzisen Zellzyklusstatus einer individuellen Zelle über die Zeit zu überwachen.

[0007] Die Zellzyklusprogression ist stark reguliert durch definierte zeitliche und räumliche Expression, Lokalisation und Zerstörung einer Anzahl von Zellzyklusregulatoren, die ein hoch dynamisches Verhalten während des Zyklus zeigen (eines, J., *Nature Cell Biology*, (1999), 1, E73-E79). Zum Beispiel translozieren an spezifischen Zellzyklusstufen einige Proteine vom Nukleus zum Cytoplasma oder vice versa, und einige werden schnell abgebaut. Für Details bekannter Zellzyklussteuerkomponenten und -wechselwirkungen, siehe Kohn, *Molecular Biology of the Cell* (1999), 10, 2703-2734.

[0008] Einer der am umfangreichsten charakterisierten Zellzyklusregulatoren in menschlichen Zellen ist Cyclin-B1, dessen zeitliche und räumliche Expression und Zerstörung den Zellübergang von G2 zu M und ihren Austritt aus M steuert. Eine Cyclin-B1-Expression wird angetrieben durch einen Zellzyklusphasen-spezifischen Promotor, der die Expression am Ende der S-Phase initiiert und zum Höhepunkt während G2 bringt. Sobald es exprimiert ist, pendelt dieses Protein konstant zwischen dem Kern und dem Cytoplasma während der G2-Phase, aber es ist vorwiegend cytoplasmatisch, weil die Geschwindigkeit seines Austritts viel größer ist als seines Eintritts. Beim Beginn der Mitose transloziert Cyclin-B1 schnell in den Kern, wenn seine Geschwindigkeit des Eintritts wesentlich ansteigt, und sein Austritt abnimmt, in einer von der Phosphorylierung abhängigen Weise ([Fig. 1](#)). So kann die Lokalisation des Cyclin-B1 in der Zelle verwendet werden, um den Übergang von der G2-Phase zur Mitose zu markieren. Sobald eine Zelle die Metaphase erreicht, oder genauer, wenn der Spindelapparat-Prüfpunkt erfüllt ist, wird Cyclin-B1 sehr schnell abgebaut. Der Cyclin-B1-Abbau wird fortgesetzt durch die folgende G1-Phase, endet aber, sobald Zellen die DNA-Replikation beginnen. Diese Ereignisse wurden veranschaulicht in Echtzeit durch Mikro-Injektion von fluoreszierend markiertem Cyclin-B1 in lebende Zellen (Clute and Pines, *Nature Cell Biology*, (1999), 1, 82-87).

[0009] Die Steuerelemente, die die zeitliche Expression und Zerstörung regulieren, wurden in einer Anzahl von Studien aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass die Biosynthese von Cyclin-B1 auf dem Niveau der Transkription durch eine Promotor-Sequenz gesteuert wird, die die Expression auf die späten S- und G2-Phasen des Zellzyklus beschränkt (Piaggio et al, *Exp. Cell Research*, (1995), 216, 396-402; Cogswell et al, *Mol. Cell. Biology*, (1995), 15, 2782-2790). Es wurde gezeigt, dass die Zerstörung von Cyclin-B1 zum geeigneten Zeitpunkt in der M-Phase gesteuert wird durch eine 9-Aminosäure-Sequenz, die als die Destruktionsbox (D-Box) bezeichnet wird, die auf das Protein für die Proteolyse über Ubiquitylierung abzielt. Die Expression eines Drosophila-Cyclin-B-GFP-Fusionsproteins, angetrieben durch einen konstitutiven Polyubiquitin-Promotor (Huang and Raff, *EMBO Journal*, (1999), 18(8), 2184-2195) zeigte, dass mit einem Fluoreszenztag versehenes Cyclin-B das Verhalten von endogenem Cyclin-B beim abgebaut werden am Ende der Metaphase nachahmt. Studien (Hagting et al, *Current Biology*, (1999), 9, 680-689) unter Verwenden von menschlichem Cyclin-B1-GFP zeigten, dass zeitliche Änderungen in der cytoplasmatischen und kern-Lokalisation von Cyclin-B1 mit der Zellzyklusprogression abhängig sind von einem nuklearen Exportsignal (NES), dessen Phosphorylierung zum nuklearen Import führt.

[0010] Andere Zellzyklusprüfpunkte werden ähnlich reguliert durch zeitliche und räumliche Steuermechanismen und viele der Komponenten und Zusammenhänge wurden aufgeklärt (eines, J., *Nature Cell Biology*, (1999), 1, E73-E79).

[0011] Eine Anzahl von Verfahren wurden beschrieben, die Gebrauch von bestimmten Komponenten der Zellzyklussteuermechanismen machen, um Prozeduren bereitzustellen, die den Zellproliferationsstatus analysieren oder ausnutzen.

[0012] Mateus, C und Avery, S. (*Yeast* (2000), 16, 1313-1323) beschreiben die Expression eines destabilisierten GFP-Proteins in Hefe als ein Reportergen, um Zellzyklusvermittelte Genexpression zu studieren. Das Konstrukt besteht aus einem GFP, das an die PEST-Domäne vom C-Terminus der Hefe G1-Cyclin CLn2 fusioniert ist und unter der Steuerung des CLn2-Promotors exprimiert wird. Es wurde beobachtet, dass dieses Konstrukt, wenn es in synchronen Kulturen von Hefezellen exprimiert wird, ergibt eine Expressionskinetik, die mit jener konsistent ist, die zuvor für CLn2 berichtet wurde; das Auftauchen von GFP über Aktivierung des CLn2-Promotors und den Zerfall des destabilisierten GFP über Ubiquitin-abhängigen Abbau. Das beschrieb-

ne Durchflusszytometrieverfahren ist spezifisch für Hefezellen und würde nicht geeignet sein zum Bestimmen der Zellzyklusposition individueller Zellen in asynchronen Kulturen.

[0013] WO 00/29602 beschreibt die Verwendung eines Cyclin-A-Promotors, um die Expression von GFP als einen auswählbaren Marker zum Teilen von transgenen Stammzellen anzutreiben, um zu ermöglichen, dass sich teilende Zellen von einem Hintergrund sich nicht teilender Zellen durch Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren isoliert werden. Während dieses Verfahren die Identifizierung und Auswahl von Zellen ermöglicht, die hinter eine bestimmte Stufe im Zellzyklus vorangeschritten sind, ergibt es keine Information über den Zellzyklusstatus einer beliebigen gegebenen Zelle, außer jene historische Information, dass die Zelle die G2-Phase des Zellzyklus zu irgendeinem Zeitpunkt in der Vergangenheit durchlaufen hat oder nicht.

[0014] US 6048693 beschreibt ein Verfahren zum Screenen nach Verbindungen, die Zellzyklusregulatorproteine beeinflussen, wobei die Expression eines Reportergens verbunden ist mit Steuerelementen, auf die eingewirkt wird durch Cycline oder andere Zellzyklussteuerproteine. In diesen Verfahren wird die zeitliche Expression eines Reportergenprodukts angetrieben in einer Zellzyklus-spezifischen Weise, und Verbindungen, die auf eine oder mehrere Zellzyklussteuerkomponenten wirken, können Expressionsniveaus steigern oder verringern. Da das Assaysystem keine Elemente enthält, die für die Zerstörung des Reportergenproduktes, noch für die Zerstörung irgendeines Signals, das von dem Reportergen auftritt, sorgen, kann das Verfahren keine Information über die Zellzyklusposition beliebiger Zellen im Assay liefern und berichtet nur über allgemeine Störungen der Zellzyklussteuermechanismen.

[0015] US 5849508 und US 6103887 beschreiben Verfahren zum Bestimmen des Proliferationsstatus von Zellen durch die Verwendung von Antikörpern, die an Cyclin-A binden. Diese Verfahren liefern Mittel zum Bestimmen des Prozentsatzes proliferierender Zellen in einer Testpopulation im Vergleich zu einer Kontrollpopulation.

[0016] US 6159691 bezieht sich auf ein Verfahren zum Ausführen eines Assays nach vermeintlichen Regulatoren der Zellzyklusprogression. In diesem Verfahren werden nukleare Lokalisationssignale (NLS), die von den Zellzyklusphasen-spezifischen Transkriptionsfaktoren DP-3 und E2F-1 erhalten sind, verwendet, um die Aktivität von Verbindungen mit einem Assay zu untersuchen, die als Agonisten oder Antagonisten wirken, um die nukleare Lokalisation eines NLS, das an einen detektierbaren Marker fusioniert ist, zu vergrößern oder zu verringern.

[0017] Eine Anzahl von Forschern studierten den Zellzyklus unter Verwenden von traditionellen Reporter-molekülen, die erfordern, dass die Zellen fixiert oder lysiert werden. Zum Beispiel verwendeten Hauser und Bauer (Plant and Soil, 2000, 226, S 1-10) β -Glucoronidase (GUS), um die Zellteilung in einem Pflanzen-Meristem zu studieren, und Brandeis und Hunt (EMBO J., 1996, Band 15, S. 5280-5289) verwendeten Chloramphenicolacetyl-transferase(CAT)-Fusionsproteine, um Variationen in Cyclinggehalten zu studieren. Obwohl diese Verfahren ein Mittel zum Studieren der Zellzyklusposition einer besonderen Zelle (unter Verwenden von GUS) oder des durchschnittlichen Zellzyklusstatus einer Population von Zellen (unter Verwenden von CAT) liefern, sind beide Verfahren destruktiv. Keines der Verfahren ermöglicht die Wiederholung der Analyse einer spezifischen Zelle über die Zeit und sie sind deshalb nicht geeignet, um die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus zu verfolgen.

[0018] Keines der vorstehenden Verfahren, die Komponenten des Zellzyklussteuermechanismus nutzen, stellen Mittel bereit zum Bestimmen des Zellzyklusstatus einer individuellen Zelle oder einer Population von Zellen. Demzufolge sind Verfahren erforderlich, die es ermöglichen, die Zellzyklusposition einer einzelnen lebenden Zelle nicht-destruktiv zu bestimmen, wobei ermöglicht wird, dass dieselbe Zelle wiederholt über die Zeit abgefragt wird, und die die Studie der Effekte von Mitteln ermöglichen, die möglicherweise erwünschte oder unerwünschte Effekte auf den Zellzyklus besitzen. Außerdem ist es erwünscht, dass die Zellzyklusposition von einer Sonde bestimmt wird, die direkt durch Zellzyklussteuerkomponenten gesteuert wird, eher als indirekt durch DNA-Gehalt oder andere indirekte Marker der Zellzyklusposition, wie oben beschrieben. Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, das Schlüsselkomponenten der Zellzyklusregulationsmaschinerie in definierten Kombinationen nutzt, um neue Mittel zum Bestimmen des Zellzyklusstatus für individuelle lebende Säugerzellen in einem nicht-destruktiven Prozess, der ein dynamisches Auslesen bereitstellt, nutzt.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt bereit DNA-Konstrukte und Zelllinien, die derartige Konstrukte enthalten, die eine Aktivierung und Zerstörung eines detektierbaren Reporter-moleküls in einer Zellzyklusphasen-spezifischen Weise zeigt, durch direkte Verknüpfung des Reportersignalschaltens an zeitliche und räumliche Expression und Zerstörung von Zellzykluskomponenten. Dies verbessert stark die Präzision der Bestimmung des

Zellzyklusphasenstatus und ermöglicht das kontinuierliche Überwachen der Zellzyklusprogressionen in individuellen Zellen. Außerdem wurde gefunden, dass Schlüsselsteuerelemente isoliert und abstrahiert werden können von funktionellen Elementen des Zellzyklussteuermechanismus, um den Entwurf von Zellzyklusphasenreportern zu ermöglichen, die dynamisch reguliert sind und zusammen mit, aber unabhängig von endogenen Zellzyklussteuerkomponenten arbeiten, und daher Mittel bereitstellen zum Überwachen der Zellzyklusposition ohne Beeinflussen oder Interferieren mit der natürlichen Progression des Zellzyklus.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Demgemäß wird in einem ersten Aspekt der Erfindung bereitgestellt ein Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, kodierend ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

- i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steuerelement,
- ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und
- iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement.

[0021] Die Expression ist dabei definiert als die gesamten Prozesse, die in der Biosynthese eines Proteins von einem Gen involviert sind. Es wird ferner verstanden, dass der Begriff „Lebendzellen“, soweit er sich auf Reportermoleküle bezieht, ein Reportermolekül definiert, das ein detektierbares Signal in lebenden Zellen erzeugt und deshalb geeignet ist zur Verwendung in Lebendzellen-Bildgebungssystemen.

[0022] In einem zweiten Aspekt der Erfindung ist bereitgestellt ein In-vitro-Verfahren zum Bestimmen der Position im Zellzyklus einer Säugerzelle, umfassend:

- a) Exprimieren in einer Zelle ein Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von
 - i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steuerelement,
 - ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und
 - iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement; wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus; und
- b) Bestimmen der Position im Zellzyklus durch Überwachen von Signalen, die von dem Reportermolekül emittiert werden

[0023] Geeigneterweise ist das Nukleinsäure-Reporterkonstrukt ein DNA-Konstrukt.

[0024] Das Zellzyklusphasen-spezifische Expressionssteuerelement ist typischerweise eine DNA-Sequenz, die die Transkription und/oder Translation von einer oder mehreren Nukleinsäuresequenzen steuert und die Zellzyklus-spezifische Steuerung der Expression ermöglicht. Ein beliebiges Expressionssteuerelement, das spezifisch aktiv ist in einer oder mehreren Phasen des Zellzyklus, kann geeigneterweise verwendet werden für die Konstruktion des Zellzyklusposition-Reporterkonstrukts.

