

Struktura i funkcija gena receptora limfocita T za antigen i MHC

Dembić, Zlatko

Doctoral thesis / Disertacija

1987

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:073928>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



I. AUTOR

Ime i prezime ZLATKO DEMBIĆ
Datum i mjesto rođenja 18. ožujka 1954. Rijeka
Naziv i mjesto završene
prednja škole Gimnazija Rijeka
Naziv fakulteta i datum završetka Medicinski fakultet Rijeka
Tadašnje zaposlenje liječnik, Institut za imunologiju, Basel

II. DILEMNOG IJ - M. GISTARSKI RAD

N a s l o v STRUKTURA I FUNKCIJA GENA RECEPTORA LIMFOCITA
T ZA ANTIGEN I MHC
Ustanova ili mjesto gdje je Institut za imunologiju Basel
izrodjena
Broj str., slike, literatura 133 str. 22 sl. 151 ref.
Znanstvena disciplina Medicina
Fakultet na kojem je izvršena Medicinski fakultet Rijeka
obrana

III. OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme 2. veljače 1986.
Datum predaje rada 1. veljače 1987.
Datum sjednice Vijeća na kojoj 22. travnja 1987.
je rad prihvaćen
Sastav Komisije koje je rad prof. dr. Daniel Rukavina, doc. dr. Miljenko
ocijenile Derić, doc. dr. Stipan Jonjić i prof. dr.
Branke Vitale
Datum obrane rada 22. svibnja 1987.
Sastav Komisije pred kojom je
rad obranjen I s t i

SVEUČILIŠTE "VLADIMIR BAKARIĆ" U RIJECI

Medicinski fakultet

Zlatko Dembić

STRUKTURA I FUNKCIJA GENA RECEPTORA

LIMFOCITA T ZA ANTIGEN I MHC

Doktorska Disertacija

Rijeka, 1987

1. PREGOVOR

Ovaj rad je izrađen u Baselskom Institutu za Imunologiju, koji je osnovao i pomaže F. Hoffman-La Roche, Ltd.

Rad se većinom sastoji od dijelova objavljenih u slijedećim publikacijama:

DEMBIČ, Z., HAAS, W., WEISS, S., McCUBREY, J., KIEFER, H., VON BOEHMER, H. i STEINMETZ, M. 1986. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. Nature: 320, 232-238.

DEMBIČ, Z., VON BOEHMER, H. i STEINMETZ, M. 1986. The role of T-cell receptor α and β chain genes in MHC-restricted antigen recognition. Immunol. Today, 7, 308-311.

Zahvaljujem Werneru Haasu za stanične klonove BDFL1.1 i SPH1.3, te pomoć u funkcionalnoj analizi tranfektanata, Siegfriedu Weissu za pomoć pri sekvenciranju β lanaca BDFL, James McCubreyu za upućivanje u tehnike fuzije protoplasta i za tranfektant BD7-J9. Hansruedi Kieferu za sintezu oligonukleotida upotrebljenih za sekvenciranje DNK i analizu RNK; Haraldü von Boehmeru za pomoć pri funkcionalnoj analizi transfektanata i kritiku pri pisanju rada, te Michaelu Steinmetzu za podršku i savjete pri izradi i pisanju rada.

Zahvaljujem također B. Malissenu za L fibroblaste CA25.8.1, K. Fischer Lindahl za L fibroblaste LS5; B. Bogenu, R. Snodgrassu, K. Karjalainenu i F. Melchersu za sugestije i konstruktivnu kritiku pri pisanju nekih dijelova.

Također sam zahvalan svim tehničarima, koji su dijelom

bili uključeni u rad: O. Nikkanen, J. Mathur-Rochat, K. Schubiger, B. Johansson, B.H. Walch i R. Schulze.

Za izradu slika zahvaljujem L. Pomeroy i H.P. Bideru, i C. Plattner za tipkanje disertacije.

2. SAŽETAK

Receptor limfocita T za antigen i MHC je molekula glukoproteina koja se nalazi na staničnoj membrani i sastavljena je od dva polipeptidna lanca (α i β) povezana disulfidnim mostom. S ciljem da se pokaže kako su α i β lanci dovoljni za prepoznavanje kombinacije antigena i MHC molekula, funkcionalni geni za α i β lanac receptora su izolirani iz jednog citotoksičnog klona limfocita T i preneseni u drugi klon čija specifičnost prepoznavanja je različita. Geni za α i β lanac receptora su izolirani iz citotoksičnog klona BDFL1.1, koji uništava ciljne stanice koje nose D^d molekulu I razreda MHC i fluorescein (FL) kao antigen. Funkcionalni α i β geni su povezani s genom za rezistenciju prema neomicinu te su preneseni, pomoću metode fuzije protoplasta, u hibridom limfocita T nazvan SPH1.3 (citotoksični klon specifičan za hapten 3-(p-sulfofenildiazo)-4-hidroksioktenu kiselinu (SP) i K^k molekulu I razreda MHC). Analizom 41 transfektanta, pronađen je jedan klon (BD7-S17) koji je pravilno prepisivao ubačene α i β gene. U funkcionalnom testu (CML, test citotoksične limfolize) s podobnim ciljnim stanicama, BD7-S17 je pokazao specifičnost primaoca (SP + K^k) i, također, specifičnost davaoca (FL + D^d). Zaključeno je da su u ovom sastavu α i β lanci receptora limfocita T dovoljni za prijenos specifičnosti za antigen i MHC.

3. SUMMARY

The T-cell receptor for antigen and MHC appears to be a membrane spanning glycoprotein composed of at least two disulfide linked polypeptide chains (α and β). To find out whether α - and β -chains are sufficient for antigen and MHC recognition, functional T-cell receptor genes were isolated from one cytotoxic T-cell clone and transferred into T cells with different specificity. The α and β alleles were isolated from cytolytic T-cell clone BDFL1.1 which lyses targets carrying the D^d MHC molecule and coupled with fluorescein (FL) as antigen. The functional α and β genes were ligated with a selectable marker (neomycin resistance gene) and transferred by protoplast fusion into T-cell hybridoma SPH1.3 (a killer cell specific for hapten 3-(psulfophenyldiazo)-4-hydroxyphenyl acetic acid (SP) and K^k MHC class I molecule). Out of 41 transfectants, only one (BD7-S17) was found to express the introduced α and β chain genes. When tested in CML assay with the appropriate target cells, the BD7-S17 transfectant showed the host cell specificity (SP + K^k) and in addition, the donor cell specificity (FL + D^d). Therefore, in this system the T-cell receptor α and β chains are sufficient to transfer MHC-restricted antigen specificity.

4. SADRŽAJ

Br. strane

1. PREDGOVOR
2. SAŽETAK
3. SUMMARY
4. SADRŽAJ
5. UVOD
 - 5.1 Imunološko prepoznavanje
 - 5.2 Geni receptora limfocita T
 - 5.3 Dodatne molekule potrebne pri prepoznavanju limfocitima T
 - 5.4 Razvitak limfocita T
 - 5.5 Ontogeneza receptora limfocita T
 - 5.6 Koliko gena kodira specifičnost limfocita T
 - 5.7 Principi rekombinantne DNK tehnologije
 - 5.7.1 Transformacija
 - 5.7.2 Prekidanje i povezivanje DNK
 - 5.7.3 Vektori za kloniranje DNK
 - 5.7.4 Strategije kloniranja DNK
 - 5.7.5 Stvaranje genetskih knjižnica
 - 5.7.6 Pretraživanje knjižnice gena
 - 5.7.6.1 Imunokemijska detekcija klonova
 - 5.7.6.2 Hibridizacijske metode
 - 5.7.6.3 Biokemijske metode

5.7.7	Karakterizacija rekombinantne i genomske DNK	43
5.7.7.1	Agarozna i poliakrilamidna gel elektroforeza	43
5.7.7.2	Sekvenciranje DNK	46
5.7.8	Implikacije i aplikacije	49
6.	MATERIJAL I METODE	52
6.1	Materijal	52
6.1.1	Kemikalije	52
6.1.2	Stanični klonovi	52
6.2	Općenite metode	52
6.2.1	Izolacija genomske DNK	53
6.2.2	Izolacija plazmidske i kozmidske DNK	53
6.2.3	Izolacija DNK bakteriofaga λ	55
6.2.4	Izolacija RNK	56
6.2.5	Transformacija bakterija	57
6.2.5.1	Transformacija E. coli	57
6.2.5.2	Transdukcija u E. coli	58
6.2.6	Knjižnica genomske DNK	59
6.2.6.1	Potrebni materijal	59
6.2.6.2	Konstrukcija kozmidske knjižnice	60
6.2.6.2.1	Djelomična razgradnja genomske DNK	60
6.2.6.2.2	Izolacija 30-50 kb dugih DNK fragmenata	62
6.2.6.2.3	Priprema kozmidskog vektora	63
6.2.6.2.4	Spajanje vektora i DNK	64

	Br. strane
6.2.6.2.5 Pakiranje kozmida	64
6.2.6.2.6 Transdukcija pakiranih kozmida	65
6.2.6.3 Pretraživanje kozmidske knjižnice	66
6.2.7 Knjižnica gena komplementarne DNK (cDNK)	67
6.2.7.1 Puferi i mediji potrebni za konstrukciju	67
6.2.7.2 Konstrukcija cDNK knjižnice u λ gt11 vektoru	68
6.2.7.2.1 Sinteza prvog lanca cDNK	68
6.2.7.2.2 Sinteza drugog lanca cDNK	69
6.2.7.2.3 Razgradnja sa S1 nukleazom	69
6.2.7.2.4 Reakcija s T4 DNK polimerazom	71
6.2.7.2.5 Spajanje poveziivača s cDNK	71
6.2.7.2.6 Razgradnja s EcoRI	72
6.2.7.2.7 Kromatografija na biogelu	72
6.2.7.2.8 Spajanje cDNK s λ gt11 vektorom	72
6.2.7.2.9 Transdukcija pakirane rekombinantne cDNK	72
6.2.7.3 Pretraživanje cDNK knjižnice	73
6.2.8 Analiza DNA i RNK	74
6.2.8.1 Agarozna gel elektroforeza	74

6.2.8.2	Analiza DNK sa specifičnim probama	76
6.2.8.3	Sekvenciranje DNK	78
6.2.8.3.1	Metoda kemijske degradacije	78
6.2.8.3.2	Metoda završavanja lanaca DNK didezoksinukleotidima	82
6.2.8.4	Analiza RNK; zaštita od RNaze	85
6.2.9	Prijenos kloniranih gena u T stanice	86
6.2.10	Testiranje citotoksične aktivnosti limfocita T	89
7.	REZULTATI	90
7.1	Izolacija alela α i β lanaca	90
7.2	Identifikacija funkcionalnih alela	93
7.3	Izolacija preuređenih γ gena	97
7.4	Transfekcija funkcionalnih alela	98
7.5	Klon BD7-S17 prepisuje prenešene gene	100
7.6	Specifičnost BD7-S17 transfektanta	103
8.	DISKUSIJA	109
8.1	Specifičnost α/β heterodimera	109
8.2	Pokušaji korelacije strukturalnih dijelova receptora limfocita T s prepoznavanjem antigena i MHC	112
8.3	Buduća istraživanja	114
9.	ZAKLJUČAK	115
10.	LITERATURA	116

5. UVOD

5.1 Imunološko prepoznavanje

Imunološki sustav ima važnu ulogu u obrani i očuvanju integriteta organizma svakog kralježnjaka. Sustav je spreman reagirati specifično, što znači da zaštita od jednog mikroorganizma ne zaštićuje od drugog. B i T limfociti su nosioci specifičnosti i u njoj, s evolucijskog stanovišta, imunološki odziv doseže svoj vrhunac. Dok B limfociti reagiraju na antigen uljeza stvaranjem stanica koje izlučuju protutijela što vodi ka suzbijanju infekcije, T limfociti bilo reguliraju aktivnost drugih limfocita ili ubijaju stanice koje su, na primjer, zaražene virusom. Dakle, B i T limfociti su različiti po funkciji, ali mogu biti jednaki po specifičnosti. Podloga specifičnosti leži u prirodi imunološkog prepoznavanja. Razvitak znanstvenih tehnika kultiviranja klonova limfocita, pronalazak dobivanja monoklonskih antitijela te razvoj molekularne genetike i DNK tehnologije omogućio je bolji uvid u tajne celularnog i molekularnog zbivanja pri prepoznavanju. B i T limfociti nose molekule receptora na staničnim površinama kojima prepoznaju druge molekule. To što B i T stanice mogu reagirati specifično prema istom uzročniku infekcije ne mora značiti da imaju i iste receptore.

Prepoznavanje se temelji na međusobnom spajanju dijelova receptora i njegovog vezitelja koji se strukturalno slažu poput ključa i ključaonice. Budući da su sva živa bića građena od sličnih molekula, može nam se učiniti da imunološki sustav

"ne zna" razlučiti što je vlastito, a što strano te nastojeći odstraniti uzročnika istovremeno može naškoditi vlastitom organizmu. Međutim, postoji mehanizam razlikovanja stranog od vlastitog što se vidi, na primjer, u odbacivanju presađenih organa drugih osoba i u zadržavanju (toleranciji) autolognog kožnog transplantata.

Prepoznavanje antigena kod B limfocita ide preko receptora koji ga veže, a to vodi ka dijeljenju i diferencijaciji B stanica u klon plazma stanica. One izlučuju protutijela koja imaju istu osobinu vezivanja antigena kao prvotni receptor. Protutijelo i receptor pripadaju klasi imunoglobulina, a razlikuju se u tome što protutijelo ne posjeduje dio molekule koji drži receptor za staničnu membranu. Protutijela se vežu za antigen i time ga uz pomoć ostalih komponenata imunološkog sustava učine podložnim uništenju^{98, 102}.