[0025] Geeigneterweise kann das zellzyklusphasen-spezifische Expressionssteuerelement ausgewählt sein aus Zellzyklus-spezifischen Promotoren und anderen Elementen, die die Steuerung der Transkription oder Translation in einer Zellzyklus-spezifischen Weise beeinflusst. Wo das Expressionssteuerelement ein Promotor ist, wird die Wahl des Promotors abhängen von der Phase des Zellzyklus, die für die Studie ausgewählt ist.

[0026] Geeignete Promotoren umfassen: Cyclin-B1-Promotor (Cogswell et al, Mol. Cell Biol., (1995), 15(5), 2782-90, Hwang et al, J. Biol. Chem., (1995), 270(47), 28419-24, Piaggio et al, Exp. Cell Res., (1995), 216(2), 396-402); Cdc25B-Promotor (Komer et al, J. Biol. Chem., (2001), 276(13), 9662-9); Cyclin-A2-Promotor (Henglein et al, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91(12), 5490-4, Zwicker et al, Embo J., (1995), 14(18), 4514-22); Cdc2-Promotor (Tommasi and Pfeifer, Mol. Cell Biol.,(1995), 15(12), 6901-13, Zwicker et al, Embo J (1995), 14(18), 4514-22), Cdc25C-Promotor (Komer and Muller, J.Biol.Chem., (2000), 275(25), 18676-81, Korner et al, Nucl. Acids Res., (1997), 25(24), 4933-9); Cyclin-E-Promotor (Botz et al, Mol-Cell.Biol., (1996), 16(7), 3401-9, Komer and Muller, J. Biol. Chem. (2000), 275(25), 18676-81); Cdc6-Promotor (Hateboer et al, Mol. Cell. Biol., (1998), 18(11), 6679-97, Van et al, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1998), 95(7), 3603-8); DHFR-Promotor (Shimada et al, J. Biol. Chem., (1986), 261(3), 1445-52, Shimada and Nienhuis, J. Biol. Chem., (1985), 260(4), 2468-74) und Histon-Promotoren (van Wijnen et al, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91, 12882-12886).

[0027] Geeigneterweise kann das Zellzyklusphasen-spezifische Expressions-Ssteuerelement ausgewählt sein aus Zellzyklus-spezifischen IRES-Elementen und anderen Elementen, die die Steuerung der Translation

in einer Zellzyklus-spezifischen Weise beeinflussen. Ein IRES-Element ist eine innere ribosomale Eintrittsstelle, die das Binden eines Ribosoms ermöglicht und ermöglicht, dass die Initiation der Translation an einem Bereich der mRNA erfolgt, der nicht der 5'-Kappen Bereich ist. Ein Zellzyklus-spezifisches IRES-Element beschränkt die Kappen-unabhängige Initiation der Translation auf eine spezifische Stufe des Zellzyklus (Sachs, A.B., Cell, (2000), 101, 243-5). Wo das Expressions-Steurelement ausgewählt wird als ein IRES, wird seine Selektion geeigneterweise abhängen von der studierten Zellzyklusphase. In diesem Fall kann ein konstitutiv exprimierter (z.B. CMV oder SV40) oder induzierbarer (z.B. pTet-an-pTet-aus-System, Clontech) Promotor verwendet werden, um die Transkription der bicistronischen mRNA zu steuern (Sachs, A.B., Cell, (2000), 101, 243-5). Alternativ kann ein nicht-Zellzyklus-Phasen-abhängiges IRES-Element (z.B. EMCV-IRES, gefunden in pIRES-Vektoren, BD Clontech) in Zusammenhang mit einem Zellzyklus-spezifischen Promotorelement verwendet werden. Alternativ kann eine präzisere Steuerung der Expression des Reporters erhalten werden durch Verwenden eines Zellzyklusphasen-spezifischen Promotors in Zusammenhang mit einem Zellzyklusphasen-spezifischen IRES-Element.

[0028] IRES-Elemente, die zur Verwendung in der Erfindung geeignet sind, umfassen: G2-IRES (Cornelis et al, Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605); HCV IRES (Honda et al, Gastroenterology, (2000), 118, 152-162); ODC IRES (Pyronet et al, Mol. Cell, (2000) 5, 607-616); c-myc IRES (Pyronnet et al., Mol. Cell, (2000), 5(4), 6107-16) und p58 PITSRLE IRES (Cornelis et al, Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605).

[0029] Tabelle 1 listet einige bevorzugte Expressionssteuerelemente auf, die gemäß der Erfindung verwendet werden können, und zeigt die Zellzyklusphase an, in der jedes Element aktiviert wird.

Tabelle 1: Zellzyklusphasen-spezifische Expressions-Steurelemente

Element	Zeiteinteilung	Element	Zeiteinteilung
Cyclin-B1-Promotor	G2	DHFR-Promotor	Spätes G1
Cdc25B-Promotor	S/G2	Histon-Promotoren	Spätes G1
Cyclin-A2-Promotor	S	G2-IRES	G2
Cdc2-Promotor	S	HCV IRES	M
Cdc25C-Promotor	S	ODC IRES	G2/M
Cyclin-E-Promotor	Spätes G1	c-myc IRES	M
Cdc6-Promotor	Spätes G1	p58 PITSRLE IRES	G2/M

[0030] Das Zerstörungs-Steurelement ist eine DNA-Sequenz, die ein Protein-Motiv kodiert, dass die Zerstörung von Proteinen, die jene Sequenz enthalten, steuert. Geeigneterweise kann das Zerstörungs-Steurelement Zellzyklus-vermittelt sein, z.B.: Cyclin-B1 D-box (Glutzer et al. Nature, (1991), 349, 132-138, Yamano et al, EMBO J, (1998), 17(19), 5670-8, Clute and Pines, Nature Cell Biology, (1999), 1, 82-87); Cyclin A N-terminus (den Elzen and Pines, J. Cell Biol. (2001), 153 (1). 121-36, Geley et al, J. Cell Biol., (2001), 153, 137-48); KEN Box (Pfleger and Kirschner, Genes Dev, (2000), 14(6), 655-65), Cyclin-E (Yeh et al, Biochem Biophys Res Commun., (2001) 281, 884-90), Cln2 Cyclin von *S. cerevisiae* (Berset et al, Mol. Cell Biol., (2002), S. 4463-4476) and p27Kip1 (Montagnoli et al, Genes Dev., (1999), 13(9), 1181-1189, Nakayama et al, EMBO J., (2000), 19(9), 2069-81, Tomoda et al, Nature, (1999), 398(6723), 160-5).

[0031] Tabelle 2 listet Zerstörungs-Steurelemente auf, die gemäß der Erfindung verwendet werden können, und zeigt die Zellzyklusphase an, in der jedes Element aktiviert wird.

[0032] Alternativ kann das Zerstörungs-Steurelement nicht Zellzyklus-vermittelt sein, wie PEST-Sequenzen, wie beschrieben von Rogers et al, Science, (1986), 234, 364-8.

[0033] Beispiele nicht-Zellzyklus-vermittelter Zerstörungs-Steurelemente umfassen Sequenzen, die abgeleitet sind von Casein, Ornithin-Decarboxylase und Proteinen, die die Protein-Halbwertszeit verringern. Eine Verwendung derartiger nicht-Zellzyklusvermittelter Zerstörungs-Steurelemente in dem Verfahren der Erfindung stellt Mittel bereit zum Bestimmen der Persistenzzeit des Zellzyklusreporters nach der Induktion der Expression durch einen Zellzyklus-spezifischen Promotor.

Tabelle 2: Zerstörungs-Steuerelemente

Element	Zeiteinteilung
Cyclin-B1 D-Box	Metaphase durch bis zur G1-Phase
Cyclin-A N-Terminus	Prometaphase durch bis zur G1-Phase
KEN-Box	Anaphase/G1
p27Kip1	G1
Cyclin-E	G1/S-Grenze
Cln2	G1/S-Grenze

[0034] Geeigneterweise kann das Lebezellen-Reporter-molekül, das durch die Nukleinsäuresequenz kodiert ist, ausgewählt werden aus der Gruppe, die aus fluoreszierenden Proteinen und Enzymen besteht. Bevorzugte fluoreszierende Proteine umfassen Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) von *Aequorea Victoria* und Derivat von GFP, wie funktionale GFP-Analoga, in denen die Aminosäuresequenz des Wild-Typ-GFP geändert wurde durch Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution. Geeignete GFP-Analoga zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen EGFP (Cormack, B.P. et al, *Gene*, (1996), 173, 33-38); EYFP and ECFP (US 6066476, Tsien, R. et al; F64L-GFP (US 6172188, Thastrup, O. et al); BFP, (US 6077707, Tsien, R. et al). Andere fluoreszierende Proteine umfassen DsRed, HcRed und andere neue fluoreszierende Proteine (BD Clontech and Labas, Y.A. et al, *Proc Natl. Acad Sci USA* (2002), 99, 4256-61) und Renilla-GFP (Stratagene). Geeignete Enzymreporter sind jene, die fähig sind, ein detektierbares (z.B. fluoreszierendes oder luminisierendes) Signal in einem Substrat für jedes System zu erzeugen. (Ein) besonders geeignete(s) Enzym/Substrate umfassen: Nitroreduktase/Cy-Q (wie offenbart in WO01/57237) und β -Lactamase/CCF4.

[0035] Das Nukleinsäure-Reporterkonstrukt umfasst ein Zellzyklusphasen-spezifisches Raumlokalisations-Steuerelement, umfassend eine DNA-Sequenz, die ein Protein-Motiv kodiert, das fähig ist, die subzelluläre Lokalisation des Proteins in einer Zellzyklus-spezifischen Weise zu steuern. Ein derartiges Lokalisations-Steuerelement ist erforderlich, um die subzelluläre Lokalisation des Reporters zu bestimmen, um entweder seinen wirksamen Betrieb und/oder die Zerstörung sicherzustellen. Präzisere Bestimmung der Zellzyklusposition kann möglich sein unter Verwenden eines Lokalisations-Steuerelementes, da dies die Messung sowohl der Intensität als auch des Ortes des Reportersignals erlauben wird.

[0036] Geeignete Raumlokalisations-Steuerelemente umfassen jene, die die Lokalisation eines Zellzyklus-Steuerelementes regulieren, z.B. das Cyclin-B1-CRS.

[0037] Der Begriff betreibbar verbunden zeigt an, dass die Elemente derart angeordnet sind, dass sie miteinander für ihre beabsichtigten Zwecke funktionieren, z.B. die Transkription initiiert in einen Promotor und schreitet durch die DNA-Sequenz, die für das fluoreszierende Protein der Erfindung kodiert, voran. [Fig. 2](#) (2A/2B/2C) veranschaulicht die allgemeine Konstruktion eines DNA-Konstruktes gemäß der Erfindung.

[0038] In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung umfasst das Konstrukt einen Cyclin-B1-Promotor, eine Cyclin-B1-Destruktionsbox (D-Box), eine cytoplasmatische Cyclin-B1-Retentionssequenz (CRS) und ein Grün Fluoreszierendes Protein (GFP).

[0039] In einem besonderen Beispiel gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst das Nukleinsäurereporterkonstrukt einen Expressionsvektor, umfassend die folgenden Elemente:

- a) ein Vektor-Rückgrat, umfassend
 - i) einen bakteriellen Ursprung der Replikation; und
 - ii) ein bakterielles Arzneimittel-Resistenz-Gen;
- a) ein Zellzyklusphasen-spezifisches Expressions-Steuerelement;
- b) ein Zerstörungs-Steuerelement;
- c) ein Zellzyklusphasen-spezifisches Raumlokalisations-Steuerelement; und
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Reporter-molekül kodiert.

[0040] Gegebenenfalls enthält das Nukleinsäurereporterkonstrukt zusätzlich ein eukariotisches Arzneimittel-resistenzgen, bevorzugt ein Säuger-Arzneimittelresistenzgen.

[0041] Expressionsvektoren können auch andere Nukleinsäuresequenzen enthalten, wie Polyadenylierungs-

signale, Splice-Donor/Splice-Akzeptor-Signale, intervenierende Sequenzen, transkriptionale Verstärkersequenzen, translationale Verstärkersequenzen und dergleichen. Gegebenenfalls können das Arzneimittelresistenzgen und das Reportergen betreibbar verbunden sein durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), die entweder Zellzyklus-spezifisch (Sachs, et al, Cell, (2000), 101, 243-245) oder Zellzyklus-unabhängig (Jang et al, J. Virology, (1988), 62, 2636-2643 und Pelletier und Sonnenberg, Nature (1988), 334, 320-325) ist, eher als die zwei Gene, die von getrennten Promotoren angetrieben werden. Wenn ein Zellzyklus-spezifisches IRES-Element verwendet wird, können die pIRES-neo- und pIRES-puro-Vektoren, die kommerziell von Clontech erhältlich sind, verwendet werden.

[0042] In einer besonderen Ausführungsform des ersten Aspektes ist das Nulkeinsäurereporterkonstrukt zusammengesetzt aus einer DNA-Sequenz, die für den Cyclin-B1-Promotor kodiert, der betreibbar an DNA-Sequenzen gebunden ist, die die 171 Aminosäuren des Amino-terminus des Cyclin-B1 kodieren, und einer DNA-Sequenz, die ein Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert ([Fig. 3](#)). Motive, die die Lokalisation und Zerstörung von Cyclin-B1 steuern, wurden alle auf ~150 Aminosäuren im Amino-Terminus des Moleküls kartiert. Demzufolge kann ein künstlicher Zellzyklusmarker konstruiert werden unter Verwenden von nur Sequenzen vom Amino-Terminus des Cyclin-B1, das nicht mit der Zellzyklusprogression interferieren wird, da ihm eine spezifische Sequenz fehlt, die die Cyclin-Box genannt wird (Nugent et al, J. Cell. Sci., (1991), 99, 669-674), welche erforderlich ist, eine Partnerkinase zu binden und zu aktivieren. Schlüsselregulationsmotive, die von der Amino-Terminussequenz des Cyclin-B1 erforderlich sind, sind: i) ein 9-Aminosäure-Motiv, das die Destruktions-Box (D-Box) genannt wird. Dies ist nötig, um Cyclin-B1 auf die Ubiquitinierungsmaschinerie hin auszurichten und, in Zusammenhang mit mindestens einem C-terminalen Lysinrest, ist dies auch erforderlich für seinen Zellzyklus-spezifischen Abbau; ii) ein nukleares Exportsignal (NES) von annähernd 10 Aminosäuren. Dieses Motiv wird erkannt entweder direkt oder indirekt durch Exportin-1 und es ist ausreichend, um den Hauptteil von Cyclin-B1 im Cytoplasma über die ganze Interphase zu halten; iii) annähernd 4 Mitose-spezifische Phosphorylierungsstellen, die in und benachbart zum NES lokalisiert sind und schnellen Kernimport und einen verringerten Kernexport bei der Mitose verleihen. Wenn es in einer eukariotischen Zellen exprimiert wird, wird das Konstrukt die Zellzyklus-spezifische Expression und Zerstörung des GFP-Reporters zeigen, die parallel zur Expression und zum Abbau von endogenem Cyclin-B1 erfolgt. Daher ermöglicht die Messung der GFP-Fluoreszenzintensität die Identifikation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus ([Fig. 4](#)). Außerdem, da das fluoreszierende Produkt des Konstruktes die räumliche Lokalisation von endogenem Cyclin-B1 nachahmen wird, ermöglicht die Analyse der subzellulären Verteilung der Fluoreszenz eine weitere Präzision im Zuordnen der Zellzyklusposition. Bei der Prophase transloziert Cyclin-B schnell in den Kern, demzufolge kann die präzise Lokalisation der GFP-Fluoreszenz in der Zelle verwendet werden, um Zellen zu unterscheiden, die von der Interphase zur Mitose übergehen. Sobald eine Zelle die Metaphase erreicht und der Spindelapparat-Prüfpunkt erfüllt ist, wird das Cyclin-B1 sehr schnell abgebaut, demzufolge kann das Verschwinden der GFP-Fluoreszenz zum Identifizieren von Zellen bei einer mittleren M-Phase verwendet werden.

[0043] Die Expression des Konstruktes in einer Population von unsynchronisierten Zellen wird dazu führen, dass in jeder Zelle eine zyklische Expression und Zerstörung des fluoreszierenden Produktes vom Konstrukt zeigt, was zu einem kontinuierlichen Blitzlichtmuster der Fluoreszenz von allen Zellen in der Population führt. Analyse der Fluoreszenzintensität jeder Zelle mit der Zeit ergibt demzufolge eine dynamische Information über den Zellzyklusstatus jeder Zelle, wie in [Fig. 4](#) dargestellt.

[0044] Weitere Ausführungsformen des Nukleinsäure-Reporter-Konstruktes gemäß des ersten Aspektes können konstruiert werden durch Auswählen geeigneter alternativer Zellzyklussteuerelemente, z.B. von jenen, die in Tabellen 1 und 2 gezeigt sind, um Zellzyklusphasenreporter zu entwerfen, die einen erwünschten Abschnitt des Zellzyklus anzeigen.

[0045] Die Konstruktion und Verwendung von Expressionsvektoren und Plasmiden sind jenen Fachleuten gut bekannt. Fast jeder Säugerzellenexpressionsvektor kann in Verbindung mit den hier offenbarten Zellzyklusmarkern verwendet werden. Beispiele geeigneter Vektorrückgrade, die bakterielle und Säuger-Arzneimittelresistenzgene umfassen, und ein bakterieller Ursprung der Replikation umfasst, sind aber nicht beschränkt auf: pCI-neo (Promega), pcDNA (Invitrogen) und pTriEx1 (Novagen). Geeignete bakterielle Arzneimittelresistenzgene umfassen Gene, die Proteine kodieren, die eine Resistenz gegenüber Antibiotika verleihen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf: Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin und Chloramphenicol. Eukariotische Arzneimittel-Selektionsmarker umfassen Mittel, wie Neomycin, Hygromycin, Puromycin, Zeocin, Mycophenolsäure, Histidinol, Gentamycin und Methotrexat.

[0046] Das DNA-Konstrukt kann hergestellt werden durch die rekombinanten Standardtechniken der Molekularbiologie, Restriktion, Verdau, Ligation, Transformation und Plasmid-Reinigung, durch Verfahren, die jenen

Fachleuten bekannt sind und sind wie beschrieben in Sambrook, J. et al (1989), *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Alternativ kann das Konstrukt synthetisch durch etablierte Verfahren hergestellt werden, z.B. durch das Phosphoramidit-Verfahren, beschrieben durch Beaucage and Caruthers, (*Tetrahedron Letters*, (1981), 22, 1859-1869) oder das Verfahren, das von Matthes et al (*EMBO J.*, (1984), 3, 801-805) beschrieben ist. Gemäß des Phosphoramidit-Verfahrens werden Oligonukletide synthetisiert, z.B. in einem automatischen DNA-Synthetisierer, gereinigt, erwärmt, ligiert und cloniert zu geeigneten Vektoren. Das DNA-Konstrukt kann auch hergestellt werden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwenden spezifischer Primer, bspw. wie beschrieben in US 4683202, oder durch Saiki et al, (*Science*, (1988), 239, 487-491). Ein Überblick über PCR-Verfahren kann gefunden werden in *PCR Protocols*, (1990), Academic Press, San Diego, California, USA.

[0047] Während der Herstellung des DNA-Konstruktes muss die Gensequenz, die den Reporter kodiert, in frame mit dem Zellzyklusphasen-spezifischen Destruktionssteuerelement und dem Raumlokalisations-Steuerelement gekoppelt werden. Das resultierende DNA-Konstrukt sollte dann unter der Steuerung von einem oder mehreren Zellzyklusphasen-spezifischen Expressionsteuerelementen angeordnet werden.

[0048] In einem dritten Aspekt ist eine Wirtszelle bereitgestellt, die keine menschliche Embryonenzelle ist, transfiziert mit einem Nukleinsäurereporter-Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindung. Die Wirtszelle, in die das Konstrukt oder der Expressionsvektor, der ein derartiges Konstrukt enthält, eingeführt wird, kann eine beliebige Säugerzelle sein, die fähig ist, das Konstrukt zu exprimieren.

[0049] Das hergestellte DNA-Reporterkonstrukt kann transfiziert werden in eine Wirtszelle unter Verwenden von Techniken, die dem Fachmann gut bekannt sind. Ein Ansatz ist es, zeitweilig die Zellen unter Verwenden entweder chemischer oder physikalischer Prozeduren permeabel zu machen. Diese Techniken können umfassen: Elektroporation (Tur-Kaspa et al, *Mol. Cell Biol.* (1986), 6, 716-718; Potter et al, *Proc.Nat.Acad. Sci.USA*, (1984), 81, 7161-7165), ein auf Calciumphosphat basierendes Verfahren (z.B. Graham and Van der Eb, *Virology* (1973), 52, 456-467 and Rippe et al, *Mol. Cell Biol.*, (1990), 10, 689-695) oder direkte Mikroinjektion.

[0050] Alternativ können auf kationischem Lipid basierende Verfahren (z.B. die Verwendung von Superfect (Qiagen) oder Fugene 6 (Roche)) verwendet werden, um DNA in Zellen einzuführen (Stewart et al *Human Gene Therapy*, (1992), 3, 267; Torchilin et al, *FASEB J*, (1992), 6, 2716; Zhu et al, *Science* (1993), 261, 209-211; Ledley et al; *J. Pediatrics*, (1987), 110, 1; Nicolau et al, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, (1983), 80, 1068; Nicolau and Sene, *Biochem.Biophys.Acta*, (1982), 721, 185-190). Jiao et al, *Biotechnology*, (1993), 11, 497-502) beschreiben die Verwendung von durch Bombardement vermittelten Gentransfer-Protokollen zum Übertragen und Exprimieren von Genen in Gehirngewebe, die auch verwendet werden können, um die DNA in Wirtszellen zu transferieren.

[0051] Ein weiteres alternatives Verfahren zum Transfizieren der DNA-Konstrukte zu Zellen nutzt die natürliche Fähigkeit von Viren in Zellen einzutreten. Derartige Verfahren umfassen Vektoren und Transfektionsprotokolle, die auf z.B. Herpes Simplex Virus (US Pat 5288641), Cytomegalovirus (Miller, *Curr.Top. Mikrobiol. Immunol.*, (1992), 158,1), Vaccinia Virus (Blaichwal and Sugden, 1986, in *Gene Transfer*, ed. R. Kucherlapati, New York, Plenum Press, S. 117-148) und Adenovirus und Adeno-assoziiertes Virus (Muzyczka, *Curr. Top. Mikrobiol. Immunol.*, (1992), 158, 97-129) basieren.

[0052] Beispiele geeigneter rekombinanter Wirtszellen umfassen HeLa-Zellen, Vero-Zellen, Chinese Hamster Ovary (CHO), U2OS, COS, BHK, HepG2, NIH 3T3 MDCK, RIN, HEK293 und andere Säugerzelllinien, die in vitro gezogen sind. Derartige Zelllinien sind verfügbar von der American Tissue Culture Collection (ATCC), Bethesda, Maryland, USA. Andere Zellen als menschliche Embryonenzellen von primären Zelllinien, die etabliert worden sind nach dem Entfernen von Zellen aus einem Säuger, gefolgt vom Kultivieren der Zellen für eine begrenzte Zeitdauer, sind auch als in der vorliegenden Erfindung umfasst beabsichtigt.

[0053] Zelllinien, die eine stabile Expression eines Zellzykluspositionsreporters zeigen, können auch verwendet werden beim Etablieren von Xenografts konstruierter Zellen in Wirtstieren unter Verwenden von Standardverfahren. (Krasagakis, K.J. et al, *Cell Physiol.*, (2001), 187(3), 386-91; Paris, S. et al, *Clin. Exp. Metastasis*, (1999), 17(10), 817-22). Xenografts von Tumorzelllinien, die zum Exprimieren von Zellzykluspositionsreportern entworfen sind, werden die Etablierung eines Modellsystems zum Studieren der Tumorzellteilung, Stase und Metastase und zum Screenen nach neuen Antikrebs-Arzneimitteln ermöglichen.

[0054] Die Verwendung entworfener Zelllinien oder transgener Gewebe, die einen Zellzykluspositionsreporter als Allografts in einem Wirtstier exprimieren, wird das Studium von Mechanismen, die die Toleranz oder Absto-

ßung von Gewebetransplantaten beeinflussen, erlauben (Pye D and Watt, D.J., J. Anat., (2001), 198 (Pt2), 163-73; Brod, S.A. et al, Transplantation (2000), 69(10), 2162-6).

[0055] Um das Verfahren zum Bestimmen der Zellzyklusposition einer Zelle gemäß des zweiten Aspektes auszuführen, können Zellen, die mit dem DNA-Reporterkonstrukt transfiziert sind, unter Bedingungen und für eine Zeitdauer kultiviert werden, die ausreichend ist, um die Expression des Reportermoleküls an einer spezifischen Stufe des Zellzyklus zu ermöglichen. Typischerweise wird die Expression des Reportermoleküls zwischen 16 und 72 Stunden nach der Transfektion erfolgen, kann aber abhängig von den Kulturbedingungen variieren. Falls das Reportermolekül auf einer Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins basiert, kann der Reporter eine definierte Zeit benötigen, um sich in eine Konformation zu falten, die fluoresziert. Diese Zeitdauer ist abhängig von der primären Sequenz des Derivats des Grün Fluoreszierenden Proteins, das verwendet wird. Das fluoreszierende Reporterprotein kann auch die Farbe mit der Zeit ändern (wie z.B. Terskikh, Science, (2000), 290, 1585-8), in welchem Fall eine Bildgebung erforderlich ist an spezifizierten Zeitintervallen nach der Transfektion.