Za razliku od B, T stanice ne mogu prepoznati antigen zasebno, već samo uz paralelno prepoznavanje određenih molekula na staničnoj membrani koje označavaju stanice kao vlastite i strane. Ti proteini su MHC molekule (od engl. major histocompatibility complex - glavni kompleks tkivne podudarnosti). Primjećeno je da pri prepoznavanju mora postojati identičnost MHC molekula T limfocita i ciljnih stanica. Može se reći da je prepoznavanje stranog ograničeno prepoznavanjem vlastitog (odatle i pojam MHC-restrikcija)¹²³.

MHC molekule se dijele u I i II razred na osnovi razlike u strukturi. Glavne značajke MHC-a su ogromni polimorfizam i poligenizam^{64, 76, 103}. Drugim riječima, svaka vrsta posjeduje velik broj različitih alela, a u svakoj jedinki ima više gena

koji kodiraju molekule I i II razreda. Zbog toga gotovo nema jedinke koja se ne razlikuje od ostalih po vlastitoj kombinaciji MHC alela. Takav polimorfizam je odličan sustav oznaka za populacijsku genetiku, ali isto tako i nepremostiva barijera u transplantacijskoj biologiji.

Postoje tri vrste T limfocita: citotoksični, pomoćnički i supresorski. O fiziološkoj ulozi posljednjih malo je poznato. Nasuprot tome, prve dvije skupine su proučene u velikoj mjeri. U većini slučajeva, citotoksični T limfocit prepoznaje strani antigen zajedno sa MHC molekulama I razreda, dok pomoćnička T stanica vidi antigen u kontekstu MHC molekule II razreda. Antigen se prezentira T stanici na membrani prezentirajućih stanica (makrofaga). Izgleda da antigen, nakon npr. što je fagocitiran, bude razgrađen, a neki razgradni dijelovi se nasade na staničnu membranu kao kompleks zajedno s MHC molekulama^{6,7,21,142}. Put prezentacije antigena s molekulama I razreda čini se različit od onog s molekulama II razreda^{39,139}.

Nakon vezivanja T staničnog receptora za kompleks antigena i MHC molekule, a uz pomoć solubilnih faktora (limfokina) izlučenih od prezentirajućih stanica, T stanica se aktivira i klonalno umnoži. Klon citotoksičnih limfocita će tada lizirati ciljne stanice ukoliko one ispunjavaju iste uvjete (nose iste MHC molekule i antigen) pod kojim je aktiviran njihov predak. MHC molekule I razreda su izražene na stanicama svih tkiva. Ako izostane njihova ekspresija (kao kod nekih tumora), imunološki sustav će biti "slijep" i neće moći odstraniti takve stanice ako su antigenski promijenjene. Nasuprot tome, ekspresija molekula II razreda ograničena je na samo neke vrste stanica (npr.

makrofagi i B limfociti u miša) što, teleološki gledano, ima više smisla nego da je posvuda. Bolje je da klon pomoćnika prenese specifični signal i izluči faktore rasta i diferencijacije B limfocitu nego mišićnoj ili masnoj stanici. B limfocit, dakle, treba 2 signala za aktivaciju. Prvi je antigen, kojeg veže imunoglobulinskim receptorom. Drugi signal je pomoć i istodobno kontrola stranog i vlastitog od pomoćničkog T limfocita koji se vezao preko T staničnog receptora na kompleks MHC molekule II razreda i antigena. Premda B limfociti s receptorom za vlastite antigene mogu postojati, oni ne mogu diferencirati u normalnim uvjetima, jer ne dobivaju drugi signal od T stanice. Smatra se da su tijekom razvitka T limfocita bilo odstranjeni ili suprimirani oni klonovi koji bi mogli reagirati prema vlastitim antigenima^{17, 41}.

Prema tome, centralnu ulogu i regulaciji imunološkog odziva i razlikovanja stranog i vlastitog ima molekularni "trijumvirat" antigena, MHC i T staničnog receptora. Uspješna interakcija između svih triju čimbenika, čini se, osnovni je preduvjet svake imunološke reakcije. Prema toj pretpostavci, ukoliko neka MHC molekula ne može vezati određeni antigen, izostati će reakcija T limfocita kao i kad nedostaje klon stanica s T staničnim receptorom koji bi mogao prepoznati određeni kompleks antigena i MHC molekule. Mogli bi reći da su geni MHC molekula i T staničnog receptora - geni koji vode i usmjeruju imunološki odziv.

Međutim, u ovakvoj slici imunološkog prepoznavanja ostaju neka važna pitanja nerazjašnjena. Zašto T limfociti prepoznaju antigene samo u kontekstu MHC molekula i koji je mehanizam MHC

restrikcije? Objašnjenje prvog pitanja može biti u tome što je to jedini način razlikovanja stranog i vlastitog. Možda organizam ne može prepoznati strano zasebno izvan konteksta vlastitog. Vjerojatno se odgovor na prvo pitanje krije u objašnjenju drugog. Za MHC restrikciju važno je znati da li je moguće da jedna MHC molekula bude receptor ogromnom broju antigena i da li toj vezi doprinosi T stanični receptor? Drugo, neophodno je spoznati na koji način T stanični receptor "vidi" MHC molekulu i antigen? Postoji mnogo hipoteza koje se, uglavnom, mogu svesti na 2 modela. U modelu "dvostrukog prepoznavanja" (od engl. dual-recognition) receptor ima dva vezna mjesta, jedno za antigen, a drugo za MHC molekulu^{14, 18, 28, 34, 70, 81, 125, 144, 150}. Model "promijenjenog vlastitog" (od engl. altered-self) pretpostavlja da jedan receptor prepoznaje dio MHC molekule koja je promijenila konfiguraciju jer se antigen vezao za nju^{31, 94, 95, 122}. Ne postoje definitivni pokazatelji da bi se moglo odbaciti bilo jedan ili drugi model.

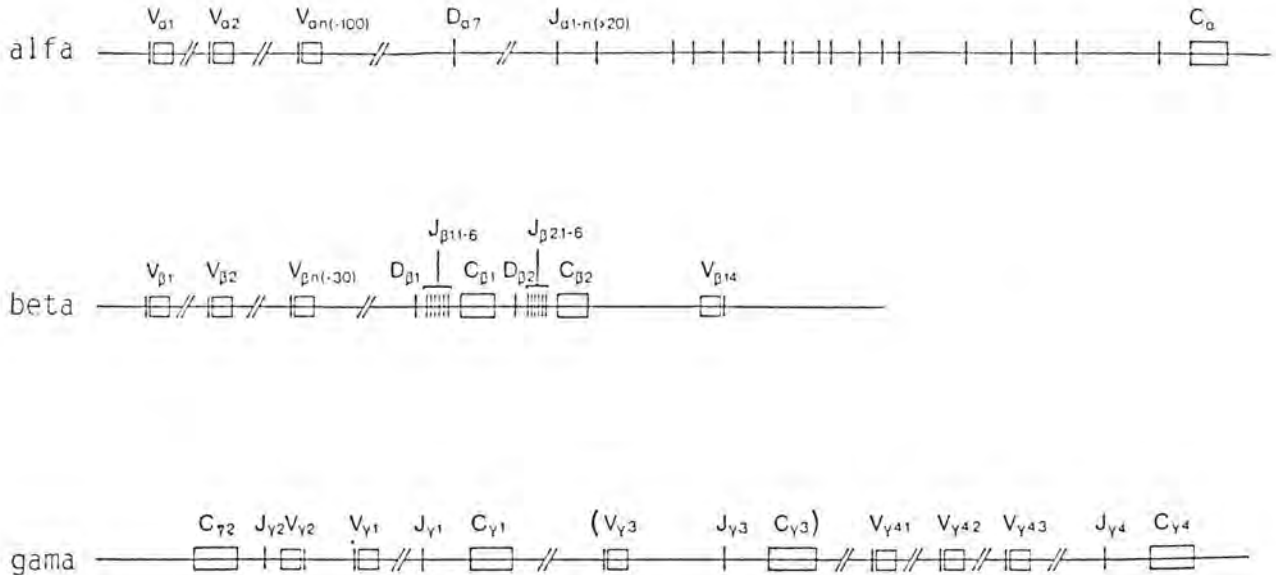
5.2 Geni receptora limfocita T

Receptor za antigen i MHC molekule limfocita T je glukoproteinski heterodimer, čije podjedinice (nazvane α i β lanci) su povezane disulfidnim vezama. α i β lanci imaju mol. tež. od 42-44 kD u miša i 50-40 kD u čovjeka^{57, 101}. Karakterizacija gena receptora limfocita T putem kloniranja i sekvenciranja (vidi revijalni članak 28.) je pokazala da oni pripadaju skupini imunoglobulinske "supergenske obitelji" koju čine evolucijski srodni geni imunoglobulina, I i II razreda

glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC), $\beta 2$ -mikroglobulina, CD8 (Ly2,3), CD4 (L3T4), Thy 1 i gen polimunoglobulinskog receptora. Geni receptora za antigen i MHC limfocita T se sastoje, slično imunoglobulinskim, od manjih genetskih segmenata. Ti dijelovi se preuređuju tijekom ontogeneze i generiraju molekule receptora koje su klonalno raspoređene. Tri različite, ali homologne, obitelji gena u T stanicama ljudi i miševa mogu preuređivati svoje dijelove i prepisati (transkribirati) ih potom u mRNK (od engl. messenger RNA): α , β i γ . Njihova organizacija u miša prikazana je na slici 1.

Prema dosadašnjem znanju, obitelj gena za α lanac se sastoji otprilike od 50-100 varijabilnih (V) genetskih segmenata odvojenih nepoznatom udaljenošću od najmanje 20 veznih (J, od engl. joining) genetskih segmenata, koji su razbacani na više od 60 kb (kilobaza) DNK uzvodno od jednog genetskog dijela koji kodira konstantnu regiju (C, od engl. constant)^{5, 11, 59, 146}. Zasad se ne zna da li postoje genski segmenti koji kodiraju regiju tzv. "različitosti" (D, od engl. diversity). Obitelj gena α lanaca se nalazi u čovjeka i miša na 14. kromosomu u blizini gena koji kodira enzim nukleozidnu fosforilazu 2 (Np-2)^{30, 33, 77}. U obitelji β lanca postoji oko 20-30 V genetskih segmenata smještenih vjerojatno uzvodno od 2 skupine genetskih elemenata u kojima se nalaze po 1 D, 7 J (6 funkcionalnih) i jedan konstantni genetski element^{9, 12, 25, 32, 74, 86, 118}. Interesantno je da se jedan varijabilni genetski segment nalazi na 10 kb nizvodno od drugog $C\beta$ genskog dijela. Taj $V\beta$ genetski segment može, premda u rijetkim slučajevima, učiniti funkcionalni β lanac preuređivanjem koje uključuje

inverziju kromosoma⁸⁰. Obitelj gena β lanca nalazi se blizu imunoglobulinskih gena κ lanaca na 6. kromosomu u miša²². Kod čovjeka, geni se nalaze na 7. kromosomu (Ref. 22) i odvojeni su od gena κ lanaca koji se nalaze na 2. kromosomu.



Slika 1

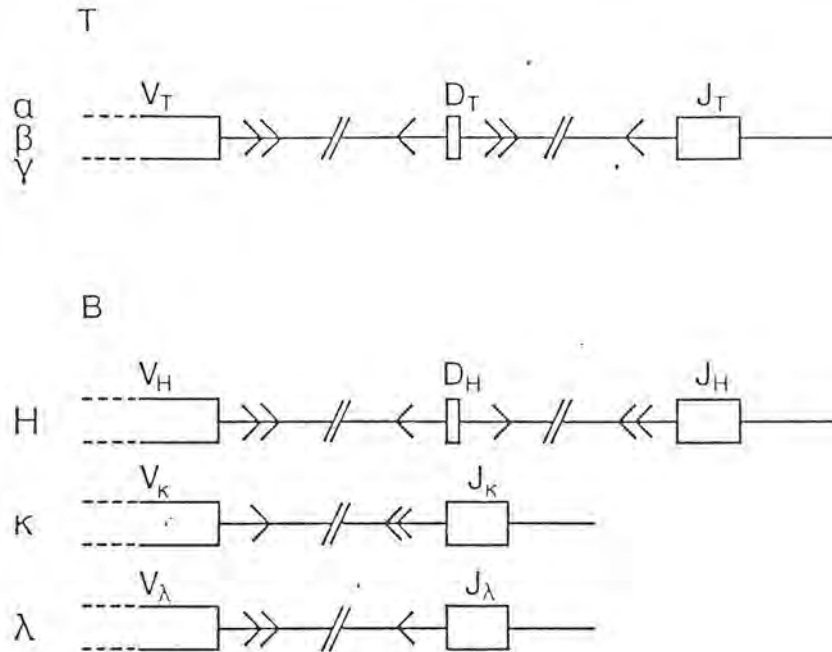
Organizacija gena receptora T stanica u miša. Pravokutnici i vertikalne crte označavaju V, D, J i C genetske segmente, osim crta ispred svakog V genetskog segmenta koje označavaju sekvencu vodiča (L, od engl. leader). Gama-3 podobitelj je prisutna u miševa soja BALB/c, C57BL/6 i AKR, ali je odsutna u sojevima C57BL/10, DBA/2, CBA i C58¹⁴⁰.

Obitelj γ gena se sastoji od 3 do 4 podobitelji, a svaka ima svoje V, J i C genetske segmente. S izuzetkom γ -4 podobitelji, svaka ima samo po jedan V, J, i C element^{60, 66, 140}. Nije poznato da li postoje i D γ genetski segmenti. γ geni su smješteni na 13. kromosomu u miša i 7.

kromosomu u čovjeka^{77, 115}.