[0056] Die Zellzyklusposition der Zellen kann bestimmt werden durch Überwachen der Expression des Reportermoleküls und Detektieren von Signalen, die vom Reporter emittiert werden unter Verwenden einer geeigneten Detektionsvorrichtung. Falls das Reportermolekül ein fluoreszierendes Signal erzeugt, kann entweder ein herkömmliches Fluoreszenzmikroskop oder ein konfokal basierendes Fluoreszenzmikroskop verwendet werden. Falls das Reportermolekül lumineszierendes Licht erzeugt, kann eine geeignete Vorrichtung, wie ein Luminometer verwendet werden. Unter Verwenden dieser Techniken kann der Anteil von Zellen, die das Reportermolekül exprimieren, bestimmt werden. Falls das DNA-Konstrukt Translokations-Steurelemente enthält und die Zellen unter Verwenden eines Mikroskops untersucht werden, kann auch die Position des Reporters bestimmt werden. Im Verfahren gemäß der Erfindung kann die Fluoreszenz von Zellen, die mit dem DNA-Konstrukt transformiert oder transfiziert werden, geeigneterweise gemessen werden durch optische Mittel in bspw. einem Spektrophotometer, einem Fluorimeter, einem Fluoreszenzmikroskop, einem Cooled-Charge-Coupled-Device(CCD)-Bildgeber (wie ein Scanning-Imager oder ein Area-Imager), ein Fluoreszenz-aktiver Zellsortierer, ein konfokales Mikroskop oder eine konfokale Scanning-Vorrichtung, wobei die spektralen Eigenschaften der Zellen in Kulturen bestimmt werden können als Scans der Lichtanregung und -Emission.

[0057] In der Ausführungsform der Erfindung, bei der das Nukleinsäure-Porter-Konstrukt ein Arzneimittelresistenzgen umfasst, können nach der Transfektion und Expression des Arzneimittelresistenzgenes (üblicherweise 1-2 Tage) Zellen, die das modifizierte Reporter gen exprimieren, durch Wachsenlassen der Zellen bei Vorhandensein eines Antibiotikums ausgewählt werden, für das transfizierte Zellen resistent sind, auf Grund des Vorhandenseins eines auswählbaren Markergens. Der Zweck des Zugebens des Antibiotikums ist es, Zellen auszuwählen, die das Reporter gen exprimieren und die in einigen Fällen das Reporter gen integriert haben mit seinem/seinen assoziierten Promotor, IRES-Elementen, Verstärker und Terminationssequenzen in das Genom der Zelllinie. Nach der Selektion kann eine klonale Zelllinie, die das Konstrukt exprimiert, unter Verwenden von Standardtechniken isoliert werden. Die klonale Zelllinie kann dann unter Standardbedingungen wachsen und wird das Reportermolekül exprimieren und ein detektierbares Signal an einem spezifischen Punkt im Zellzyklus erzeugen.

[0058] Zellen, die mit dem Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindungen transfiziert sind, können in Abwesenheit und/oder Anwesenheit einer Testverbindung wachsen, die besteht aus einem Arzneimittel, Nukleinsäure, Hormon, Protein oder Peptid, die/das studiert werden soll und deren/dessen Effekt auf den Zellzyklus einer Zelle bestimmt werden soll. Durch Bestimmen des Anteils von Zellen, die das Reportermolekül exprimieren und ggf. der Lokalisation des Signals innerhalb der Zelle, ist es möglich, den Effekt der Testverbindung auf den Zellzyklus der Zellen zu bestimmen, z.B. ob die Testverbindung die Zellen in einer besonderen Stufe des Zellzyklus festhalten oder ob es der Effekt ist, die Zellteilung zu beschleunigen oder zu verlangsamen.

[0059] So ist in einem vierten Aspekt ein in-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effekts einer Testverbindung bereitgestellt, die besteht aus einem Arzneimittel, Nukleinsäure, Hormon, Protein oder Peptid auf die Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Exprimieren in der Zelle bei Abwesenheit und bei Vorhandensein der Testverbindung ein Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von
 - i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steurelement,
 - ii) einem Zerstörungs-Steurelement, und
 - iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steurelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus; und

b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem Reportermolekül emittiert werden, wobei eine Differenz zwischen den emittierten Signalen, die bei Abwesenheit und bei Vorhandensein der Testverbindung gemessen werden, den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

[0060] In einem fünften Aspekt ist bereitgestellt ein in-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effektes einer Testverbindung, die besteht aus einer Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid auf die Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

a) Exprimieren in der Zelle bei Vorhandensein der Testverbindung ein Nukleinsäure-Reporterkonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifisches Expressions-Steuerelement,

ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und

iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus; und

b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem Reportermolekül emittiert werden,

c) Vergleichen des emittierten Signals bei Vorhandensein der Testverbindung mit einem bekannten Wert für das emittierte Signal in Abwesenheit der Testverbindung;

wobei eine Differenz zwischen dem emittierten Signal, das bei Vorhandensein der Testverbindung gemessen wird, und dem bekannten Wert in Abwesenheit der Testverbindung den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

[0061] In einem sechsten Aspekt ist bereitgestellt ein in-vitro-Verfahren des Effektes einer Testverbindung, die besteht aus einem Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid auf die Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

a) Bereitstellen von Zellen, die ein Nukleinsäure-Reporterkonstrukt enthalten, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steuerelement,

ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und

iii) einem Zellzyklusphase-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt in dem Zellzyklus;

b) Kultivieren erster und zweiter Populationen der Zellen jeweils bei Vorhandensein und in Abwesenheit der Testverbindung und unter Bedingungen, die die Expression des Nukleinsäure-Reporterkonstrukts erlauben; und

c) Messen der Signale, die von dem Reportermolekül in den ersten und zweiten Zellpopulationen emittiert werden;

wobei eine Differenz zwischen den emittierten Signalen, die in der ersten und der zweiten Zellpopulation gemessen werden, den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

[0062] Es ist beabsichtigt, mit dem Begriff Testverbindung ein Mittel anzugeben, wie ein Arzneimittel, ein Hormon, ein Protein, ein Peptid, eine Nukleinsäure und dergleichen, das auf die Zelle einwirkt. Alternativ kann die Testverbindung ein Mittel sein wie eine Nukleinsäure, ein Peptid oder ein Protein, die/das exprimiert wird in der Zelle, die studiert wird. Zum Beispiel können Zellen, die mit den Nukleinsäure-Reporter-Konstrukten gemäß der vorliegenden Erfindung transfiziert sind, verwendet werden, um zu bestimmen, ob die Expression von cDNA, die Konstrukte enthält, die studierte Proteine kodieren, einen Effekt auf die Zellzyklusposition einer Zelle besitzt. Eine Reihe von cDNAs eingeführt in einen Säugerexpressionsvektor, kann transient transfiziert werden in eine Zelle, die stabil den Zellzykluspositionsreporter exprimiert. Durch Überwachen der Expression und Lokalisierung des Nukleinsäure-Reporter-Konstruktes in diesen transfizierten Zellen ist es möglich, die Effekte der Proteine, die durch die cDNAs kodiert werden, auf den Zellzyklus zu bestimmen.

[0063] Die Zellzykluspositions-Nukleinsäure-Reporter-Konstrukte gemäß der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden in einem Verfahren, um den Effekt der Zellzyklusposition auf einen zellulären Prozess zu bestimmen, oder um den Effekt der Zellzyklusposition auf die Wirkung einer Testsubstanz auf einen zellulären Prozess zu bestimmen. Es ist gut bekannt, dass viele zelluläre Prozesse, einschließlich jene, die auf ex-

terne Stimuli antworten, beeinflusst werden vom Zellzyklus, um so bei unterschiedlichen Stufen des Zellzyklus zu arbeiten oder zu reagieren. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Endothelin-Rezeptoren auf verschiedenen Niveaus während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus exprimiert werden (Okazawa et al. J. Biol. Chem., (1998), 273, 12584-12592) und demzufolge variiert die Empfindlichkeit der Zellen auf eine mit Endothelin induzierte Apoptose mit der Zellzyklusposition. Auf ähnliche Weise unterscheiden sich die zellulären Ca^{2+} -Mobilisations-Antworten auf Vasopressin gemäß der Zellzyklusposition (Abel et al. J. Biol. Chem., (2000), 275, 32543-32551), auf Grund von Variationen im Weg der Signaltransduktion, die verschiedene G-Proteine bei verschiedenen Zellzyklusphasen nutzen. Eine Verwendung der Zellzykluspositions-Reporter-Konstrukte wird Zell-zu-Zell-Variationen in einem biologischen Assay ermöglichen, gemessen unter Verwenden eines geeigneten Assay-Reporters, um mit dem Signal von einem Zellzyklus-Positionsreporter zu korrelieren, um zu bestimmen, ob irgendwelche Variationen im Assaysignal mit dem Zellzykluspositionsreportersignal korrelieren, und daher irgendeine Zellzyklusabhängigkeit des Assaysignals zu bestimmen. Zum Beispiel können Assays entwickelt werden, in denen die Menge eines rot-fluoreszierend markierten Liganden, der an einen Zelloberflächenrezeptor gebunden ist, mit dem Zellzyklusstatus korreliert wird, der unter Verwenden eines GFP-Zellzykluspositionsreporters bestimmt wird. Mit zellulärer Prozess ist gemeint die normalen Prozesse, die lebende Zellen durchlaufen, und umfasst: Biosynthese, Aufnahme, Transport, Rezeptorbindung, Metabolismus, Fusion, biochemische Responses, Wachstum und Tod.

[0064] Zwei oder mehr Zellzykluspositions-Nukleinsäure-Reporter-Konstrukte können in Kombination in Anwendungen verwendet werden, die eine Anzeige über einen Übergang durch zwei oder mehr Zellzyklusphasen innerhalb derselben Zelle umfassen. Um eine derartige Duplex- oder Multiplex-Anzeige zu erreichen, werden zwei oder mehr Konstrukte entworfen und exprimiert in derselben Zelle, wobei jedes Reporterkonstrukt eine unterschiedliche Kombination von Steuerelementen umfasst, die an einen unterschiedlichen und unterscheidbaren Reporter gebunden sind. Zum Beispiel wird die zelluläre Expression eines Konstruktes, das einen Cyclin-Promotor und eine Cyclin-B1-D-Box umfasst, betreibbar gebunden mit GFP, in Kombination mit einer Expression eines zweiten Konstruktes in derselben Zelle, das einen Cyclin-A2-Promotor und eine Cyclin-B1-D-Box umfasst, betreibbar verbunden an blau-fluoreszierendes Protein (BFP), eine Unterscheidung von Zellen in der S-Phase (blaue Fluoreszenz) von Zellen in einer G2/M-Phase (blaue und grüne Fluoreszenz) ermöglichen.

[0065] Die Zellzykluspositions-Nukleinsäure-Reporter-Konstrukte und Assayverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können verwendet werden in einer Vielfalt zusätzlicher Anwendungen z.B.:

i) Zellen, transfiziert mit den Zellzyklus-Positions-Reporter-Konstrukten der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um den Effekt des Zellzyklus auf die Expression, Translokation oder subzelluläre Verteilung eines zweiten Markers in einem Multiplex-Assay zu bestimmen. Zum Beispiel ist es, falls die intrazelluläre Translokation eines fluoreszierenden Reporters zur Plasmamembran studiert wird und gefunden wird, dass eine Testverbindung zu einer Translokation in einem Prozentsatz der Zellen führt, möglich, unter Verwenden von Zellen, die mit einem Konstrukt gemäß der Erfindung transfiziert sind, zu bestimmen, ob die Translokations-Zellzyklus-abhängig war.

[0066] So wird in einem siebten Aspekt der vorliegenden Erfindung ein in-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effektes des Säugerzellzyklus auf die Expression, Translokation oder sub-zelluläre Verteilung eines ersten detektierbaren Reporters bereitgestellt, der dafür bekannt ist, als Antwort auf eine Testverbindung zu variieren, die besteht aus einem Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder Peptid, wobei das Verfahren umfasst:

a) Exprimieren in der Zelle bei Vorhandensein der Testverbindung ein zweites Nukleinsäure-Reporterkonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reporter-molekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steuerelement,

ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und

iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle bei einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus;

b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem zweiten Reporter-molekül emittiert werden; und

c) Überwachen der Signale, die durch den ersten detektierbaren Reporter emittiert werden,

wobei die Beziehung zwischen der Zellzyklusposition, die durch b) bestimmt wird und dem Signal, das von dem ersten detektierbaren Reporter emittiert wird, anzeigt, ob oder ob nicht die Expression, Translokation oder sub-zelluläre Verteilung des ersten detektierbaren Reporters Zellzyklus-abhängig ist. Der Begriff „Testverbindung“ soll verstanden werden, wie hier zuvor in Bezug auf den vierten, fünften und sechsten Aspekt der Erfindung beschrieben.

ii) Zellzykluspositionsreporter der vorliegenden Erfindung können verwendet werden in Kombination mit einer Analyse endogener zellulärer Marker oder Phänomene, die Zellzyklus-bezogen sind, um weitere Informationen über den Zellzyklusstatus einer individuellen Zelle oder einer Zellpopulation zu erhalten. Ausserdem ist es gut bekannt, dass der Golgi-Komplex eine ausgeprägte Morphologie in Säugerzellen besitzt, umfassend eine schleifenartige Struktur in der Nähe des Kernes, und dass ausgeprägte Änderungen erfolgen in der Struktur des Golgis, wenn Zellen eine Mitose durchlaufen, da die Schleifenstruktur umgewandelt wird zu Clustern von Vesikeln und Tubuli, die über die gesamte, die Mitose durchlaufende Zelle verteilt sind. (Lowe et al., *Trans Cell Biol.*, (1998), 8(1) 40-44). Eine Analyse der Morphologie von Zellkomponenten, wie den Golgi-Apparat, die in einer bekannten Weise mit der Zellzyklusprogression variieren, z.B. durch Verwenden spezifisch fluoreszierender Farbstoffe, kann verwendet werden in Kombination mit einem Zellzykluspositionsreporter, um eine detailliertere Analyse der Zellzyklusprogression zu ermöglichen.

iii) Die Zellzykluspositionsreporter gemäß der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden zum Überwachen des Zellzyklusstatus und der Progression in in-vivo-Anwendungen. Zum Beispiel kann die Einführung eines DNA-Konstrukts, das einen Zellzykluspositionsreporter kodiert, in lebende Proben, wie Xenopus-Oocyten und lebende Organismen, wie *C. elegans* und *Drosophila*, über Transfektion individueller Zellen oder mehrfacher Zellen erreicht werden durch Mikroinjektion (Krone, P.H., und Heikkila, J.J., *Development* (1989), 106(2), 271-81), ballistische Injektion (Horard, B. et al., *Insect Mol. Biol.*, (1994), 3(4), 61-5) und andere Verfahren, die dem Fachmann gut bekannt sind. Die Einführung von Zellzyklusreporterkonstrukten in derartige Proben wird die Untersuchung der Zellzyklusprogression und -steuerung in der Zellvermehrung transfizierter Zellen ermöglichen. Eine Information von Reportern ist wahrscheinlich von signifikantem Wert beim Studium des Wachstums und der Entwicklung in Modellorganismen.

iv) Die Reporter der vorliegenden Erfindung können verwendet werden bei der Erzeugung transgener Organismen, d.h. wo die DNA, die den Zellzykluspositionsreporter kodiert, stabil in allen Zellen eines Organismus oder eines Tieres exprimiert wird. Derartige transgene Organismen können erzeugt werden durch Mikroinjektion von DNA in einen frühen Embryo, allgemein in einen der Pronuklei eines neu befruchteten Eis (Bishop, J.O. *Reprod. Nutr. Dev.*, (1996), 36(6), 607-18). Transgene Techniken können verwendet werden, um transgene Zellzykluspositionsreporter in einem Bereich von Wirtsspezies von einfachen Organismen, wie *C. elegans* (Daniells, C. et al., *Mutat. Res.*, (1998), 399(1), 55-64) bis zu komplexeren Organismen wie Mäusen und Ratten zu entwerfen (Sills, R.C., et al., *Toxicol. Lett.*, (2001), 20(1-3), 187-98). Die Etablierung stabiler transgener Expression eines Zellzykluspositionsreporters in allen Zellen eines transgenen Organismus wird ermöglichen, dass der Zellzyklusstatus in jeglichem Zelltyp innerhalb oder isoliert vom Organismus bestimmt wird, einschließlich kultivierte Zelllinien, die von dem Organismus abgeleitet sind. Demgemäß wird in einem achten Aspekt der vorliegenden Erfindung bereitgestellt ein nicht-menschlicher, transgener Organismus, umfassend eine Zelle wie zuvor beschrieben.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0067] Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele und Figuren, in denen:

[0068] **Fig. 1** ein schematisches Diagramm ist, das die Cyclin-B1-Regulation während der Zellzyklusprogression darstellt. Der Zellzyklus schreitet voran in der Richtung des Pfeils, wobei die Cyclin-B1-Expression durch einen Zellzyklusphasen-spezifischen Promotor angetrieben wird, der die Expression am Ende der S-Phase initiiert und während G2(A) eine Spitze durchläuft. Beim Beginn der Mitose (B) transloziert Cyclin-B1 vom Cytoplasma zum Kern und von der Metaphase an (C) wird das Protein spezifisch abgebaut.

[0069] **Fig. 2** ist ein schematisches Diagramm, das die Zellzykluspositions-Nukleinsäure-Reporter-Konstrukte gemäß der vorliegenden Erfindung darstellt, und in dem 2A einen Zellzyklusphasen-spezifischen Promotor und kein IRES-Element nutzt, 2B ein IRES-Element nutzt, um die Säugerselektion zu vereinfachen, und 2C einen konstitutiven oder induzierbaren Säugerpromotor und ein Zellzyklusphasen-spezifisches IRES als das Expressions-Steuerelement enthält. In jedem Fall repräsentiert A eine Zellzyklusphasen-spezifische Expressionssteuerung (Promotor), B repräsentiert ein Zellzyklusphasen-spezifisches Zerstörungs-Steuerelement, C repräsentiert ein Zellzyklusphasen-spezifisches Lokalisations-Steuerelement, D repräsentiert ein Reporter-gen, E repräsentiert ein nicht-Zellzyklus-spezifisches IRES-Element, F repräsentiert einen auswählbaren Säugermarker, G repräsentiert einen konstitutiven Säugerpromotor und H repräsentiert ein Zellzyklus-spezifisches IRES-Element.

[0070] **Fig. 3** zeigt ein DNA-Konstrukt, zum Bestimmen der G2/M-Phase des Zellzyklus, wobei das Konstrukt enthält einen Cyclin-B1-Promotor (A), eine Cyclin-B1-Destruktionsbox (D-Box) (B), Cyclin B1 CRS (C) und einen GFP-Reporter (D).

[0071] **Fig. 4** stellt die Expression eines Nukleinsäure-Konstrukts dar, das den G2/M-Zellzyklus-Phasenmarker in einer Population unsynchronisierter Zellen exprimiert. Jede Zelle zeigt cyclische Expression und Zerstörung des Fluoreszenzprodukts vom Konstrukt, resultierend in einem kontinuierlichen „Blinklicht“-Muster der Fluoreszenz von allen Zellen in der Population. Die Analyse der Fluoreszenzintensität jeder Zelle zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 ergibt eine dynamische Information über den Zellpositionsstatus jeder Zelle.

[0072] **Fig. 5** ist ein Balkendiagramm, das den Effekt der Zellzyklus-Blockiermittel auf die GFP-Fluoreszenz von einem Zellzyklusphasenmarker gemäß der Erfindung zeigt. A repräsentiert Zellen, die in der Mitose durch Demecolchicin inhibiert sind, B repräsentiert Steuerzellen und C repräsentiert Zellen, die bei der G1/S-Phase durch Mimosin inhibiert sind;

[0073] **Fig. 6** ist eine Reihe von Zeitraffer-Fotografien, die eine Zelle zeigen, in die das Konstrukt, das im Beispiel 1 beschrieben ist, mikroinjiziert worden ist, und die eine Mitose gemäß Beispiel 3 durchläuft.

[0074] **Fig. 7** ist eine Reihe von Zeitrafferfotografien, die eine U2-OS-Zelle zeigen, die das in Beispiel 1 beschriebene Konstrukt exprimiert, und die eine Mitose gemäß Beispiel 4 durchläuft. Im Feld A ist die Zelle auf der linken Seite in der G2-Phase des Zellzyklus, in Feld B ist die Zelle in die Prophase eingetreten, in Feld C befindet sich die Zelle in der Metaphase, in Feld D befindet sich die Zelle in der Telophase und in Feld E fluoreszieren die zwei Tochterzellen nicht und befinden sich in der G1-Phase.

[0075] **Fig. 8** ist ein Diagramm, das die relative Fluoreszenz einer U2-OS-Zelle und ihrer Nachkommen zeigt, die das in Beispiel 1 beschriebene Konstrukt gemäß Beispiel 4 stabil exprimieren. Die Zelle durchläuft die Mitose (A) nach vier Stunden und teilt sich in zwei Tochterzellen (1,2). Die Tochter 1 durchläuft dann die Mitose (B) bei 34 h und teilt sich in zwei Enkel (1.1 und 1.2) und die Tochter 2 durchläuft die Mitose bei 42 h (C) und unterteilt sich in zwei Enkel (2.1 und 2.2). Die fettgedruckten Pfeile zeigen den Anstieg in der Fluoreszenz der Tochterzellen während der G2-Phase und vor der Mitose.

[0076] **Fig. 9** ist eine FACS-Analyse einer U2-OS-Zelllinie, die ein eGFP enthaltendes Konstrukt gemäß Beispiel 5 stabil exprimiert. Das obere Diagramm zeigt ein Histogramm von Propidiumiodid, das mit FL3A (rote Fluoreszenz) färbt, aufgetragen auf der X-Achse gegen die Anzahl von Zellen mit jener Fluoreszenz auf der Y-Achse. Dieses Diagramm veranschaulicht, dass der Anteil von Zellen in G1, S und G2/M sind wie erwartet. Das untere Diagramm ist eine Auftragung von Punkten derselben Zellen, die ein FL3A (rot) auf der X-Achse und FL1H (grüne Fluoreszenz) auf der Y-Achse zeigt. Das diagonale Muster (in Boxen eingeteilt) zeigt an, dass Zellen in G2/M mehr grüne Fluoreszenz aufweisen als S-Phasen-Zellen, die wiederum mehr Fluoreszenz als G1-Phasen-Zellen besitzen.

[0077] **Fig. 10** ist eine FACS-Analyse, die den Effekt von Zellzyklusinhibitoren auf die relative grüne Fluoreszenzintensität der stabilen, in Beispiel 5 beschriebenen Zelllinie gemäß Beispiel 6 zeigt. Wie in **Fig. 9** zeigen die Histogramme (auf der linken Seite) zwei Anzahlen von Zellen (Y-Achse) gegen FL3A und die Auftragung der Punkte (auf der rechten Seite) zeigen dieselben Zellen, die mit FL1H (Y-Achse) gegen FL3A (X-Achse) aufgetragen sind. Die zwei oberen Diagramme zeigen Steuerungszellen, die nicht mit einem Zellzyklusinhibitor behandelt worden sind. Wie gesehen werden kann, zeigen diese Zellen das typische Zellzyklusprofil (A) und besitzt ein diagonales Muster, das anzeigt, dass Zellen mit mehr GFP in dem G2/M-Teil des Zellzyklus sind. Die mittleren zwei Diagramme zeigen Zellen, die blockiert sind in G2/M durch Colchicin (C). Die Mehrzahl dieser Zellen besitzen eine relativ hohe grüne Fluoreszenz (D). Die unteren zwei Diagramme zeigen Zellen, die teilweise in G1/S durch Mimosin (E) blockiert worden sind. Die Mehrzahl dieser Zellen besitzen eine relativ geringe grüne Fluoreszenz (F).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Beispiele

1. Herstellung des DNA-Konstrukts

i) Das N-terminale Drittel der Cyclin-B1-mRNA (Aminosäuren 1-171), die die Cyc-linB1-Destruxionsbox und das NES kodieren, wurde amplifiziert mit HindIII und Bam-HI-Enden unter Verwenden von Standard PCR-Techniken und den folgenden Primern:

GGGAAGCTTAGGATGGCGCTCCGAGTCACCAGGAAC

GCCGGATCCCACATATTCCTACTACAAAGGTT.

ii) Das Gen für wtGFP wurde amplifiziert mit Primern, die entworfen sind, um Restriktionsstellen einzufüh-

ren, die die Konstruktion von Fusionsproteinen vereinfachen würden. Das PCR-Produkt wurde kloniert zu pTARGET (Promega) gemäß der Instruktionen des Herstellers und Mutationen (F64L/S175G/E222G) wurden eingeführt unter Verwenden des Stellen-gerichteten QuikChange-Mutagenese-Kits (Stratagene). Konstrukte wurden verifiziert durch automatisiertes DNA-Sequenzieren. Die DNA, die die Mutante GFP kodiert, wurde dann kloniert stromabwärts des Cyclin-B1-terminalen Bereichs unter Verwenden von BamHI- und Sall-Restriktionsstellen.

iii) Der Zellzyklus-abhängige Bereich des Cyclin-B1-Promotors (-150 → +182) wurde amplifiziert mit SacII- und HindIII-Stellen und kloniert stromaufwärts vom N-terminalen Cyclin-B1-Bereich und dem GFP-Fusionsprotein.

iv) Der Promotor und das rekombinante Protein, das DNA kodiert, wurde exzisiert und kloniert anstelle des CMV-Promotors in einem BglII/NheI-geschnittenen, von pCI-Neo-abgeleiteten Vektor.

2. Effekt der Zellzyklus-Blockiermittel auf GFP-Fluoreszenz vom Zellzyklusphasenmarker unter Verwenden transient transfizierter Zellen.

[0078] U2OS-Zellen (ATCC HTB-96) wurden in Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte kultiviert. Zellen wurden transfiziert mit einem Zellzyklusreporterkonstrukt, hergestellt gemäß Beispiel 1, umfassend einen Cyclin-B1-Promotor, der betreibbar an die Sequenzen gebunden ist, die die Cyclin-B1-D-Box, das Cyclin-B1-CRS und das GFP in einem pCORON4004-Vektor (Amersham Biosciences) kodieren, unter Verwenden von Fugene 6 (Roche) als das Transfektionsmittel.

[0079] Nach 24 h der Kultur wurden die Zellen den spezifischen Zellzyklus-Blockern Mimosin (blockiert bei G1S-Phasengrenzen) oder Demecolcin (blockiert in M-Phase) ausgesetzt. Kontrollzellen wurden dem Kulturmedium allein ausgesetzt.

[0080] Die Zellen wurden inkubiert für weitere 24 h und dann analysiert auf eine Kern-GFP-Expression unter Verwenden eines konfokalen Scanningbildgebers mit einer automatisierten Bildanalyse (IN Cell Analysis System, Amersham Biosciences).

[0081] Wie in [Fig. 5](#) gezeigt ist, zeigten Zellen, die Demecolcin ausgesetzt waren, eine vergrößerte Fluoreszenz verglichen zu Kontrollzellen, während Zellen, die Mimosin ausgesetzt waren, eine verringerte Fluoreszenz im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der vorgeschlagenen Verwenden des Zellzyklusphasenreporters der Erfindung. Zellen, die in der G1/S-Phase (Mimosin-behandelt) blockierten, vor dem Zeitpunkt der Aktivierung des Cyclin-B1-Promotors, zeigen eine verringerte Fluoreszenz, während Zellen, die in der M-Phase (Demecolcin-behandelt) blockieren, vor dem Zeitpunkt der Wirkung der Cyclin-B1-D-Box eine vergrößerte Fluoreszenz zeigen.