U svim obiteljima svaki V segment se može preurediti do svakog J segmenta. Geni β lanca pri tome većinom uključuju i D segment. Činjenica da se za formiranje β lanca V genetski segment može direktno vezati za svaki J segment (V-J) bez upotrebe D segmenta (što nije moguće prilikom preuređivanja imunoglobulinskih gena za teške lance) leži u specifičnosti mehanizma preuređivanja kod gena receptora za antigen limfocita T. Nizvodno od V_T segmenta svih triju obitelji i D_β segmenta postoje dva kratka dijela DNA s gotovo identičnom sekvencom za koje se smatra da su signalni elementi za preuređivanje /tzv. "heptamer" i "nonamer" sekvence, slika 2). Heptamer i nonamer su međusobno odvojeni s 20-24 bp što odgovara dvostrukom zavoju DNK. Sekvenca je karakteristična samo za limfocite T. Geni imunoglobulina u B stanicama imaju iste elemente, ali različitu konsenzus sekvencu^{25, 74, 138}. Ispred svakog D_β i J_T segmenta T-staničnog receptora postoji obrnuti poredak i obrnuta sekvenca signalnih elemenata; prvo nonamer koji je odvojen sa 10-14 parova baza od heptamera. Udaljenost od oko 12 bp odgovara jednostrukom zavoju DNK uzvojnice. Smatra se da specifični enzim (zasada još hipotetski) prepoznaje signalne sekvence i spaja genetske dijelove pri preuređivanju gena. Pri tome bi se uvijek spojio dio čiji heptamer i nonamer su odvojeni dvostrukim zavojem DNK s genetskim segmentom ispred kojeg su nonamer i heptamer odvojeni jednostrukim zavojem. Tako bi se npr. kod β lanaca svaki V segment mogao vezati za svaki D ili J segment, jer ispred njih stoje nonamer i heptamer odvojeni jednostrukim zavojem DNK. To nije moguće kod

imunoglobulinskih gena za teške lance (H, engl. heavy) zato što ispred svakog segmenta J_H postoji dvostruki zavoј razmaka (slika 2). Budući da D_H segment ima jednostruki razmak i



Slika 2

Međusobna udaljenost signalnih sekvenci za preuređenje DNK. > označava jednostruki zavoј, a >> označava dvostruki zavoј DNK uzvoјnice između signalnih sekvenci.

uzvodno i nizvodno, onda slijedi da je jedino moguće preuređenje između D_H i J_H ; V_H i D - J_H , ali ne između V_H - J_H bez upotrebe D_H segmenta¹³⁸. Značenje te razlike je u tome što se kod T-staničnog receptora povećava mogućnost stvaranja različitih β lanaca opcionalnom upotrebom D regija. Kako β lanci imaju relativno mali broj V regija, to je značajni doprinos. Isto tako, J_β regije se mogu upotrijebiti u sva tri kodirajuća okvira. Drugim riječima, jedan J_β segment može dati tri različita proteina, naravno, ovisno o preuređenju.

Prema tome, tri obitelji gena receptora limfocita T, α , β i γ su organizirane kao geni imunoglobulina za teški i laki lanac - s razlikama u broju V i J genetskih segmenata. Receptor stanica T ima manji broj V regija (oko 100 V_α i oko 30 V_β za razliku od preko 500 V_H , 200 V_K i 2 V_λ) i veći broj J regija (12 J_β i $> 20 J_\alpha$ za razliku od 2 J_λ , 4 J_K i 4 J_H) u miša¹³⁸. Ta razlika naglašava važnost različitih 3' krajeva V regija receptora pri izgradnji repertoara.

Mehanizmi za stvaranje različitih molekula su slični između receptora stanica T i imunoglobulina: višestrukost genetskih segmenata zametne loze, različito povezivanje genetskih segmenata, varijabilnost mjesta povezivanja, nasumce dodani nukleotidi na mjestu povezivanja i, konačno, različito povezivanje lanaca^{38,65,78,133}. Somatska hipermutacija nije otkrivena kod receptora stanica T za antigen i MHC^{38,66}. Ukoliko bi somatska hipermutacija mijenjala specifičnost limfocita T u periferiji, mogli bi se generirati autoreaktivni limfociti T što bi bilo pogubno za organizam.

Dakle, bez obzira na sve spomenute razlike između organizacije gena receptora za antigen i MHC T stanica, i imunoglobulinskih, smatra se da je potencijal za generaciju različitih molekula (repertoara), otprilike isti u limfocita T i B.

Za α i β gene je pokazano sa kodiraju serološki definirane polipeptidne lance receptora za antigen i MHC T stanica uspoređujući sekvence aminokiselina i nukleotida^{4,127}. Produkt γ gena je identificiran iz klonova humanih stanica pomoću specifičnih monoklonalnih antitijela^{8,19}. Pokazano je, da se

on nalazi na staničnoj membrani 3-8% perifernih limfocita T¹⁹. Međutim, postoje funkcionalne citotoksične i pomoćničke T stanice koje nemaju funkcionalno preuređene γ gene¹⁴⁰. Isto tako ne postoji striktna korelacija između funkcionalnog preuređenja pojedinih γ podobitelji i citotoksičnih ili pomoćničkih T stanica^{62, 69, 140}. Prema tome, funkcija γ gena ostaje nepoznanicom, premda se pretpostavlja da oni imaju ulogu u ranom stadiju ontogeneze limfocita T^{116, 128} ili možda u nekoj podvrsti limfocita T koja još nije identificirana¹⁴⁰ (vidi poglavlje 5.5).

5.3 Dodatne molekule potrebne pri prepoznavanju limfocitima T

Na površini stanične membrane limfocita T α i β heterodimer je nekovalentno povezan s monomorfim podjedinicama T3 molekule koje variraju u molekularnoj težini od 20.000 do 30.000 Daltona. U čovjeka postoje tri polipeptidna lanca (γ , δ i ϵ)⁴⁶, dok u miša ih ima četiri (četvrti je nazvan ζ)¹¹⁹, ili možda i više¹⁰⁹. T3 molekula ima, možda, funkciju efektorne jedinice koja sprovodi signal u unutrašnjost stanice nakon toga što se receptor T stanica vezao za svoga vezitelja. Pokazano je, da anti-T3 monoklonalna antitijela, kao antitijela upravljena protiv α/β heterodimera, stimuliraju oslobađanje inozitol trifosfata u T stanicama što naknadno povećava koncentraciju slobodnog kalcija u citoplazmi i čini da stanica luči IL-2 i izrazi receptor za IL-2 (vidi revijalni članak 67).

Nadalje, molekule CD4 i CD8 (L3T4 i Ly2,3 u miša, odnosno, T4/T8 u čovjeka), nalaze se na površini staničnih

membrana limfocita T. CD4 molekule se obično nalaze na pomoćničkim stanicama koje prepoznaju strani antigen i antigen II razreda gena tkivne podudarnosti, dok CD8 obično nose citotoksične stanice koje prepoznaju određene antigene u kontekstu molekula I razreda MHC. Antitijela upravljena protiv CD4 i CD8 molekula inhibiraju funkciju dotičnih stanica. Pokazano je, da se inhibicija s anti-CD4 antitijelima može spriječiti ukoliko se poveća koncentracija bilo stranog antigena, bilo molekula tkivne podudarnosti na površini ciljnih stanica^{50,93}. Prema tome, smatra se da su te dodatne molekule potrebne radi povećanja cjelokupne avidnosti interakcije limfocita T i ciljnih stanica. Dakle, receptori T stanica s jakim afinitetom za antigen i MHC ne trebaju pri prepoznavanju dodatne molekule, odnosno, oni receptori sa slabim afinitetom trebaju. K tome treba dodati i opažanje da specifičnoj interakciji citotoksičnih T limfocita i ciljnih stanica prethodi faza nespecifične veze (konjugata), za čije formiranje su potrebne CD8 i LFA-1 molekule¹³².

5.4 Razvitak limfocita T

Mišji timus naseljavaju prekusorske stanice krvnog podrijetla tijekom 11. i 12. dana trudnoće¹⁰⁴. Te stanice još nemaju izražene tipične markere (označitelje) zrelih limfocita T. Za vrijeme diferencijacije u timusu T stanice postaju tolerantne na vlastite antigene, naročito na vlastite antigene tkivne podudarnosti i "uče" kako da prepoznaju strane antigene u kontekstu vlastitih molekula tkivne podudarnosti. Izgleda da

je to proces u kojem se mora izvršiti selekcija iz repertoara stanica koje nose na sebi α i β (možda γ i neke druge) lance receptora T stanica s različitim kombinacijama varijabilnih regija. Zasada je nepoznato na koji način se vrši selekcija, čak što više, niti kao se ostvaruje tolerancija i uopće, zašto postoji preferencija limfocita T za prepoznavanje vlastitih antigena tkivne podudarnosti (MHC).

Postoji nekoliko hipoteza za objašnjenje navedenih pitanja koje se u osnovi mogu podijeliti na dvije grupe. Prvu grupu čine hipoteze u kojima se pretpostavlja da tijekom razvitka najprije postoji pozitivni probir limfocita T na temelju specifičnosti za vlastito (objašnjenje za preferenciju prepoznavanja vlastite MHC molekule), a zatim, nastupa negativni probir koji "očisti" repertoar specifičnosti od autoreaktivnih klonova s jakim afinitetom (tolerancija)^{14,17,34,70,71}. U drugu grupu spada pretpostavka da repertoar zrelih limfocita T jest posljedica prvo negativnog probira u timusu (tolerancija) i zatim pozitivnog probira stranim antigenima na periferiji imunološkog sustava^{48,94}. Većina znanstvenika pridaje prvoj grupi hipoteza veću pažnju. Ako se pretpostavi, da je početni repertoar specifičnosti nasumce odabran (može prepoznati cijeli univerzum stranih i vlastitih antigena), onda bi se pozitivnim probirom izabrao samo dio s afinitetom za vlastite MHC antigene. Od tog dijela bi se naknadno, negativnom selekcijom, "propustili" u periferiju samo oni klonovi koji imaju slabiji afinitet za vlastito, jer bi ostatak bio podvrgnut mehanizmu tolerancije. Glavni prigovor prvoj grupi hipoteza jeste, da rezultirajuća

populacija zrelih limfocita T ima previše "okljaštren" repertoar koji ne bi bio dovoljan za vršenje funkcije koju vidimo normalno. S druge strane glavni prigovor hipotezi o samo negativnom probiru u timusu jeste, da ona ne može objasniti preferenciju T stanica pri prepoznavanju antigena u kontekstu vlastitih antigena tkivne podudarnosti.

5.5 Ontogeneza receptora za antigen i MHC limfocita T

T limfociti počinju funkcionirati u timusu, gdje ujedno i dobiju svoje označitelje (Thy 1, CD4, CD8, T11 i dr). Za vrijeme razvitka, mnogi timociti nose dva markera za diferencijaciju, CD4 i CD8 koji nisu zajedno izraženi u zreloj populaciji perifernih T stanica. Zreli T pomoćnici većinom imaju CD4 molekulu, dok citotoksične stanice većinom imaju CD8. Prema tome, CD8⁺, CD4⁺ T stanice, tzv. dvostruko pozitivne, ne napuštaju timus i kratkog su vijeka, npr. ili umiru ili postanu pozitivne za samo jedan od navedenih markera^{116, 80, 124}. Stanice sa izraženim receptorom za antigen/MHC ne pojavljuju se prije 17. dana trudnoće u miša¹²⁹. Funkcionalne stanice sa zrelim fenotipom ne pojavljuju se u značajnom broju prije 19. dana^{24, 143}.

Geni β lanca se počinju preuređivati i prepisivati u mRNK oko 14-15 dana gestacije, što koincidira s ekspresijom γ gena^{116, 128}. α lanci, nasuprot, postaju transkripcionalno aktivni tek 2-3 dana kasnije i dostižu "steady-state" razinu 19 dana. Zanimljivo je, da postoji obrnuta korelacija između ekspresije γ i α gena. Dok se transkripcija γ gena smanjuje i

dosiže skoro beznačajnu razinu u timusu (i periferiji) odrasle jedinke, istovremeno se transkripcija α gena povećava^{116, 128}. Taj rezultat je doveo do hipoteze da γ i β lanci formiraju primordijalni receptor koji bi bio specifičan za vlastite antigene tkivne podudarnosti i koji bi inducirao proliferaciju stanica. Selektionirani timociti reaktivni prema vlastitom bi u slijedećoj fazi zamijenili γ za α lanac, a to bi smanjilo afinitet receptora za vlastito. Tada bi efektivno vezanje moglo uslijediti samo onda kada bi se određeni antigen (ili njegov dio) vezao u kompleks s vlastitim MHC molekulama^{116, 128}. Ova pretpostavka je suočena s nekoliko poteškoća. Većina T pomoćnika nema izražene γ gene. Isto tako, neki funkcionalni pomoćnički i citotoksični limfociti T nemaju funkcionalnu γ mRNK¹⁴⁰, poglavlje 7.3. Prema tome, ukoliko γ geni imaju uopće neku funkciju u ranom razvitku limfocita T, onda se mora dodati pretpostavka da postoji neki nepoznati mehanizam koji isključuje γ gene iz funkcije prije nego što limfociti T sazriju.

5.6 Koliko gena kodira specifičnost limfocita T?

Pokazano je da su potrebna najmanje dva gena za ekspresiju serološki i celularno definiranog receptora za antigen/MHC limfocita T: geni α i β lanaca¹⁴⁸. Specifičnost receptora je dualna, tj. T stanica za svoje aktiviranje mora prepoznati kombinaciju stranog antigena u kontekstu vlastitog (vidi poglavlje 5.1). U ovom radu htjelo se vidjeti, da li su geni α i β lanaca dovoljni za dvostruko prepoznavanje limfocitima T. U

tu svrhu su izolirani funkcionalni geni α i β lanaca jednog klona citotoksičnih limfocita T i zatim prebačeni u drugi klon citotoksičnih T stanica čija je specifičnost prepoznavanja različita. Transfektirane stanice su analizirane molekularnim i funkcionalnim testovima.