[0082] Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Zellzyklusphasenreporter der vorliegenden Erfindung geeignet sind zum Detektieren von Mitteln, die die Zellzyklusprogression in einem transienten System modulieren, und ausserdem ermöglichen solche Reporter die Identifikation der Phase des Zellzyklus, in dem die Zellen blockiert sind.

3. Mikroinjektion und Zeitrafferfotografie des Konstrukts

[0083] HeLa-Zellen wurden mikroinjiziert mit dem gemäß Beispiel 1 hergestellten Konstrukt und untersucht durch Zeitraffermikroskopie, wie gezeigt in [Fig. 6](#). Differential Interference Contrast (DIC)-Bilder sind auf der linken Seite gezeigt, mit dem entsprechenden Fluoreszenzbild auf der rechten Seite. Der Rahmen A zeigt eine Zelle (mit Bogen versehen) in der Metaphase, die eine helle Fluoreszenz im Kern zeigt. Die Rahmen B und C zeigen dieselbe Zelle zu späteren Zeitpunkten in der Anaphase (B) und in der späten Anaphase (C). Die DIC-Bilder von B und C zeigen die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen (angezeigt durch zwei Pfeile), die entsprechenden Fluoreszenzbilder zeigen den Verlust der Fluoreszenz-begleitenden Zerstörung des Fluoreszenzkonstrukts, wenn der Zellzyklus voranschreitet.

4. Stabile Zelllinienproduktion und Zeitrafferfotografie

[0084] U2-OS-Zellen (ATCC HTB-96) wurden transfiziert mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Konstrukt und man ließ sie wachsen für mehrere Monate in einem Kulturmedium, das 1 mg/ml Geneticin enthielt, um Zellen zu selektieren, die stabil das Konstrukt exprimieren. Eine Anzahl von Klone wurden durch Standardverfahren aufgenommen, (z.B. beschrieben in Freshney, Kapitel 11 in Culture of Animal Cells, (1994) Wiley-Liss Inc) und ein Klon, das fluoreszierende Zellen enthielt, wurde isoliert. Diese Zelllinie wurde auf 37°C in Kulturmedien ge-

halten, das 25 mM HEPES enthielt und eine Fluoreszenz und ein übertragenes Bild der Zellen wurde alle 15 min über eine Zeitdauer von 24 h aufgenommen unter Verwenden einer Standard-Xenonlampe bei 488 nm. Die [Fig. 7](#) zeigt fünf Rahmen aus einem Abschnitt des Bildes, der anzeigt, dass sich die Zelllinie wie erwartet verhält. Zellen in G2 zeigen grüne Fluoreszenz im Cytoplasma, Zellen in der frühen Mitose besitzen eine Fluoreszenz vorwiegend im Kern und nach der Mitose wird das Reporter-gen abgebaut und die Zellen verlieren ihre Fluoreszenz.

[0085] [Fig. 8](#) zeigt das Schicksal einer Zelle vom selben Klon, der über 48 h überwacht wurde, und der zwei Zellteilungen durchlief, um vier Enkelzellen zu erzeugen. Für jeden Zeitpunkt wird die durchschnittliche Intensität jeder der Nachkommen der Zellen gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Wie gesehen werden kann, tritt die ursprüngliche Zelle in die Mitose ein bei ~4 h, eine der Töchter teilt sich bei 32 h und die andere bei 42 h im Experiment. Wenn die Zellen die S-Phase verlassen und in die G2 eintreten, gibt es einen stetigen Anstieg in der durchschnittlichen Intensität, bis die Zelle in die Mitose eintritt, wenn die Zelle zusammenreißt und die durchschnittliche Intensität dramatisch ansteigt.

5. Herstellung einer helleren stabilen Zelllinie und nachfolgende FACS-Analyse

[0086] Die Sequenz des grün fluoreszierenden Protein-Reporters in dem im Beispiel 1 beschriebenen Vektor wurde ersetzt durch verstärktes GFP (EGFP; Cormack, B.P. et al, Gene (1996), 173, 33-38; BD Clontech) durch Standardverfahren. Das EGFP-Gen ist eine hellere Form des GFP, das Mutationen F64L und S65T enthält. Zusätzlich enthält EGFP Codons, die geändert worden sind, um eine Expression in Säugerzellen zu optimieren. Dieses neue Konstrukt wurde transfiziert zu U2-OS-Zellen und eine Anzahl von Kolonien wurde isoliert durch Selektion mit Geneticin, gefolgt von Sortieren einzelner Zellen unter Verwenden eines mit Fluoreszenz aktivierten Zellsortierers. Diese Klone zeigten eine hellere Fluoreszenz als jene, die im Beispiel 4 erzeugt wurden, und wie erwartet schien die Fluoreszenzintensität und -stelle gemäß der Zellzyklusphase der Zelle zu variieren.

[0087] Die Zellen wurden für eine FACS-Analyse durch Standardverfahren hergestellt. Kurzgesagt wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert unter Verwenden von Cyto-Fix/CytoPerm (Becton Dickinson) gemäß der Prozeduren des Herstellers. Die Zellen wurden dann behandelt mit 50 µg/ml RNAse und 0,4% Triton X-100 und gegengefärbt mit 100 µg/ml Propidiumiodid. Der Grad der Propidiumiodid-Färbung ist proportional zu der Menge der DNA in der Zelle und deshalb ein Maß für die Zellzyklusphase der Zelle. Wie in [Fig. 9](#) gesehen werden kann, scheint, wie erwartet, der Grad des roten Propidiumiodid-Färbens und die Menge der grünen GFP-Fluoreszenz in den Zellen proportional zu sein.

6. Der Effekt von Zellzyklus-inhibierenden Arzneimitteln auf die GFP-Expressionsniveaus.

[0088] Die in Beispiel 5 hergestellten Zellen wurden gezogen in 25 cm²-Kolben und behandelt mit entweder 100 ng/ml Demecolcin (Sigma) oder 1 mM Mimosin (Sigma) für 24 h. Die Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und gefärbt mit Propidiumiodid, wie beschrieben in Beispiel 5. Eine FACS-Analyse zeigte, dass, wie erwartet, Zellen, die mit dem Colchicin-Analogen behandelt waren, in der G2/M anhielten und Zellen, die mit Mimosin behandelt worden waren, an der G1/S-Grenze anhielten. Es wird auch erwartet, dass die Zellen, die in der G2/M angehalten wurde, heller waren als die Zellen, die bei G1/S angehalten wurden ([Fig. 10](#)).

Sequenzliste

<110> Amersham Biosciences UK Ltd
<120> Verfahren zum Bestimmen der Zellzyklusposition
<130> PL0161
<140> PCT/GB02/04258
<141> 2002-09-12
<160> 2
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 36
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<220>
<223> synthetisches Oligonukleotid
<400> 1

gggaagctta ggatggcgct ccgagtcacc aggaac 36

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<220>
<223> synthetisches Oligonukleotid
<400> 2

gccggatccc acatattcac tacaaggtt 30

Literaturstellen, zitiert in der Beschreibung

[0089] Die Liste von Literaturstellen, die vom Anmelder zitiert sind, dienen nur zum Nutzen des Lesers. Sie bilden nicht Teil des europäischen Patendokumentes. Sogar obwohl große Sorgfalt aufgebracht wurde, die Literaturstellen zu erarbeiten, können Irrtümer oder Unterlassungen nicht ausgeschlossen werden und das EPA erkennt keinerlei Haftung in dieser Hinsicht an.

Patentdokumente, zitiert in der Beschreibung

- EP 798386 A
- WO 0029602 A
- US 6048693 A

- US 5849508 A
- US 6103887 A
- US 6159691
- US 6066476 A, Tsien, R.
- US 6172188 B, Thastrup, O.
- US 6077707 A, Tsien, R.
- WO 0157237 A
- US 4683202 A
- US 5288641 A
- GB 0204258 W

Nicht-Patent-Literatur, zitiert in der Beschreibung

- FLATT, P.M.; PIETENPOL, J.A. Drug Metab. Rev., 2000, Band 32 (3-4), 283-305
- BUOLAMWINI, J.K. Current Pharmaceutical Design, 2000, Band 6, 379-392
- BARLOGIE, B. et al. CancerRes., 1983, Band 43 (9), 3982-97
- HERMAN. Cancer, 1992, Band 69 (6), 1553-1556
- PINES, J. Nature Cell Biology, 1999, Band 1, E73-E79
- KOHN. Molecular Biology of the Cell, 1999, Band 10, 2703-2734
- CLUTE ; PINES. Nature Cell Biology, 1999, Band 1, 82-87
- PIAGGIO et al. Exp. Cell. Research, 1995, Band 216, 396-402
- COGSWELL et al. Mol. Cell. Biology, 1995, Band 15, 2782-2790
- HUANG ; RAFF. EMBO Journal, 1999, Band 18 (8), 2184-2195
- HAGTING et al. Current Biology, 1999, Band 9, 680-689
- MATEUS, C.; AVERY, S. Yeast, 2000, Band 16, 1313-1323
- HAUSER; BAUER. Plant and Soil, 2000, Band 226, 1-10
- BRANDEIS; HUNT. EMBO J., 1996, Band 15, 5280-5289
- COGSWELL et al. Mol. Cell Biol., 1995, Band 15 (5), 2782-90
- HWANG et al. J.Biol.Chem., 1995, Band 270 (47), 28419-24
- PIAGGIO et al. Exp. Cell Res., 1995, Band 216 (2), 396-402
- KOMER et al. J.Biot.Chem., 2001, Band 276 (13), 9662-9
- HENGLEIN et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1994, Band 91 (12), 5490-4
- ZWICKER et al. Embo J., 1995, Band 14 (18), 4514-22
- TOMMASI; PFEIFER. Mol. Cell Biol., 1995, Band 15 (12), 6901-13
- ZWICKER et al. Embo J, 1995, Band 14 (18), 4514-22
- KOMER; MULLER. J.Biol.Chem., 2000, Band 275 (25), 18676-81
- KORNER et at. Nucl. Acids Res., 1997, Band 25 (24), 4933-9
- BOTZ et al. Mol. Cell Biol., 1996, Band 16 (7), 3401-9
- KORNER; MULLER. J.Biol.Chem., 2000, Band 275 (25), 18676-81
- HATEBOER et al. Mol. Cell Biol., 1998, Band 18 (11). 6679-97
- YAN et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1998, Band 95 (7), 3603-8
- SHIMADA et al. J. Biol. Chem., 1986, Band 261 (3), 1445-52
- SHIMADA; NIENHUIS. J.Biol.Chem., 1985, Band 260 (4), 2468-74
- VAN WIJNEN et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1994, Band 91, 12882-12886
- SACHS, A.B. Cell, 2000, Band 101, 243-5
- CORNELIS et al. Mol. Cell, 2000, Band 5 (4), 597-605
- HONDA et at. Gastroenterology, 2000, Band 118, 152-162
- PYRONET et al. Mol. Cell, 2000, Band 5, 607-616
- PYRONNET et al. Mol. Cell, 2000, Band 5 (4), 607-16
- GLOTZER et al. Nature, 1991, Band 349, 132-138
- YAMANO et al. EMBOJ., 1998, Band 17 (19), 5670-8
- CLUTE; PINES. Nature Cell Biology, 1999, Band 1, 82-87
- DEN ELZEN; PINES. J. Cell Biol., 2001, Band 153 (1), 121-36
- GELEY et at. J. Cell Biol., 2001, Band 153, 137-48
- PFLEGER ; KIRSCHNER. GenesDev, 2000, Band 14 (6), 655-65
- YEY et at. Biochem Biophys Res Commun., 2001. Band 281, 884-90
- BERSSET et at. Mol. Cell Biol., 2002, 4463-4476
- MONTAGNOLI et al., Genes Dev., 1999, Band 13 (9), 1181-1189
- NAKAYAMA et al. EMBO J., 2000, Band 19 (9), 2069-81
- TOMODA et al. Nature, 1999, Band 398 (6723), 160-5