5.7 Rekombinantna DNK tehnologija

Gledajući pojednostavljeno, rekombinantne DNK metode sastoje se od presijecanja i spajanja DNK molekula i ubacivanja u žive stanice gdje se mogu replicirati i funkcionirati. Tehnike molekularnog kloniranja ili često nazvane i metode kloniranja gena u bakterijskoj stanici omogućile su umnožavanje određenog genetskog segmenta do miligramskih količina i time znatno olakšale analizu pohranjene genetske informacije. Nadalje, ubacivanje kloniranih gena u prokariotske i eukariotske stanice omogućuje analizu funkcije i regulacije ekspresije pojedinih gena. U mnogim zapadnim zemljama "genetska manipulacija" je definirana kao "stvaranje nove kombinacije materijala koji nosi nasljedne osobine ubacivanjem molekula nukleinskih kiselina, proizvedenih na bilo koji način izvan stanice, u virus, bakterijski plazmid ili drugi vektorski sustav tako da omogući njihovu inkorporaciju u organizam domaćina u kojem se normalno ne pojavljuju ali u kojem imaju sposobnost razmnožavanja".

5.7.1 Transformacija

Tijekom šestdesetih godina primjećeno je da neke bakterije, a

kasnije i biljne i životinjske stanice (premda daleko teže) mogu primiti egzogenu DNK procesom koji je nazvan transformacija^{2, 3, 4}. Ova bakterijska transformacija uvjetovana s DNK se ne smije zamijeniti sa staničnom transformacijom kod raka. Da bi bakterije bile transformirane, moraju biti dovedene u tzv. kompetentno stanje za primanje DNK^{27, 30}. U transformiranoj bakteriji, DNK može biti integrirana u genom domaćina ili pak zadržana ekstrakromosomalno u cirkularnoj formi. Međutim, pri dijeljenju bakterija, ekstrakromosomalna DNK će se prorijediti ako se ne replicira. Genetski dio koji kontrolira umnažanje zove se izvor replikacije (ori, od engl. origin), i sastavni je dio svih klonirajućih vektora.

5.7.2 Prekidanje i povezivanje DNK

Današnja DNK tehnologija ovisna je o tzv. restrikcijskim enzimima koji sijeku DNK na specifičnim mjestima određenim sekvencom DNK³⁷. Restrikcijske endonukleaze su bakterijski enzimi koji prekidanjem DNK brane i zaštićuju domaćina od stranih DNK molekula. U bakteriji, presječena DNK molekula bude uništena od drugih enzima^{35, 32}, dok vlastita DNK nije podložna razgradnji jer je modificirana. Naime, mjesta presijecanja restrikcijskim enzimima su "maskirana" metiliranjem nekog nukleotida i zbog toga enzim ne prepoznaje takvo specifično mjesto prekidanja³¹. Do danas je otkriveno preko 500 različitih restrikcijskih endonukleaza od čega preko 200 s različitim specifičnostima. Različite vrste bakterija posjeduju različite enzime za razgradnju DNK. Na primjer, *Escherichia Coli* posjeduje, između

ostalnih, enzim EcoRI koji cijepa DNK uzvojnici uvijek kad u slijedu od 5' prema 3' (5 i 3 su položaji atoma ugljika u prstenu dezoksiriboze, gdje postoji fosfodieterska veza sa susjednim nukleotidima) se nađe 6 parova baza (bp) dug palindrom GAATTC. Statistički gledano, ova sekvenca se može ponoviti svakih nekoliko tisuća bp (kb), međutim, normalno su takva mjesta negdje rjeđa, a drugdje gušća. Svaki dio genoma ima svoj karakteristični "profil" s obzirom na mjesta razgradnje restriksijskim enzimima.

Osim restriksijskih, u stanicama postoje i modificirajući enzimi koji, na primjer, metiliraju mjesta prekidanja restriksionim enzimima, spajaju prekinute DNK fragmente (ligaze), dodaju slobodne nukleotide ili fosforiliraju krajeve presječenih DNK molekula, ili pak prepisuju DNK u DNK ili u RNK. Neki RNK virusi (retrovirusi) imaju reverznu transkriptazu ili RNK ovisnu DNK polimerazu kojom na kalupu RNK stvaraju DNK. Izolacija i karakterizacija modificirajućih enzima omogućila je, zajedno s otkrićem restriksijskih, "in vitro" manipulaciju DNK i RNK molekula. Isto tako važnu ulogu imao je i razvitak metoda za kontrolu i praćenje enzimatskih procesa, kao što su agarozna i poliakrilamidna gel elektroforeza^{1, 51, 72, 92, 96, 130, 131, 136}. Skup navedenih metoda danas se popularno naziva genetskim inženjerstvom.

5.7.3 Vektori za kloniranje DNK

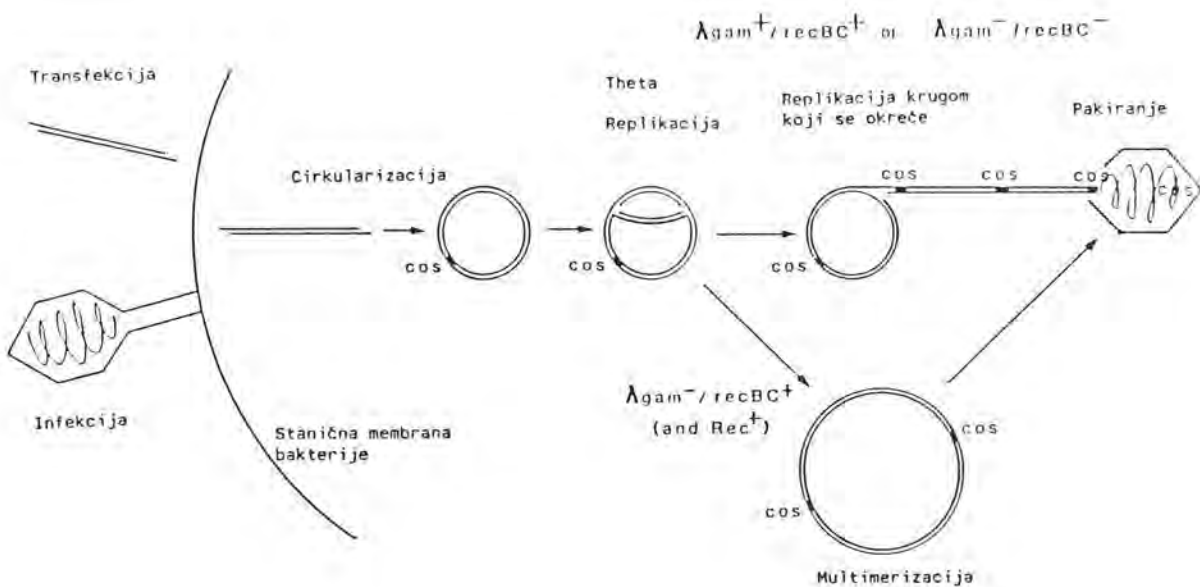
Ako se fragmenti DNK ne mogu replicirati sami od sebe, tada je očigledno rješenje da se povežu s dijelovima DNK koji to mogu. Takvi dijelovi DNK zovu se vektori⁴⁵. Najpodobniji za kloniranje

su mali plazmidi, bakteriofazi i njihovi derivati-kozmidu. Oni se ne integriraju u genom domaćina i mogu se lako izolirati u većim količinama.

Plazmidi su cirkularne molekule DNK od nekoliko kb i raširene su u svim prokariotskim vrstama. U većini slučajeva njihova prisutnost u bakteriji nije neophodna. Oni sadrže gene koji kodiraju fenotipske osobine kao što su rezistencija prema antibioticima, proizvodnja antibiotika, degradacija aromatskih spojeva, proizvodnja toksina, restrikcijskih enzima i slično. Plazmidi mogu biti prisutni u vrlo velikom ili malom broju kopija u stanici. Međutim, dva različita plazmida, u većini slučajeva, ne mogu koegzistirati u jednoj stanici bez selekcijskog tlaka^{20, 36}.

Bakteriofazi su bakterijski virusi od kojih je kao klonirajući vektor najpogodniji λ (lambda)⁶³. Genom mu je 49 kb dugačka linearna DNK. Krajevi DNK posjeduju komplementarne sekvence koje omogućuju poprimanje cirkularnog oblika nakon injiciranja u bakteriju (infekcija). Taj dio DNK naziva se kohezivno mjesto (cos)¹⁴⁷. Osim DNK, virus se sastoji od kapsidnih proteina glave i repa koji su kodirani u genomu faga. Divlji soj posjeduje oko 50 gena od kojih je pola nepotrebno za vektorske sojeve. Među nepotrebim su, na primjer geni odgovorni za rekombinaciju i proces lizogenizacije kojim se DNK faga umetne u kromosomalnu DNK domaćina. Osim navedenih, vektorskim sojevima su potrebni geni za sintezu DNK i lizu stanice domaćina. Put replikacije i propagacije bakteriofaga se sastoji od adsorpcije čestice za bakterijsku stanicu, injiciranja DNK kroz poru na staničnom zidu i cirkularizacije DNK (slika 3). Tada, kod

divljev soja postoje dvije mogućnosti opstanka: stabilna integracija u genom domaćina uz pritajenje vlastitih funkcija ili aktivno umnažanje koje rezultira lizom stanice i oslobađanjem stotina novih infekcioznih virusa⁶³. Stvaranje novih čestica



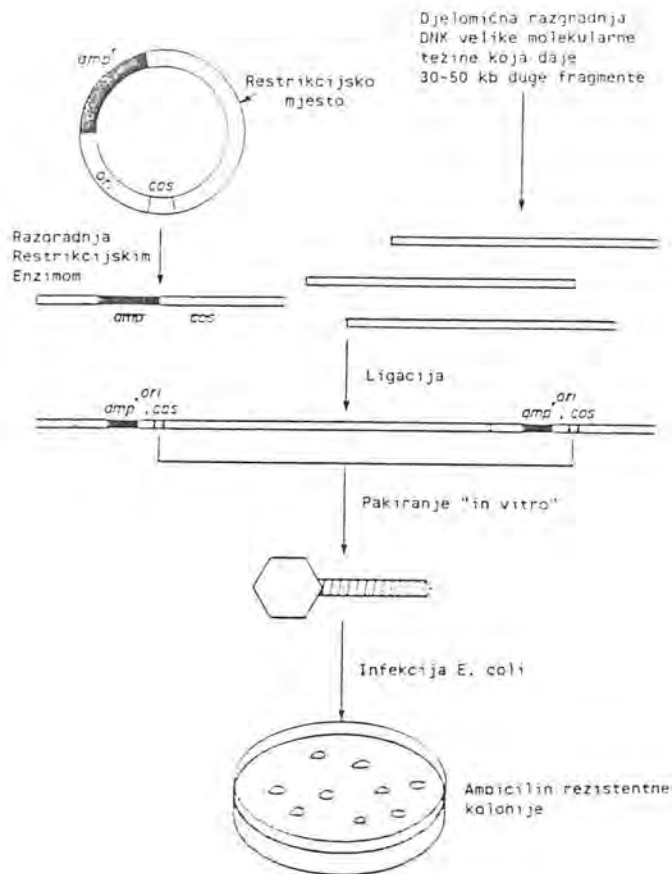
Slika 3

Litički ciklus bakteriofaga lambda. λ može ući u stanicu bilo kao DNK (transfekcija) ili putem infekcije (injiciranja DNK). DNK se cirkularizira na *cos* mjestima i E. coli ligaza kovalentno zatvori krug DNK. Prvih 15 minuta po infekciji, λ se replicira u dva smjera (tzv. theta-replikacija) i generira mnogo kopija λ . Prijelaz u replikaciju putem "kruga koji se okreće" je blokiran u *rec BC⁻* E. coli ukoliko fag ne producira funkcionalni *gam* gen. Potonji je nepotreban ako je rekombinacijski sustav E. coli (*rec BC*) defektan⁶³. Produkt kruga koji se okreće su konkatameri λ DNK koji se pakiraju u glave faga.

faga počinje sintezom DNK po principu tzv. "kruga koji se okreće"¹⁰. Naime, sinteza DNK ne završi, nakon što polimeraza obiđe cijeli krug od 49 kb, već se nastavlja do lize stanice. Time se sintetizira ogromna linearna DNK koja se sastoji od λ konkatamera. Svakih 49 kb se nalaze cos mjesta koja budu prepoznata od enzima za pakiranje DNK u glave faga. Pakira se po jedan λ genom u svaku glavu¹⁴ (slika 3).

Infekciозна čestica virusa ima još i rep koji služi kao "igla" pri injiciranju DNK u bakteriju. Kao klonirajući vektor upotrebljavaju se derivati divljeg soja λ faga koji nemaju gene za lizogeniju već samo za litički ciklus^{15, 105, 106, 137}. Umjesto gena koji nisu bitni za normalni litički proces, može se ubaciti strana DNK. Duljina ubačenih dijelova može biti od 1 kb do preko 20 kb, ovisno o tipu λ vektora. Bakteriofazi se mogu sklopiti "in vitro" upotrebljavajući genetski modificirane sojeve. Pri tome je primjećeno da pri pakiranju DNK razmak između 2 cos mjesta mora biti od 35 kb do 53 kb⁶³.

Zbog lakoće i velike efikasnosti kojom bakteriofazi transformiraju bakterije (infekcija) napravljen je hibrid između plazmida (čija prednost leži u lakšoj izolaciji DNK) i λ bakteriofaga. Plazmidi koji posjeduju kohezivne krajeve λ faga zovu se kozmidi^{27, 28}. Oni su maleni (5-8 kb najčešće) i mogu biti pakirani u glave faga ako nose dodatnih 30-40 kb DNK koju želimo klonirati (slika 4).



Slika 4

Kloniranje DNK u kozmidima.

Infekcija bakterija s rekombinantnim fazima ili kozmidima naziva se transdukcija.

Osim navedenih vektora, postoje cirkularni vektori s samo jednim lancem DNK, tzv. M13 bakteriofazi, koji se upotrebljavaju pri sekvenciranju DNK (vidi 5.7.7.2)^{59, 99, 100}.

5.7.4 Strategije kloniranja DNK

DNK fragmente koje želimo klonirati možemo stvoriti razgradnjom restrikcijskim enzimima, sintezom komplementarne DNK (cDNA) na kalupu glasničke RNK (mRNA; messenger RNA), direktnom kemijskom sintezom ili mehaničkom razgradnjom.

Postoji nekoliko mogućnosti za spajanje DNK molekula. Neki dio DNK se može lakše klonirati (što se mjeri brojem transformiranih kolonija bakterija po μg DNK), ako je efikasnost spajanja veća. Vezivanje DNK je najefikasnije kad su krajevi vektora i dijelova DNK komplementarni odnosno kohezivni. Oni se mogu stvoriti presjecanjem vektora i DNK koja nas zanima s istim restrikcijskim enzimom. Međutim, neki restrikcijski enzimi sijeku DNK ostavljajući tupe krajeve. Krajevi dijelova DNK dobivenih mehaničkom razgradnjom ili sintezom cDNK, u pravilu, nisu ni tupi niti kohezivni i njih je gotovo nemoguće spojiti. Pomoću DNK polimeraze I krajevi se mogu ispolirati tj. napraviti tupim. Direktnom kemijskom sintezom mogu se generirati oligonukleotidi s tupim ili kohezivnim krajevima. Kloniranje spajanjem tupih krajeva DNK se upotrebljava kad nema podobnih drugih restrikcijskih mjesta. Efikasnost spajanja tupih krajeva DNK može se povećati modifikacijom tj. spajanjem s povezivačima. To su, obično 8-12 bp dugi, oligonukleotidi s mjestom presjecanja restrikcijskog enzima koji ostavlja kohezivne krajeve. Teža mogućnost modifikacije tupih krajeva jest dodavanje homopolimernih repova dezoksinukleozida pomoću terminalne transferaze. Ako se doda C rep vektoru, a G rep dijelovima DNK, krajevi će se lakše spojiti zbog komplementarnosti repova.

Nakon što spojimo vektor s dijelom DNK koju želimo klonirati, dobivenu rekombinantnu molekulu treba prebaciti u bakteriju gdje se može replicirati. Prebacivanje u *E. Coli* se može ostvariti transformacijom ili transdukcijom nakon "in vitro" pakiranja rekombinantnih bakteriofaga λ ili kozmida. Vektor bi trebao nositi podoban marker za selekciju od netransformiranih bakterija. U tu svrhu se upotrebljavaju vektori koji posjeduju gen za rezistenciju prema nekom antibiotiku. Pri kloniranju s λ bakteriofagom to nije potrebno jer virus stvara plakove tj. kružna područja lize u konfluentnoj kulturi bakterija. Svaki plak, isto kao i svaka kolonija bakterija, sadrže samo jedan rekombinantni klon.

Kolonije i skupovi plakova se mogu pretražiti na različite načine u cilju pronalaženja rekombinantnih klonova od interesa (vidi pogl. 5.7.6).

5.7.5 Stvaranje genetskih knjižnica

Genetska knjižnica ili genetska banka je skup nasumce kloniranih dijelova DNK koji predstavlja cjelokupni genom nekog tkiva jedinke (genomska DNK knjižnica) ili pak cjelokupni potencijal za translaciju određenog tkiva (knjižnica cDNK).

Genomi nekih virusa su relativno mali (5-150 kb) u odnosu na genome sisavaca ($2-3 \times 10^9$ bp po haploidnom genomu), pa skoro cijeli genom može biti zastupljen u jednom ili nekolicini rekombinantnih DNK molekula. Genetske knjižnice velikih genoma, poput onih u sisavaca, trebale bi sadržavati više klonova koliko bi proračunom bilo dovoljno da pokriju duljinu cijelog haploidnog

genoma (uz pretpostavku da svaki klon nosi nepreklapajući susjedni segment DNK). Time je povećana šansa da dio genoma koji nas zanima bude barem jednom zastupljen u rekombinantnim klonovima. Ako pretpostavimo da su dijelovi klonirane DNK jednake veličine i da su sve sekvence jednako zastupljene i ukoliko je poznata veličina genoma može se izračunati veličina genetske knjižnice s obzirom na određenu vjerojatnost da će u njoj biti uključena neka sekvenca.

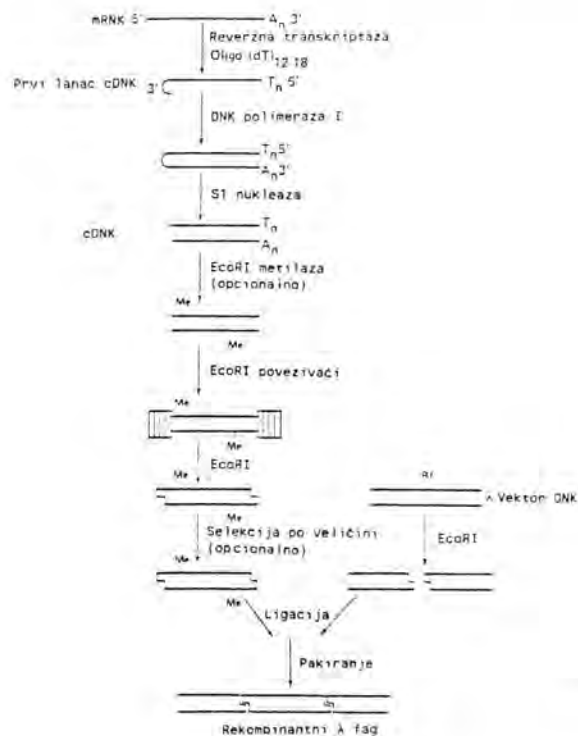
Ako je X duljina umetnutog dijela DNK, a y je veličina haploidnog genoma, tada će genetska knjižnica od N klonova imati vjerojatnost p da sadrži neku sekvencu³⁴.

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-x/y)}$$

Ako je $p = 0,99$, za genom sisavaca ($3,3 \times 10^9$ bp) trebati će $3,4 \times 10^5$ klonova dugačkih 45 kb. Za umetke od 20 kb potrebno je otprilike dvostruko više klonova da bi vjerojatnost kloniranja određene sekvence bila ista (99%). Budući da u praksi ne postoje prije pretpostavljeni uvjeti, vjerojatnost kloniranja određene sekvence je manja, ali još uvijek dovoljna u većini slučajeva. Jedna od poteškoća pri stvaranju genomskih knjižnica gena jest što pri razgradnji genomske DNK s restriksijskim enzimom se stvara cijeli niz fragmenata različite duljine. Ako kloniramo one od 30-40 kb, izostati će svi manji dijelovi i obrnuto. To se može izbjeći ako se DNK djelomično razgradi s enzimom koji sijeće DNK vrlo često (svakih nekoliko stotina bp). Nakon toga se na saharoznom gradijentu izolira frakcija željene duljine za kloniranje. Zbog toga će se pri kloniranju dijelova genomske DNK dobiti klonovi koji se preklapaju. Mapiranjem za

mjesta razgradnje s nekim restrikcijским enzimima, dobiti će se molekularna mapa kloniranog segmenta u kojoj se točno može odrediti položaj nekog gena^{45, 52, 91}. Time je otvoren put daljnjoj genskoj manipulaciji.

Smatra se da diferencirana stanica kralježnjaka ima otprilike 10-30 tisuća različitih proteina, te da njihov ukupni broj u cijelom organizmu vjerojatno ne prelazi 5×10^4 (izuzimajući protutijela i T stanične receptore). Informaciju o genima koji kodiraju te proteine možemo dobiti analizom njihove mRNK. Ukoliko na kalupu mRNK sintetiziramo cDNK i istu kloniramo, dobiti ćemo knjižnicu cDNK (slika 5). Sinteza prvog lanca cDNK može započeti



Slika 5

Shema sinteze cDNK u λgt11 vektoru³⁴.

samo uz prisustvo oligo-dT primera. Isti se veže za poli-A rep

mRNK. Nakon odvajanja hibrida mRNK i prvog lanca cDNK, treba se sintetizirati druga uzvojnica cDNK. To je moguće učiniti bez izvana dodanih primera, jer prvi lanac cDNK ima neobičnu osobinu da bude primer za sintezu drugog lanca.

Naime, 5' kraj prvog lanca cDNK učini tzv. S zavoje i veže se natrag na prvi lanac i time omogućuje polimerizaciju drugog lanca. Po završenoj sintezi, cDNK se razgradi s S1 nukleazom da bi se mogla spojiti s povezičima i tako, ili na drugi način, klonirati. Navedeni enzim otvara S zavoje izlažući time 5' kraj prvog i 3' kraj drugog lanca cDNK (slika 5). Kao vektori, najčešće se upotrebljavaju plazmidi ili bakteriofag λ (λ gt10, λ gt11)^{45, 149}. Postoje tzv. ekspresioni vektori koji prepisuju kloniranu cDNK omogućujući translaciju u protein. Mjesto kloniranja u ekspresionom vektoru nalazi se usred gena (obično β -galaktozidaze) koji je aktivan i sintetizira protein u bakterijskoj stanici. Ako je klonirani fragment cDNK umetnut tako da se kodirajući okvir poklapa s onim za β -galaktozidazu, bakterija će sintetizirati hibridni protein sastavljen od vektorskog i kloniranog proteina. Takav produkt može kasnije poslužiti za identifikaciju rekombinantnog klona npr. pomoću specifičnih protutijela (vidi 5.7.6)¹⁴⁹.

Izolacijom nekog klona iz knjižnice cDNK i njegovim sekvenciranjem može se dobiti informacija o primarnoj strukturi proteina kodiranog u dotičnom genu. Ovakav način dobivanja informacije o proteinima je lakši, brži i jeftiniji od onog koji se sastoji u direktnoj izolaciji, pročišćavanju i sekvenciranju samog proteina. Štoviše, moguće je klon DNK prebaciti u različite stanice "in vitro" ili "in vivo" (u oplođenu jajnu

stanicu) te proučavati regulaciju ekspresije gena i funkciju nekog proteina.

Osim u genomske i cDNK, genetske knjižnice možemo podijeliti s obzirom na upotrijebljene vektore ili namjenu. Uz plazmidske, bakteriofagne ili kozmidske, imamo tada i knjižnice gena obogaćene za sekvence specifične u određenim tkivima (tzv. subtraction libraries), za "kromosomalnu šetnju" i čak za "kromosomalno skakanje". O obogaćenim knjižnicama gena detaljnije će biti pisano u pogl. 5.7.6.2. Knjižnice za kromosomalnu šetnju su u pravilu kozmidske. Često se želi klonirati susjedne djelove genomske DNK jer su neki geni toliko veliki da ih je nemoguće obuhvatiti s jednim kozmidskim klonom. Strategija izolacije susjednih, preklapajućih DNK dijelova zove se kromosomalna šetnja. U principu, neki rekombinantni kozmidski klon se mapira (vidi 5.7.7.1) kako bi se s krajeva kloniranog fragmenta izolirale probe (vidi 5.7.6). S probom se pretraži genomska knjižnica i identificiraju klonovi čiji fragmenti se preklapaju i nadovezuju na prvobitan segment. Za kromosomalno skakanje potrebno je konstruirati specijalne knjižnice gena¹¹⁴. Restriksijskim enzimima koji sijeku vrlo rijetko u genomu sisavaca (NotI, Sall, BssHII i sl.) stvore se dugački (100–500 kb) DNK fragmenti s kohezivnim krajevima. U slijedećem koraku, oni se vežu za maleni vektor, presječen istim enzimom, nastojeći pri tome ostvariti što više kružnih molekula. Budući da se tako ogromna cirkularna DNK ne može klonirati, ona se mora ponovo razgraditi (ovaj puta s enzimom koji siječe češće u genomu i niti jednom u vektoru) da bi se opet spojila i zatim klonirala u bakteriji. Takvi rekombinantni klonovi imaju dva, relativno

kratka, DNK segmenta međusobno udaljena nekoliko stotina kb u genomu. To se može dokazati specijalnim metodama gel elektroforeze i hibridizacijskim tehnikama (vidi 5.7.7.1). Izolacija tako udaljenih segmenata istog kromosoma predstavlja "skok". Dobivena, udaljena sekvence može se nanovo upotrijebiti za kromosomalnu šetnju ili slijedeći skok.

5.7.6 Pretraživanje knjižnice gena

Selekcioniranje rekombinantnih klonova vrši se genetskim, imunokemijskim, hibridizacijskim i biokemijskim metodama⁹². Gotovo uvijek se vrši genetsko selekcioniranje za prisustvo vektora s genima koji daju rezistenciju prema različitim antibioticima ili proizvode neophodni nutritivni produkt. Ostale metode su specifične za traženje gena koji nas zanima.