- ROGERS et al. Science, 1986, Band 234, 364-8
- CORMACK, B.P. et al. Gene, 1996, Band 173, 33-38
- BD CLONTECH; LABAS, Y.A. et al. ProcNatlAcadSciUSA, 2002, Band 99, 4256-61
- SACHS et al. Cell, 2000, Band 101, 243-245
- JANG et al. J. Virology, 1988, Band 62, 2636-2643
- PELLETIER ; SONENBERG. Nature, 1988, Band 334, 320-325
- NUGENT et al. J. Cell. Sci., 1991, Band 99, 669-674
- SAMBROOK, J. et al. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- BEAUCAGE; CARUTHERS. Tetrahedron Letters, 1981, Band 22, 1859-1869
- MATTHES et al. EMBO J., 1984, Band 3, 801-805
- SAIKI et al. Science, 1988, Band 239, 487-491
- PCR protocols. Academic Press, 1990
- TUR-KASPA et al. Mol. Cell Biol., 1986, Band 6, 716-718
- POTTER et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1984, Band 81, 7161-7165
- GRAHAM; VAN DER EB. Virology, 1973, Band 52, 456-467
- RIPPE et al. Mol. Cell Biol., 1990, Band 10, 689-695
- STEWART et al. Human Gene Therapy, 1992, Band 3, 267
- TORCHILIN et al. FASEB J, 1992, Band 6, 2716
- ZHU et al. Science, 1993, Band 261, 209-211
- LEDLEY et al. J. Pediatrics, 1987, Band 110, 1
- NICOLAU et al. Proc.Nat.Acad.Sci.,USA, 1983, Band 80, 1068
- NICOLAU; SENF. Biochem.Biophys.Acta, 1982, Band 721, 185-190
- JIAO et al. Biotechnology, 1993, Band 11, 497-502
- MILLER. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992, Band 158, 1
- BAICHWAL; SUGDEN. Gene Transfer. Plenum Press, 1986, 117-148
- MUZYCZKA. Curt. Top. Microbiol. Immunol., 1992, Band 158, 97-129
- KRASAGAKIS, K.J et al. Cell Physiol., 2001, Band 187 (3), 386-91
- PARIS, S. et al. Clin.Exp.Metastasis, 1999, Band 17 (10), 817-22
- PYE D; WATT, D.J. J. Anat., 2001, Band 198 (Pt 2), 163-73
- BROD, S.A. et al. Transplantation, 2000, Band 69 (10), 2162-6
- TERSKIKH. Science, 2000, Band 290, 1585-8
- OKAZAWA et al. J.Biol.Chem., 1998, Band 273, 12584-12592
- ABEL et al. J.Biol.Chem., 2000, Band 275, 32543-32551
- KRONE P.H.; HEIKKILA J.J. Development, 1989, Band 106 (2), 271-81
- HORARD B. et al. Insect Mol.Biol., 1994, Band 3(4), 61-5
- BISHOP J.O. Reprod. Nutr. Dev., 1996, Band 36 (6), 607-18
- DANIELLS, C. et al. Mutat.Res., 1998, Band 399 (1), 55-64
- SILLS, R.C. et al. Toxicol.Lett., 2001, Band 20 (1-3), 187-98
- FRESHNEY. Culture of Animal Cells. Wiley-Liss Inc, 1994

Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, kodierend ein detektierbares Lebzellen-Reporter-molekül, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:
 - i) mindestens einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steuerelement,
 - ii) einem Zerstörungs-Steuerelement, und
 - iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steuerelement.

2. Konstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressions-Steuerelement die Transskription in einer Zellzyklus-spezifischen Weise steuert.

3. Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Expressions-Steuerelement die Translation in einer Zellzyklus-spezifischen Weise steuert.

4. Konstrukt nach Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Expressions-Steuerelement ausgewählt ist aus einem Zellzyklus-spezifischen Promotor und einem Zellzyklus-spezifischen IRES.

5. Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Cyclin-B1-Promotor, Cdc25B-Promotor, Cyclin-A2-Promotor, Cdc2-Promotor, Cdc25C-Promotor, Cyclin-E-Promotor

tor, Cdc6-Promotor, DHFR-Promotor und Histone-Promotoren.

6. Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei das IRES ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus G2-IRES, HCV-IRES, ODC-IRES, C-myc-IRES und p58-PITSLRE-IRES.

7. Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Zerstörungs-Steurelement ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Cyclin-B1-D-Box, Cyclin-A-N-Terminus, KEN-Box, Cyclin-E und p27Kip1.

8. Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Zellzyklusphasenspezifische Raumlokalisations-Steurelement die zytoplasmische Cyclin-B1-Retentionssequenz (CRS) einschließlich seiner NES ist.

9. Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Lebendzellen-Reportermolekül ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus fluoreszierendem Protein und Enzym.

10. Konstrukt nach Anspruch 9, wobei das fluoreszierende Protein ausgewählt ist aus Grün Fluoreszierendem Protein (GFP) und einem funktionellen GFP-Analogen, in dem die Aminosäuresequenz des Wild-Typ-GFP geändert wurde durch Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution.

11. Konstrukt nach Anspruch 9, wobei der Enzymreporter ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus β -Lactamase und Nitroreduktase.

12. Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend einen Cyclin-B1-Promotor, eine Cyclin-B1-Zerstörungsbox (D-Box), eine zytoplasmatische Cyclin-B1-Retentionssequenz (CRS) und ein Grün Fluoreszierendes Protein (GFP).

13. Nukleinsäure-Reporterkonstrukt, umfassend einen Expressionsvektor, umfassend:

- a) ein Vektor-Rückgrat, umfassend
 - i) einen bakteriellen Ursprung der Replikation; und
 - ii) ein bakterielles Arzneimittel-Resistenz-Gen;
- b) ein Zellzyklusphasen-spezifisches Expressions-Steurelement;
- c) ein Zerstörungs-Steurelement;
- d) ein Zellzyklusphasen-spezifisches Raumlokalisations-Steurelement; und
- e) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Reportermolekül kodiert.

14. Konstrukt nach Anspruch 13, zusätzlich enthaltend ein eukaryontisches Arzneimittel-Resistenz-Gen.

15. Wirtszelle, die keine menschliche Embryonenzelle ist, transfiziert mit einem Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

16. In-vitro-Verfahren zum Bestimmen der Zellzyklus-Position einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Expressieren in einer Zelle ein Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 14; und
- b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem Reportermolekül emittiert werden.

17. In-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effektes einer Testverbindung, bestehend aus einem Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid, auf die Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Expressieren in der Zelle bei Abwesenheit und bei Vorhandensein der Testverbindung ein Nukleinsäure-Reporter-Konstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reportermolekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von
 - i) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steurelement,
 - ii) einem Zerstörungs-Steurelement, und
 - iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steurelement;
 wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus; und
- b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem Reportermolekül emittiert wird, wobei eine Differenz zwischen den emittierten Signalen, die bei Abwesenheit und bei Vorhandensein der Testverbindung gemessen werden, den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

18. In-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effektes einer Testverbindung, bestehend aus einem Arzneimittel-

tel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid, auf die Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

a) Exprimieren in der Zelle bei Vorhandensein der Testverbindung ein Nukleinsäure-Reporterkonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reporter-molekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steurelement,

ii) einem Zerstörungs-Steurelement, und

iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steurelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle an einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus; und

b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem Reporter-molekül emittiert werden,

c) Vergleichen des emittierten Signals bei Vorhandensein der Testverbindung mit einem bekannten Wert für das emittierte Signal in Abwesenheit der Testverbindung;

wobei eine Differenz zwischen dem emittierten Signal, das bei Vorhandensein der Testverbindung gemessen wird, und dem bekannten Wert in Abwesenheit der Testverbindung den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

19. In-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effekts einer Testverbindung, bestehend aus einem Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid auf der Zellzyklusposition einer Säugerzelle, wobei das Verfahren umfasst:

a) Bereitstellen von Zellen, die ein Nukleinsäure-Reporterkonstrukt enthalten, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein detektierbares Lebendzellen-Reporter-molekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steurelement,

ii) einem Zerstörungs-Steurelement, und

iii) einem Zellzyklusphase-spezifischen Raumlokalisations-Steurelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zeile an einem vorbestimmten Punkt in dem Zellzyklus;

b) Kultivieren erster und zweiter Populationen der Zellen jeweils bei Vorhandensein und in Abwesenheit der Testverbindung und unter Bedingungen, die die Expression des Nukleinsäure-Reporterkonstrukts erlauben; und

c) Messen der Signale, die von dem Reporter-molekül in den ersten und zweiten Zellpopulationen emittiert werden;

wobei eine Differenz zwischen den emittierten Signalen, die in der ersten und der zweiten Zellpopulation gemessen werden, den Effekt der Testverbindung auf die Zellzyklusposition der Zelle anzeigt.

20. In-vitro-Verfahren des Bestimmens des Effektes des Säugerzellenzyklus auf die Expression, Translokation oder sub-zellulären Verteilung eines ersten detektierbaren Reporters, der dafür bekannt ist, dass er in Antwort auf eine Testverbindung variiert, die besteht aus einem Arzneimittel, einer Nukleinsäure, einem Hormon, einem Protein oder einem Peptid, wobei das Verfahren umfasst:

a) Exprimieren in der Zelle bei Vorhandensein der Testverbindung ein zweites Nukleinsäure-Reporterkonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ein detektierbares Lebendzellen-Reporter-molekül kodiert, das betreibbar verbunden ist mit und unter der Steuerung steht von:

i) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Expressions-Steurelement,

ii) einem Zerstörungs-Steurelement, und

iii) einem Zellzyklusphasen-spezifischen Raumlokalisations-Steurelement;

wobei das Reporterkonstrukt exprimiert wird in einer Zelle bei einem vorbestimmten Punkt im Zellzyklus;

b) Bestimmen der Zellzyklusposition durch Überwachen von Signalen, die von dem zweiten Reporter-molekül emittiert werden; und

c) Überwachen der Signale, die durch den ersten detektierbaren Reporter emittiert werden,

wobei die Beziehung zwischen der Zellzyklusposition, die durch b) bestimmt wird und dem Signal, das von dem ersten detektierbaren Reporter emittiert wird, anzeigt, ob oder ob nicht die Expression, Translokation oder sub-zelluläre Verteilung des ersten detektierbaren Reporters Zellzyklus-abhängig ist.

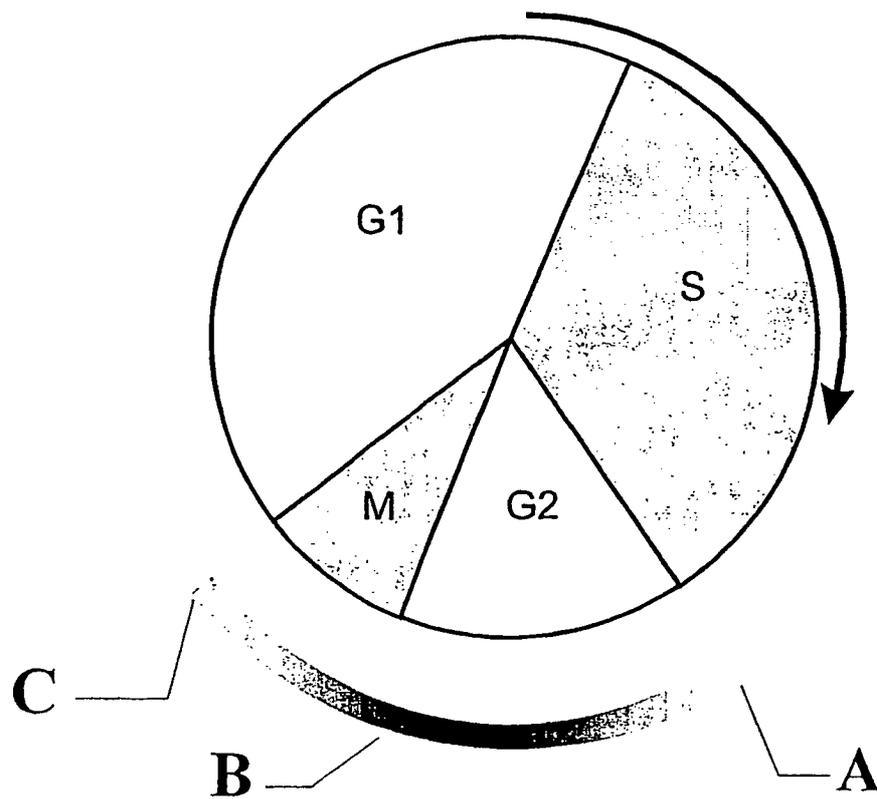
21. In-vitro-Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei das Nukleinsäure-Reporterkonstrukt das Konstrukt des Anspruchs 12 umfasst.

22. In-vitro-Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei die Testverbindung ein Mittel ist, ausgewählt aus einem Peptid oder Protein, das in der studierten Zelle exprimiert wird.