5.7.6.1 Imunokemijska detekcija klonova

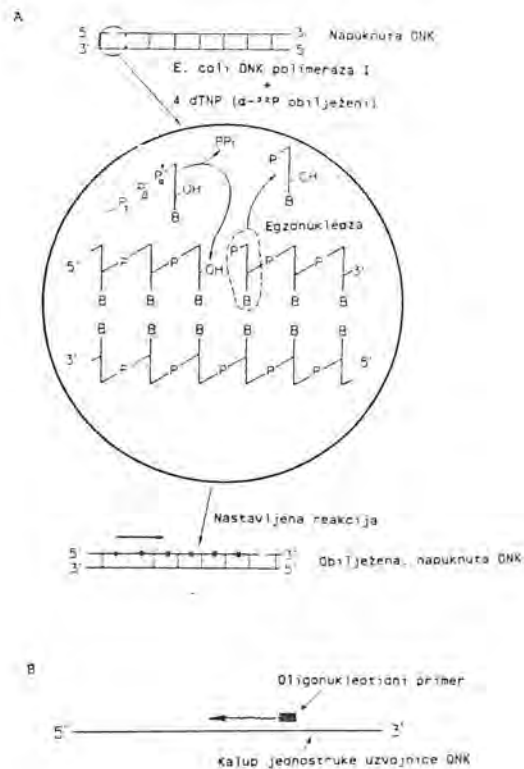
Imunokemijska detekcija klonova uspjeva većinom onda kad je klonirani gen izražen. Kolonije bakterija ili plakovi se prenesu (blotiraju) na nitrocelulozi filter, tako da proteini ostanu adsorbirani nakon lize stanica i zatim inkubiraju s antitijelima (obično poliklonalni serum ili monoklonska protutijela) koja specifično vide takav, denaturirani protein. Vezano specifično protutijelo se tada može detektirati pomoću radioaktivno ili enzimatski obilježenim anti-Ig protutijelima^{34,35}.

5.7.6.2 Hibridizacijske metode

Metoda hibridizacijom s DNK se često upotrebljava za

detekciju "in situ" rekombinantnih klonova. Ova metoda može vrlo brzo i precizno pronaći koja kolonija ili plak, među tisućama, sadrži željenu sekvencu. U tu svrhu kolonije bakterija ili plakovi bakteriofaga se prenesu s podloge i imobiliziraju na nitrocelulozni ili nylonski filter. Od tog filtera, mogu se napraviti duplikati (tzv. replike) stavljajući nove filtere na primarni (tzv. master filter). Replike se, dalje, tretiraju s deterdžentom (SDS) i alkaličnom otopinom da se liziraju bakterije i denaturira DNK. Nakon neutralizacije, filter se ispeče u vakuumu na 80°C, kako bi se DNK čvrsto vezala za filter. Radioaktivno obilježena DNK ili RNK proba se tada hibridizira s filterom i rezultat se očitava autoradiografijom. Kolonija s pozitivnim autoradiografskim signalom može se lako pronaći i pokupiti za umnožavanje. Prednost hibridizacijske metode je u tome što ne zahtijeva izražavanje gena (sintezu proteina) u bakterijama s rekombinantnim klonovima i svaka sekvenca se može detektirati specifično ako postoji podobna radioaktivna ili na drugi način obilježena proba. Pod probom se podrazumijeva svaka obilježena nukleinska kiselina kojom se traže komplementarne sekvence između velike količine nekomplementarnih. Naprimjer, neki klon cDNK se može radioaktivno obilježiti i hibridizirati s filterima genomske DNK knjižnice s ciljem da se izolira i karakterizira sami gen. S druge strane, na osnovu poznate aminokiselinske sekvence nekog peptida, mogu se sintetizirati oligonukleotidi sa svim mogućim kombinacijama kodirajuće DNK sekvence i upotrijebiti kao hibridizacijska proba. DNK proba se najčešće obilježava procesima u kojima se radioaktivni dezoksi ili ribonukleotidi s ^{32}P ugrađuju u DNK ili u RNK. Obje metode,

u biti, su "de novo" sinteza DNK ili RNK. Najraširenija je metoda tzv. translacije napuknuća DNK (nick-translation). Prekidi jedne uzvojnice DNK mogu nastati s vrlo malim djelovanjem enzima



Slika 6

- a. Obilježavanje DNK metodom translacije napuknuća (nick-translation). Asterisk označava radioaktivno obilježene fosfatne grupe.
- b. Shema obilježavanja DNK metodom s nasumce odabranim primerima (OLB).

DNaze I. Enzim presjeca fosfoesterski vez između 3' i 5' pozicije dvaju susjednih nukleotida ostavljajući slobodni 3'-OH radikal. DNK polimeraza I vadi iz dvostruke uzvojnice nukleotide u smjeru od 5' prema 3' i u isto vrijeme veže komplementarne nukleotide na 3' kraj (Slika 6a).

Cijeli proces vađenja i umetanja nukleotida, izgleda kao pomicanje prekida fosfoesterske veze duž jedne uzvojnice DNK i odatle ime ovoj metodi. Ako u reakciji zamijenimo postojeće nukleotide s radioaktivnim, dobiti će se obilježena DNK proba⁹².

Kod tzv. oligo-obilježavajuće metode, DNK proba se sintetizira uz pomoć DNK primera na kalupu jedne uzvojnice DNK i Klenow fragmenta (dio DNK polimeraze I bez 5'-3' egzonukleazne aktivnosti) (Slika 6b). Dvostruka uzvojnica DNK se, u tu svrhu, mora denaturirati, odnosno razdvojiti zagrijavanjem na 90-100°C. Budući da je primer skup oligonukleotida (obično penta ili heksamera) čije sekvence sadrže sve moguće kombinacije nukleotida, oni se mogu vezati uz komplementarni dio lanaca DNK i time omogućiti sintezu DNK probe. Kod navedenih dviju metoda obilježene DNK probe sadržavati će sekvence obje uzvojnice DNK.

Nasuprot tome, kod treće vrste obilježavanja (sinteze RNK), "in vitro" sintetizirane RNK probe imaju sekvence komplementarne samo jednoj od dviju mogućih DNK uzvojnica. "In vitro" sinteza RNK probe zahtijeva specifični regulacioni element, promoter, ispred (5') ili iza (3') DNK koje želimo obilježiti. Promoteri su mjesta gdje se RNK polimeraza veže i time pokreće sintezu RNK. Razlikuju se po specifičnosti (prokariotski i eukariotski) i po jačini djelovanja. Jaki promoteri nekih faga (T7, T3 ili SP6) su najčešće u upotrebi jer mogu stvoriti veće količine RNK probe od ostalih.

Jačina hibridizacijske probe mjeri se radioaktivnom specifičnošću tj. količinom ugrađene radioaktivnosti (cpm) po μg probe. Radioaktivna specifičnost neke probe je upravno proporcionalna s osjetljivošću detekcije sekvenci DNK ili RNK.

Najviša radioaktivna specifičnost probe postiže se sintezom RNK. Oligo-obilježavajuća metoda, osim što daje veću radioaktivnu specifičnost, ima još prednost od "nick"-translacije što je tehnički lakše izvediva.

Kao hibridizacijska proba, pri traženju gena izraženih u samo nekim tkivima, može se koristiti i specijalno obogaćena proba za željenu sekvencu. Obogaćena cDNK proba se pripravlja tako da se, prvo, sintetizira obilježena jednostruka uzvojnica cDNK na kalupu mRNK izolirane iz određene vrste stanica, i zatim se izvrši "oduzimanje" ubikvitarnih sekvenci. Naime, cDNK se hibridizira s mRNK izolirane iz druge vrste stanica i kromatografijom na hidroksilapatitnom gelu (koji veže nukleinske kiseline s dvostrukom uzvojnicom, a propušta jednostruke) izolira proba. Rezultirajuća cDNK proba bi imala skup sekvenci specifičnih za prvu vrstu stanica. Na isti način može se konstruirati specifično obogaćena knjižnica gena određenog tkiva, ukoliko se izvrši kompletna sinteza cDNK i klonira⁶¹.

5.7.6.3 Biokemijske metode

Biokemijske metode pretraživanja omogućuju korelaciju između kloniranog gena i proteina kodiranog u njemu. Postoje metode tzv. hibridom zaustavljene i hibridom selekcionirane "in vitro" translacije. Hibridom zaustavljena translacija je bazirana na činjenici da mRNA neće biti translirana u polipeptid "in vitro", ako je hibridizirana s DNK. DNK se pripremi skupljanjem desetina ili stotina rekombinantnih klonova koji se hibridiziraju s cijelom populacijom mRNA, izolirane iz stanica koje nas zanimaju u uvjetima u kojima je veza između DNK i RNK stabilnija

od DNK-DNK hibrida. Cijela mješavina se podvrgne "in vitro" translaciji te se prati inhibicija sinteze proteina koji nas interesira. Tako identificirani skup klonova se može dalje analizirati ponavljanjem metode, dok ne pronađemo klon koji kodira dotični protein^{58,111}.

Hibridom selekcionirana translacija je osjetljivija metoda od prethodne i bazirana je na istom principu. Razlika je u tome što se hibridizacijom zadržana mRNK eluira ili izolira, podvrgne "in vitro" translaciji te analizira za prisustvo proteina od interesa. To se obično ostvaruje radioaktivnim obilježavanjem polipeptida i analizom na poliakrilamidnom gelu. S druge strane, "in vitro" sintetizirani proteini mogu se upotrijebiti za biološke pokuse ili druge, različite, funkcionalne testove¹⁰⁷.

5.7.7 Karakterizacija rekombinantne i genomske DNK

Nakon izolacije klona koji nas zanima, potrebno ga je mapirati, radi kasnije lakše identifikacije ili određivanja položaja gena. Konačni cilj karakterizacije jest utvrđivanje sekvence DNK i koreliranje s funkcijom u stanici.

5.7.7.1 Agarozna i poliakrilamidna gel elektroforeza

Mapiranje klonova vrši se ustanovljavanjem duljina fragmenata nakon razgradnje s raznim restrikcijskim enzimima.

Duljina DNK fragmenata može se utvrditi gel elektroforezom⁹². Agarozna gel elektroforeza može još razlučiti cirkularne od linearnih formi plazmida ili kozmida. Migracija molekula iste konformacije, općenito, je obrnuto proporcionalna logaritmu nji-

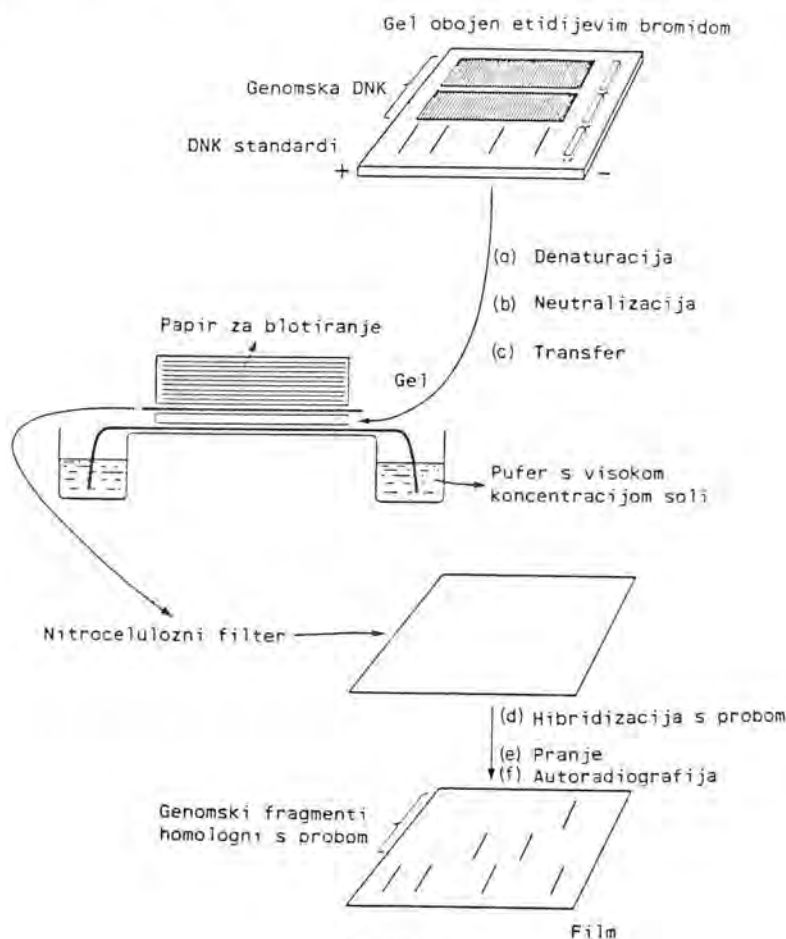
hovich molekularnih težina.

Separacija DNK fragmenata ovisna je o količini agaroze (tzv. postotak gela). Dulji DNK fragmenti imaju bolju rezoluciju kod gelova s manjim postotkom agaroze. U istim su manji fragmenti nedovoljno odvojeni. Kod gelova s većim postotkom agaroze dešava se obratno. Bez obzira na postotak, gornja granica rezolucije konvencionalne elektroforeze s konstantnom voltažom leži oko 50 kb. Fragmenti genomske DNK, razgrađene s restriksijskim enzimima (koji sijeku rijetko u genomu sisavaca), mogu doseći duljinu od nekoliko stotina do tisuća kb. Za analizu takvih segmenata upotrebljavaju se metode tzv. "pulse-field gradient" i "inverse-field gradient" gel elektroforeze^{23, 121}.

Pri agaroznoj gel elektroforezi migracija DNK se može vidjeti prostim okom, ukoliko se upotrijebi interkalirajuća boja etidium bromid i ultraljubičasto svjetlo. Kod poliakrilamidne gel elektroforeze, fragmenti DNK se moraju radioaktivno obilježiti da bi se detektirali.