23. Nicht-menschlicher transgener Organismus, umfassend eine Zelle nach Anspruch 15.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Figur 1



Figur. 2

2A



2B



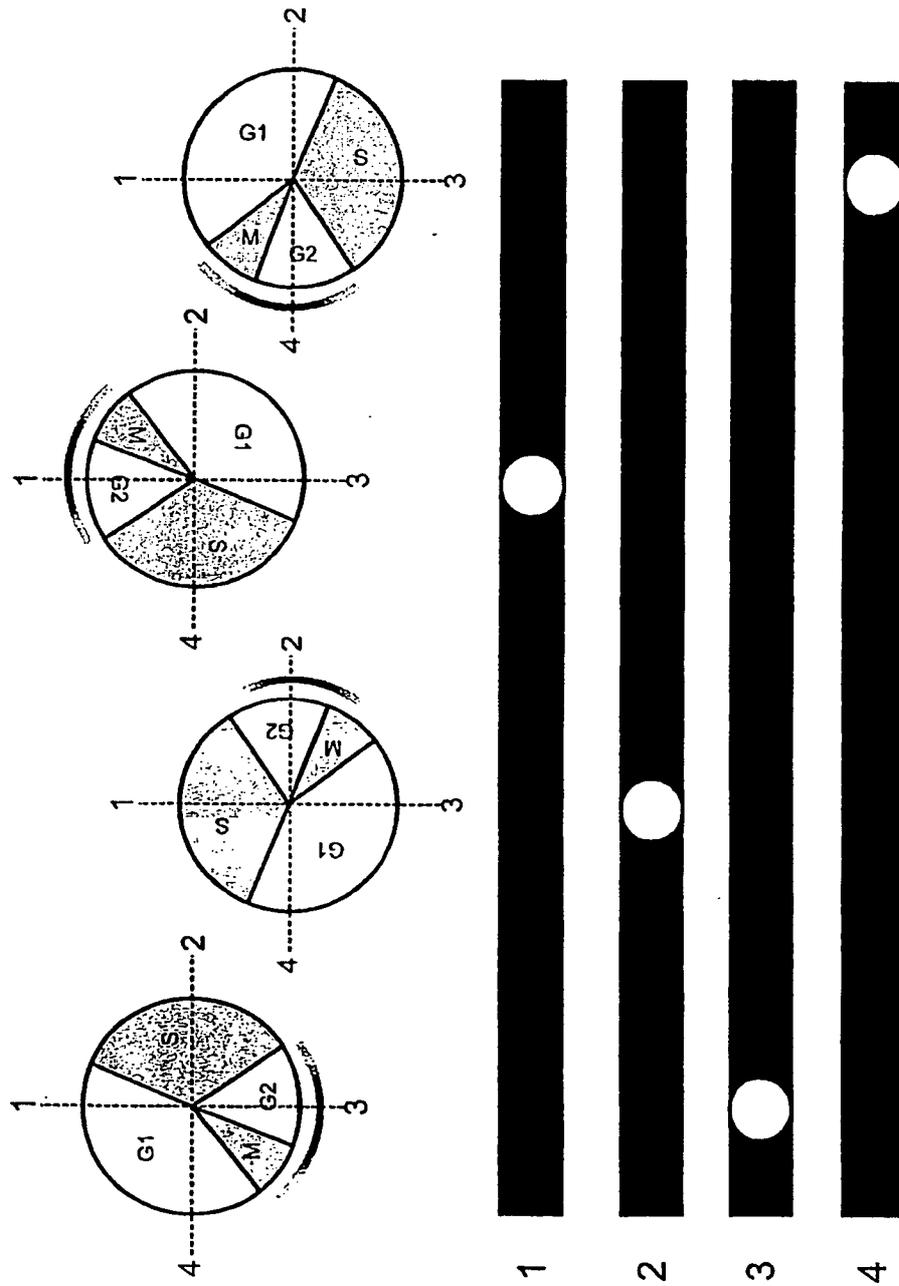
2C



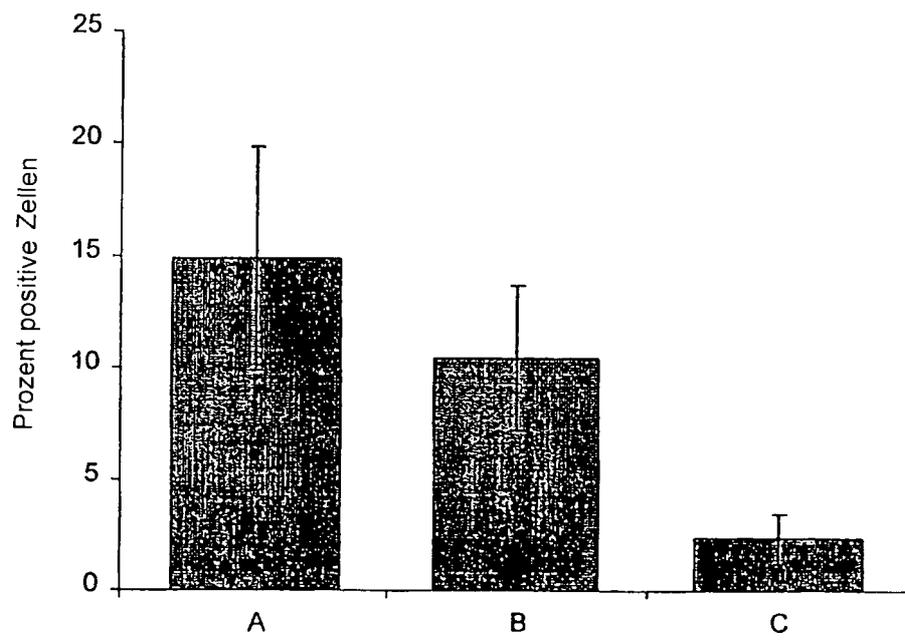
Figur. 3



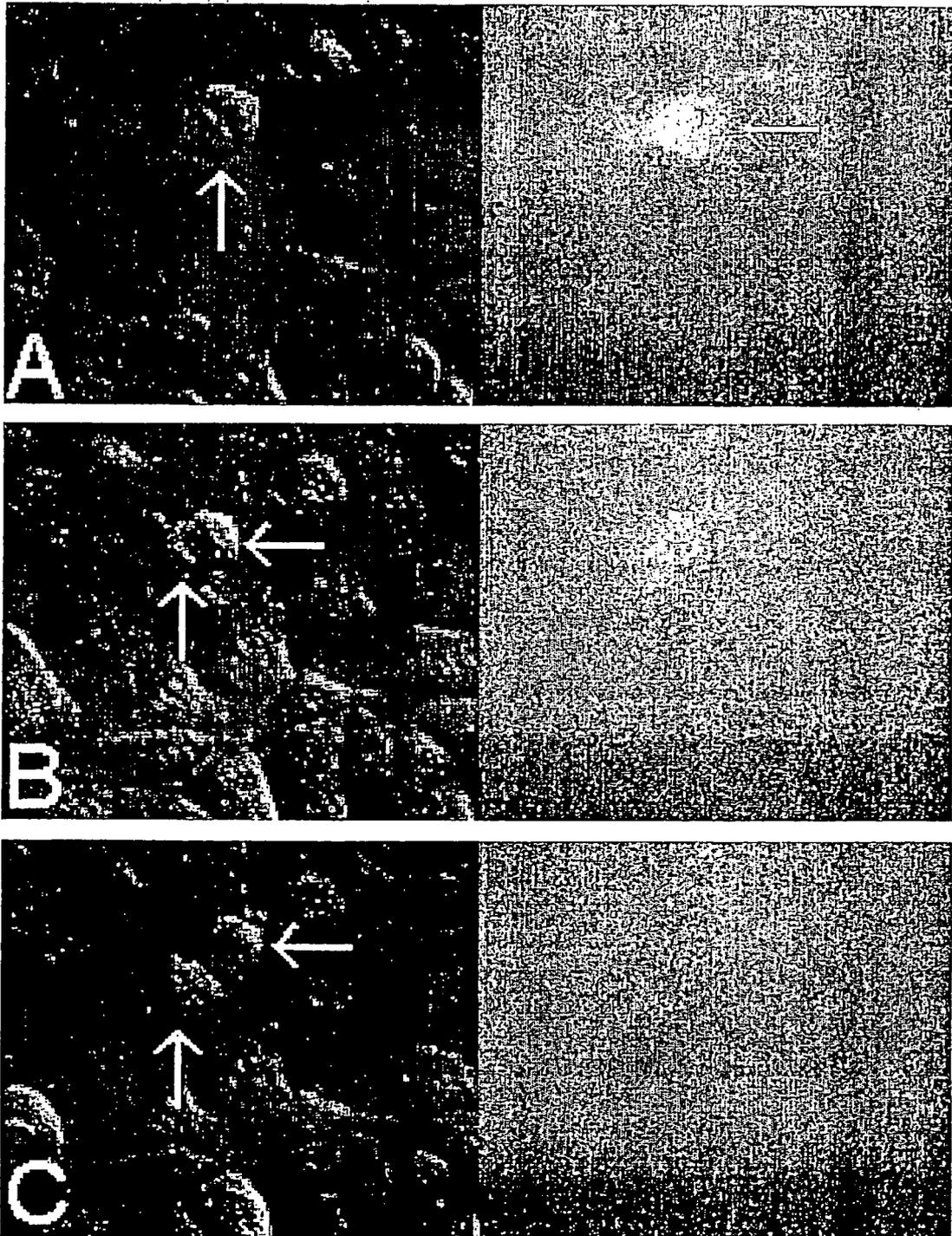
Figur 4



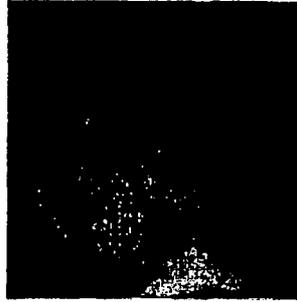
Figur 5



Figur 6



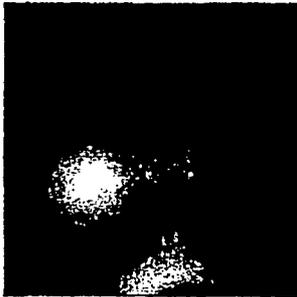
Figur 7



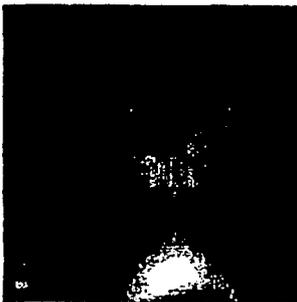
A



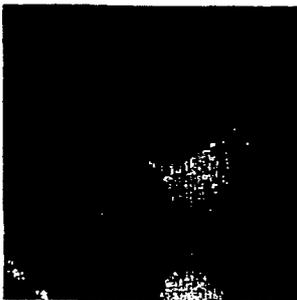
B



C

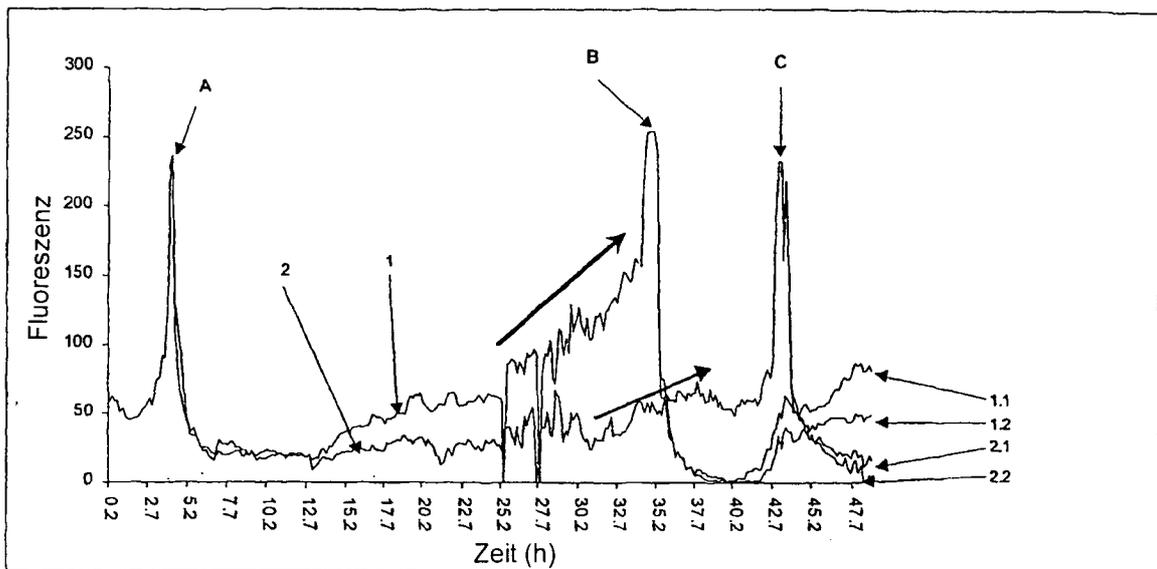


D

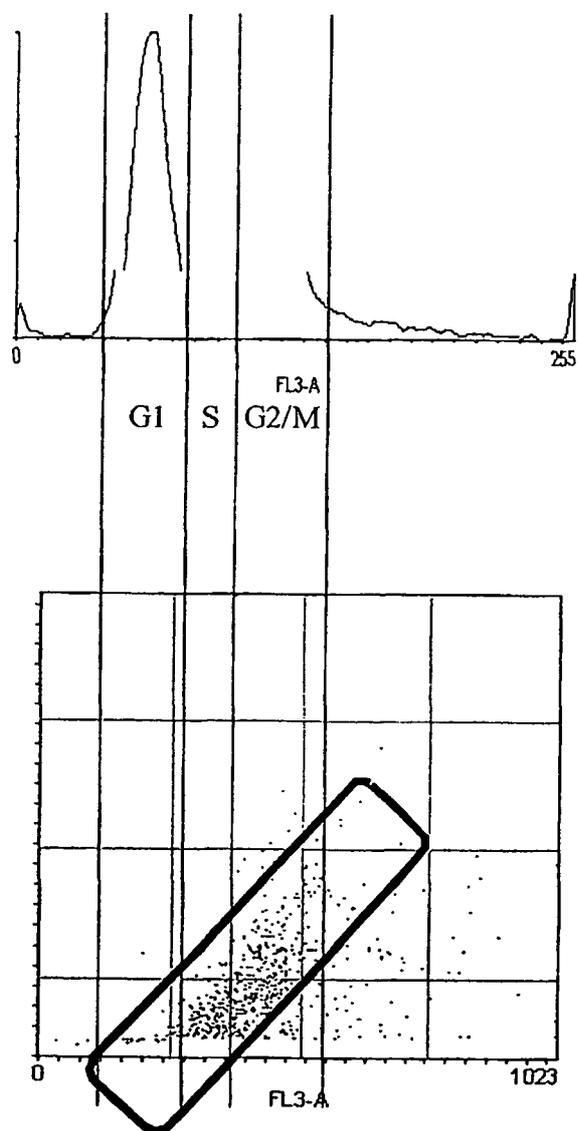


E

Figur 8



Figur 9



Figur 10