Poliakrilamidni gelovi se najčešće upotrebljavaju pri sekvenciranju DNK. Agarozni gelovi služe pri analizi genomske DNK, RNK, rekombinantnih klonova i u preparativne svrhe (izolacija dijelova DNK za kloniranje ili za hibridizacijske probe). Često je potrebno znati koja sekvenca u nekom DNK fragmentu je prepisana u RNK ili pak hibridizira s nekim drugim DNK fragmentom. Metoda kojom se elektroforetski separirana DNK u agaroznom gelu prenosi na nitrocelulozni ili nylonski filter, zove se Southern blot prema imenu pronalazača^{130, 131}. Dijelovi DNK u agaroznom gelu, dobiveni razgradnjom s restriksijskim enzimom, tretiraju se s alkalijama i zatim se gel postavi na postolje s

filter papirom zasićenim s puferom. Na gel se, odozgo, priljubi nitrocelulozni papir, koji se natsloji s mnogo suhog filter papira. Pufer iz rezervoara podno postolja bude upijan od filter papira ispod gela i struji uvis prema suhom filter papiru noseći sa sobom dijelove DNK. DNK ostaje adherirana na nitroceluloznom filteru i nakon sušenja i pečenja na 80°C u vakuumu ostane trajno



Slika 7

Southern blot tehnika prijenosa DNK s gela na filter i hibridizacije s probom.

vezana za nj. Filter, tada, može biti stavljen u otopinu za hibridizaciju s RNK ili DNK probama. Nakon što se filter opere od viška probe, rezultat se očitava autoradiografski (Slika 7). Po istom principu (samo uz snažniju denaturaciju i uz višu

koncentraciju soli) prenosi se i mRNK na nitrocelulozu. Takav "blot" naziva se "Northern"¹³⁶. Ako želimo znati duljinu mRNK nekog proteina, hibridizirati ćemo filter s odgovarajućom probom koja sadrži anti-kodirajuću sekvencu gena dotičnog proteina. Kao i ranije, rezultati se dobiju autoradiografijom.

5.7.7.2 Sekvenciranje DNK

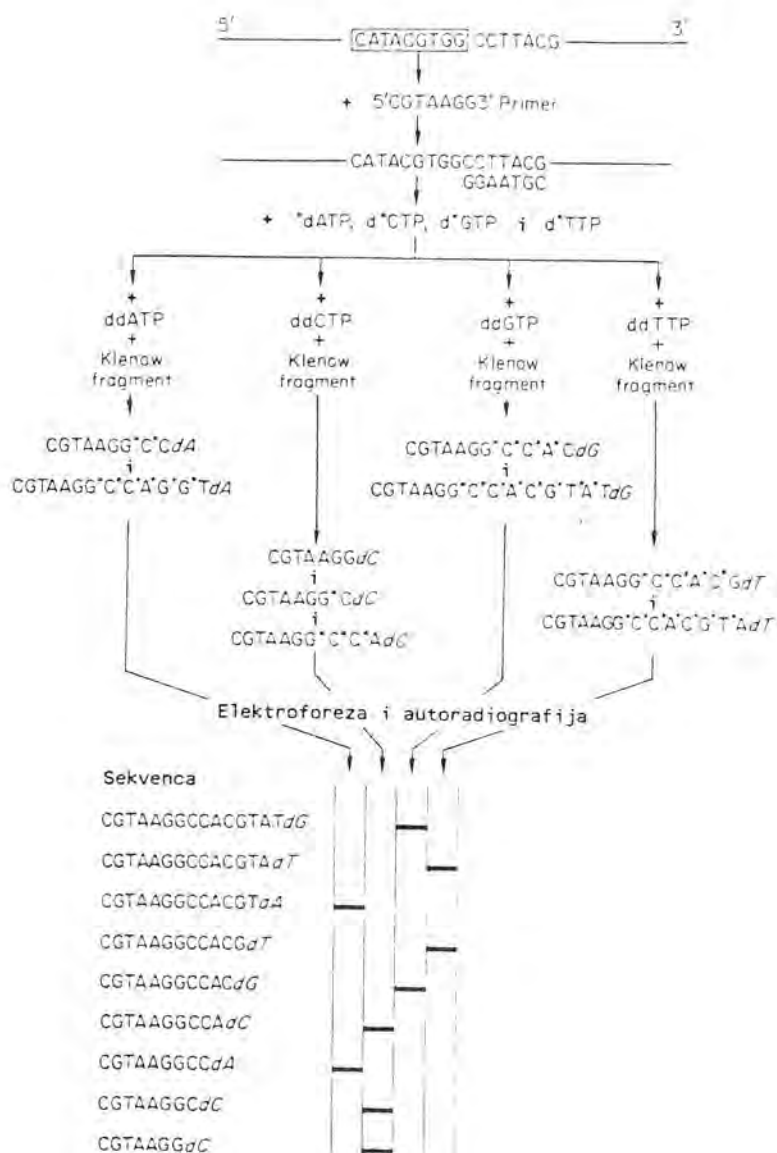
Dosada opisane tehnike mogu dati uvid u broj i organizaciju gena od interesa. Međutim, sekvenciranje DNK daje točnu informaciju o primarnoj strukturi proteina. Metode sekvenciranja mogu se, bazično, podijeliti u dvije skupine: kemijske degradacije⁹⁶ i završavanja sinteze DNK lanaca didezoksinukleotidima¹²⁰.

Kod kemijske degradacije, može se sekvencirati bilo jednostruka ili dvostruka uzvojnica DNK. Za potonju, jedini uvjet je postojanje mjesta za presjecanje bilo kojim restriksijskim enzimom u dotičnom segmentu. Od tog mjesta može se sekvencirati 250 do 400 bp u oba smjera obje uzvojnice DNK. Duljina dobivene sekvence ovisi o uvjetima gel elektroforeze. Osnova metode sastoji se u specifičnom presjecanju DNK. Prvi korak je kemijsko modificiranje nukleotidne baze. Zatim dolazi odvajanje baze od dezoksiriboze i konačno presijecanje DNK uzvojnice na mjestu izloženog ugljikohidrata. Samo gvanin i citozin se mogu zasebno specifično modificirati. Budući da se purinski (G,A) i pirimidinski (C,T) prstenovi također modificiraju posebno, presijecanje DNK na mjestima gdje se nalaze adenin i timin ustanovi se dedukcijom. Modifikacija baza mora biti kompletna, dok presjecanje treba biti djelomično kako bi stvorio skup DNK

fragmenata svih mogućih duljina.

Opisana procedura zauzima centralno mjesto u sekvenciranju. Prije specifične modifikacije i presjecanja treba željeni dio DNK presjeći jednim enzimom te krajeve (3' ili 5') radioaktivno obilježiti. Nakon što se izvrši obilježavanje, treba fragment presjeći drugim enzimom i izolirati samo jedan (od dva obilježena fragmenta). Tako pripremljeni dio DNK podvrgne se kemijskoj degradaciji u 4 odvojene reakcije specifične za različite baze. Nakon djelomičnog presjecanja DNK, paralelno se sve 4 reakcije razvuku elektroforetski na poliakrilamidnom gelu i autoradiografijom očita rezultat. Budući da je jedan kraj DNK obilježen, na filmu će ostaviti trag (kao crtu) samo oni djelomično razgrađeni dijelovi koji ga nose. DNK sekvenca se može očitati prateći slijed crta na autoradiogramu (analogno prikazanoj metodi na slici 8). Rezolucija gelova je dovoljno dobra da se primjećuje pomak u migraciji fragmenata s jednom bazom razlike do duljine od nekoliko stotina baza. Često je potrebno potvrditi sekvencu jedne uzvojnice DNK, sekvenciranjem komplementarne.

Druga vrsta sekvenciranja, završavanje sinteze DNK uzvojnica didezoksinukleotidima, je enzimatskog karaktera. Osnova metode sastoji se od hibridizacije oligonukleotidnog primera za komplementarnu sekvencu vektora, pored kloniranog dijela DNK i regulirane djelomične sinteze DNK pomoću Klenow fragmenta ili reverzne transkriptaze. Ove reakcije sadržavaju sva 4 didezoksinukleozid trifosfata od kojih je jedan radioaktivno obilježen s ^{32}P (ili sadrži ^{35}S -tio analog). Svaka od četiri zasebne reakcije posjeduje još, u manjoj koncentraciji, 2', 3' didezoksi ana-



Slika 8

Sekvenciranje DNK s didezoksinukleotidima. Asterisk označava radioaktivno obilježeni nukleotid. Sekvenca DNK koja se treba sekvencirati je u pravokutniku na vrhu slike.

log jednog od dezoksinukleozida. Kod je didezoksi analog umetnut u DNK, daljnja sinteza je onemogućena zbog toga što didezoksi analogu nedostaje 3' OH grupa. Naprimjer, u reakciji s didezoksi citidinom (ddCTP), određena proporcija sintetskih reakcija će biti zaustavljena svaki put kad bi normalno trebao dCTP biti umetnut u DNK. Rezultat takve djelomične sinteze biti će populacija fragmenata različite duljine s istim ishodištem.

Nakon što se sve četiri specifične reakcije paralelno elektroforetski razdvoje i gel autoradiografira, sekvenca se očita prateći poredak crta na filmu, slično kao u prethodno opisanoj metodi (Slika 8).

Najvažniji problem u didezoksi metodi jest stvaranje podobnog kalupa za DNK sintezu, jer on mora biti jednostruki lanac DNK (ili rijede RNK). To se ostvaruje upotrebom M13 vektora (virusa *E. coli*) čiji genom je jednostruki kružni lanac DNK. U bakterijskoj stanici, M13 sintetizira jednostruki lanac DNK i izlučuje ga u okolinu u proteinskom omotaču. DNK kalup se tada lako izolira iz tekućeg medija s umnoženim bakterijama transformiranim s M13 vektorom koji nosi dio DNK za sekvenciranje.

5.7.8 Implikacije i aplikacije

Najveći doprinos rekombinantnog DNK istraživanja ostvaren je u molekularnoj biologiji. Međutim, druga biološka i medicinska područja istraživanja i djelovanja bivaju sve više vezana uz metode i spoznaje ostvarene DNK tehnologijom.

Cilj molekularne biologije jest da metodama kloniranja gena dobije informaciju o kompletnom kodirajućem i regulirajućem potencijalu genoma te da poveže strukturu i funkciju gena. Posljednje se može ostvariti prenošenjem kloniranih gena "in vitro" natrag u eukariotske stanice direktno, ili preko DNK zametne loze (npr. ubacivanjem u oplodenu jajnu stanicu miša i dobivanjem transgeničnih životinja).

Međutim, rekombinantna DNK nije samo oruđe za studiranje gena. Njome se mogu producirati biološki aktivni i korisni

proteini poput insulina, interferona, hormona rasta i mnogih drugih. Produkcija navedenih supstanci ovisi o efikasnoj i pravilnoj ekspresiji dotičnih gena u stanicama novog domaćina. Često u prokariotskim stanicama ti uvjeti nisu zadovoljeni, pa je potrebno optimizirati ekspresiju svakog proteina zasebno. Danas je moguće producirati veliki broj stranih proteina u *E. coli* i u drugim mikroorganizmima (*B. subtilis*, kvašćeve gljivice i dr.) koji su dovoljno čisti za terapijsku upotrebu.

Osim navedenih upotreba, izolirani geni mogu se mutirati "in vitro" tako da mu se fenotipske osobine promjene. U ovoj aplikaciji leže najveći potencijali ali i rizici DNK tehnologije.

Rizik je u tome što neki novi ili mutantni klonovi, opasni po zdravlje jedinke, vrste ili ekosistema, mogu uslijed nepažnje ili namjerno izaći iz laboratorija. Zbog toga se dio rekombinantne DNK tehnologije, koji potpada u navedenu rizičnu kategoriju, mora izvršavati u specijalnim laboratorijima i svaki eksperiment koji se vrši izvan njega s nekim novim kombinacijama genetskog materijala strogo se treba kontrolirati od strane posebnih državno opunomoćenih znanstvenih komisija. U zapadnim državama postoje posebni propisi za vršenje pokusa s rekombinantnom DNK (NIH Guidelines).

Potencijal modificiranja gena daje nadu nekim znanstvenicima za ostvarivanje genske terapije¹⁴⁵. Ako se "normalni" gen bude mogao ubaciti u svaku eukariotsku stanicu na specifično mjesto u genomu tako da inaktivira "nenormalni" (npr. onkogen) ili pak nadomjesti gen koji nedostaje, funkcija stanice, a time i tkiva, bi postala normalna. Zasad ne postoji mogućnost efikasnog prije-

nosa gena u eukariotske stanice, niti specifične integracije u kromosomalnu DNK. Nažalost, od rijetkih stanica koje prime i bilo gdje integriraju ubačeni gen, samo manjina ga može izraziti. Spoznaja o genetskoj manipulaciji, zasad, ne dozvoljava nikakve realistične predodžbe niti predviđanja o genskoj terapiji. Nasuprot tome, korisne efekte suvremene DNK tehnologije moguće je vidjeti u pouzdanoj dijagnostici genetskih markera nekih hereditarnih i neoplastičkih bolesti, pri forenzičnoj identifikaciji osoba⁴² ili u pripravi supstanci za terapijske ili profilaktičke svrhe.

6. MATERIJAL I METODE

6.1 Materijal

6.1.1 Kemikalije

Većina kemikalija je kupljena od komercijalnih proizvođača: Bethesda Research laboratories (BRL), Gaithersburg, USA; New England Biolabs, Beverly, USA; Boehringer, Mannheim, Zap. Njemačka; P.H. Stehelin and Cie., AG, Basel, Švicarska; Sigma, St. Louis, USA; Bio Rad, Glattburg, Švicarska; New England Nuclear, USA; Amersham, U.K. Ostali proizvođači navedeni su pored specifičnih kemikalija.

6.1.2 Stanični klonovi

Klonovi citotoksičnih limfocita T, upotrebljeni u radu, dobiveni su od Dr. Wenera Haasa, Institut za Imunologiju u Baselu. Ciljne stanice u CML testovima su LPS stimulirani B limfoblasti (A 20) ili L fibroblasti (vidi 6.2.9, 6.2.10 i Rezultate).

6.2 Općenite metode

(Specifični postupci su opisani u opisima slika).

6.2.1 Izolacija genomske DNK

Eukariotska genomska DNK izolirana je prema modifikaciji opisane metode⁹². Stanice ($50-100 \times 10^6$) se liziraju tako da se inkubiraju u puferu (10 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) 10 min. na 37°C sa 0,2% SDS-om. Zatim se doda 100 µg/ml proteinaze K da se razgrade proteini i inkubacija se produži preko noći. Otopina se naredni dan ekstrahira 2-3 puta sa fenolom (redestiliranim i napravljenim prema 6.2.6.1) i dva puta, s jednakim volumenom kloroform-izoamilnog alkohola (24:1) kako bi se denaturirali i ekstrahirali svi preostali dijelovi stanica. DNK se, zatim, dijalizira u puferu s 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, s izmjenom pufera svaka četiri sata, najmanje tri puta. Da bi se razgradila RNA, doda se RNaza A, 100 µg/ml (priređena po Maniatis i sur.⁹²) i otopina se inkubira na 37°C oko tri sata. Nakon toga se doda proteinaza K do koncentracije od 100 µg/ml i inkubacija se produži za narednih pet sati jer je potrebno inaktivirati RNazu A. Iz pripravka DNK ekstrahiraju se proteini s fenolom, kloroformom i, konačno, DNK se dijalizira u TE puferu (10 mM Tris-HCl [pH 8] i 1 mM EDTA). DNK se čuva na +4°C.

6.2.2 Izolacija plazmidske ili kozmidske DNK

Korištena je modificirana metoda "alkalične lize", opisane u Maniatis i sur.⁹². Bakterije (E. coli K12, vrste: MC1061, 490A ili K803) u koje su ubačeni plazmidi ili kozmidi,

kultiviraju se u 100 ml tekućeg medija (L-broth), s odgovarajućim selekcijskim antibiotikom (ampicilin ili kanamicin) preko noći. Nakon centrifugiranja (6000 rpm, 10 min.) bakterijski pelet se resuspendira u 5 ml pufera s 50 mM glukozom, 25 mM Tris-HCl (pH 8) i 10 mM EDTA. Odmah potom doda se 10 ml 0,2 N NaOH i 1% SDS da se liziraju bakterije, te se otopina inkubira 15 minuta na ledu. Zatim se doda 7.5 ml 5 M kalijeveg acetata (pH 6) i pripravak se ostavi 15 minuta na ledu. Tada se otopina centrifugira (6000 rpm, 15 minuta) i nadtalog se ekstrahira a 10 ml fenola + 10 ml kloroforma (pripravljeno prema Maniatisu i sur.⁹²). Nakon centrifugiranja (6000 rpm, 10 min.) u nadtalog se doda jednaki volumen izopropanola i pripravak ponovo centrifugira pod istim uvjetima. Rezultirajući talog je precipitirana DNK koja se rastopi u 0,5 ml 1 x TE (vidi 6.2.1) puferu. Doda se RNaza A do konačne koncentracije od 100 µg/ml i otopina se dijalizira preko noći u 1 x TE puferu (5 l).

Ovako izolirana DNK onečišćena je s malom količinom genomske *E. coli* DNK. Ponekad je potrebno, za izolaciju hibridizacijskih proba i sekvenciranje, dodatno pročistiti DNK na gradijentu cezijeveg klorida. U tu svrhu, doda se 1 g CsCl i 0,1 ml (10 mg/ml) etidium bromida u svaki ml DNK otopine i uzorak se odcentrifugira u ultracentrifugi pri 50 000 rpm, 20 sati na 20°C u vertikalnom rotoru. Nakon toga se pod UV svjetlom od 360 nm, iglom probuši epruveta i pomoću šprice izvuče pročišćena DNK (koja izgleda poput svijetlog punog koluta). Linearna (genomska ili plazmidska) DNK se nalazi



Slika 9

Pročišćavanje plazmidske ili kozmidske DNK na gradijentu CsCl.

iznad koluta cirkularne tzv. "supercoiled" plazmidske ili kozmidske DNK (Slika 9).

6.2.3 Izolacija DNK bakteriofaga λ

Metoda koja se koristila za izolaciju malih količina bakteriofaga λ gt11 jeste modifikacija opisane u Maniatis i sur.⁹² (str. 371). Bakteriofazi se čuvaju u SM puferu (100 mM Tris-HCl [pH 7.5] 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 0,01% želatine) na 4°C. Suspenzija faga (50-100 μ l; za 10⁸ plakova) pomiješa se sa 100 ml odgovarajućih bakterija E. coli. Nakon 20 minuta inkubacije na 37°C, doda se 3 ml otopljene 0,7%-tne

agaroze i polije po površini 3 petrijeve posude koje sadrže LB medij s 1,5%-tnom agarozom. Posude se inkubiraju na 37°C preko noći (9-14 sati), dok plakovi ne pokriju gotovo cijelu površinu. Zatim se doda na površinu posuda 5 ml SM pufera i pusti 1-2 sata da se fazi eluiraju. Suspenzija se tada centrifugira (6000 rpm, 10 min. na 4°C) da se odstrani bakterijski debris. U nadtalog se doda RNaza A i DNaza I do konačne koncentracije od 1 µg/ml i inkubira 30 minuta na 37°C. Zatim se doda 20% (w/v) polietilenglikol (6000) i 2,5 M NaCl u SM puferu i produži inkubacija za 1 sat, ali na 0°C. Precipitirani bakteriofazi se zatim odcentrifugiraju (12000 g, 20 minuta, 4°C) i talog se resuspendira u 0,5 ml SM pufera u koji se doda 5 ml 10% SDS i 5 ml 0,5 M EDTA (pH 8). Nakon 15 minutne inkubacije na 68°C, pripravak se ekstrahira fenolom i zatim kloroformom. DNK bakteriofaga se precipitira s jednakim volumenom izopropanola na -70°C oko 20 minuta. Precipitat se odcentrifugira (12000 g, 15 minuta) i talog (DNK) se otopi u 50 ml 1 x TE (pH 8).

6.2.4 Izolacija RNK

U radu se koristila modificirana metoda izolacije pomoću gvanidinium izotiocijanata i centrifugiranja kroz gradijent cezijeveog klorida (CsCl)^{26,44}. Otprilike 30×10^6 stanica se suspendira u 0,5 ml PBS (engl. phosphate-buffered saline) i doda 6 ml 4 M gvanidin tiocijanata, 5 mM natrijevog citrata (pH 7), 0,1 M merkaptoetanolu i 0,5% sarkozila. Za svakih 2,5 ml suspenzije doda se 1 g CsCl. Cijeli pripravak se natsloji na 3

ml 5,7 M CsCl i 0,1 M EDTA (pH 7,5). Centrifugira se u ultracentrifugi (npr. rotor SW 41, 18 sati na 26000 okretaja) i talog (RNK) se otopi u 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA i 1% SDS. Otopina se ekstrahira s mješavinom kloroforma i butanola (4:1) i RNK se precipitira s dvostrukim volumenom etanola (-20°C, dva sata) nakon što se dodalo natrijevog acetata (pH 5,2) do konačne koncentracije 0,3 M. Precipitat se centrifugira (12000 g, 15 minuta) i talog (RNK) otopi u odgovarajućoj količini vode i čuva na -70°C.

Poliadenilirana RNK (poli[A]⁺RNK) se, nadalje, izolira pomoću kolone oligo (dT)-celuloze. Totalna RNK se otopi u 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA i 0,1% SDS te propusti kroz ekvilibriranu kolonu. Poli[A]⁺RNK se eluira s puferom koji sadrži samo 20 mM Trisa i 1 mM EDTA; precipitira se s etanolom. RNK se može čuvati kao precipitat u etanolu na -70°C ili otopljena u vodi do željene koncentracije.

6.2.5 Transformacija bakterija

6.2.5.1 Transformacija E. coli

Bakterije E. coli soja K12 postaju permeabilne za DNK molekule ako se uzmu za vrijeme eksponencijalnog rasta i obrade sa solima kalcija (ili drugih divalentnih kationa) na 0°C. Takve stanice zovu se kompetentnim i mogu efikasno primiti cirkularnu plazmidsku, kozmidsku ili bakteriofagnu DNK. Otprilike 1 molekula plazmida od 10⁴-10⁵ uspijeva transformirati bakteriju, što daje otprilike frekvenciju od 10⁶-10⁷ transformanata po µg DNK.

Transformacija se vrši tako da se pomiješa plazmidska ili

kozmijska DNK s kompetentnim stanicama na 0°C. Mješavina se kratkotrajno zagrije na 37-42°C (u to vrijeme DNK ulazi u stanice). Nakon toga stanice se inkubiraju na selektivnim hranjivim podlogama 12-14 sati na 37°C.

U radu su se upotrebljavali sojevi MC1061 ili K803 za transformaciju s plazmidima i kozmidima. Kompetentne stanice se pripremaju tako da se od jedne kolonije ili smrznute kulture (-70°C) inokulira 10 ml tzv. "prekonoćne" kulture s L-medijem (1% tripton; 0.5% ekstrakta kvašćevih gljivica, pH 7,4; [Difco] i 0.5% NaCl). 0,5 ml od prekonoćne kulture se inokulira u 100 ml L-medija do apsorbance od $A_{550} = 0,3-0,4$. Nakon što se kultura ohladi na ledu, odcentrifugiraju se stanice na 3000 okretaja u min., 5 minuta pri 4°C. Stanice se resuspendiraju u 50 ml hladnog 0,1 M $CaCl_2$ i ostave na ledu 20-30 minuta.

Nakon ponovne centrifugacije s istim uvjetima, stanice se resuspendiraju u 1/100 početnog volumena (1 ml) 0,1 M $CaCl_2$. Od toga se za svaku transformaciju uzima 100-200 μ l. Mješavinu stanica i DNK treba ostaviti 10-20 minuta na ledu prije "vrućeg šoka" na 37°C (ili 42°C) od 2 minute. Bakterije se mogu odmah razastrti po podlozi koja sadrži L-medij i 1,5% agar uz selektivni antibiotik (obično ampicilin ili kanamicin, 50 μ g/ml ili 3 μ g/ml). Podloge se inkubiraju na 37°C preko noći.

6.2.5.2 Transdukcija u E. coli

Bakterije E. coli mogu biti inficirane u bilo koje vrijeme rasta i nije ih potrebno učiniti kompetentnim. Infekcijom se postiže efikasnost od 10^7-10^9 transformanata po μ g DNK faga. Transdukcija se vrši tako da se "in vitro" pakirani virusi

pomiješaju s stanicama (koje se čuvaju u 10 mM MgSO₄ na 4°C) i inkubiraju 20-30 minuta na 37°C. Nakon toga, mješavina se rasprostire po hranjivoj podlozi i inkubira 11-16 sati (ovisno o namjeni) na 37°C.

U radu su se upotrebljavali sojevi 490A (za "in vitro" pakiranje kozmida), Y1090 (za λ gt11) i JM109 (za M13 vektore). Detaljnije metode opisuju se u pogl. 6.2.6.2.5, 6.2.7.2.9 i 6.2.8.3.2.

6.2.6 Knjižnica genomske DNK

6.2.6.1 Potrebni materijal

- sevag: kloroform i izoamilni alkohol (24:1)
- fenol: pripremljen tako da se u redestilirani fenol, dok je još vruć (65°C) doda malo (na vrhu špatule) 8-hidroksikinolina tek da uzorak dobije žutu boju. Ovaj spoj reducira ostatke oksidativnih onečišćenja koje se mogu naći u fenolu. Zatim se fenol ekvilibrira s jednakim volumenom 1 M Tris/HCl (pH 8) i još dva puta s 0,1 M Tris/HCl (pH 8) koji sadrži još i β -merkaptoetanol 2 mM. Uvijek pri spomenu ekstrakcije fenolom, treba ga ovako pripremljenog upotrebljavati.
- 10% saharoza: 100g saharoze u 1 l H₂O (konačni volumen) 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA. Otopinu je potrebno sterilizirati.
- 40% saharoza: kao iznad, samo s 400g saharoze.
- agarozne petrijeve posude s etidijevim bromidom. U petrijevke izlije se 1% agarozu u TE puferu s 1 μ g/ml EtBr.

Čuvaju se na 4°C.

- 10 x pufer za ligaciju: 0,5 M Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 M MgCl₂, 0,1 M dithiothreitol, 10 mM ATP, 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin).
- 1 x TE pufer (vidi 6.2.1)
- SM pufer (vidi 6.2.3)
- L-medium (vidi 6.2.5)
- Lamp-posude: L-medij s agarom (1,5%) i ampicilinom 50 µg/ml. Potrebno je oko 100 kvadratnih ploča (23 x 23 cm; A/S NUNC, Danska), 100 (15 cm u dijametru) i 50 malih petrijevih posuda za 1 knjižnicu.
- HMF 1. amp ploče: 3,6 mM K₂HPO₄; 1,3 mM KH₂PO₄, 2 mM natrijev citrat, 1 mM MgSO₄, 1% tryptone, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvašćevih gljivica; 1,5% agar, 5% glicerol (pH 7,5) i 50 µg/ml ampicilin. Potrebno je 50 velikih kvadratnih ploča.
- HMF 2 amp ploče: kao što je navedeno iznad, samo s 25% glicerola. Potrebno je 20 velikih NUNC ploča.
- TSE pufer: 50 mM Tris/HCl (pH 8), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA.
- 1 x SSC: 0,15 M NaCl; 0.015 M Natrijev tricitat (pH 7).

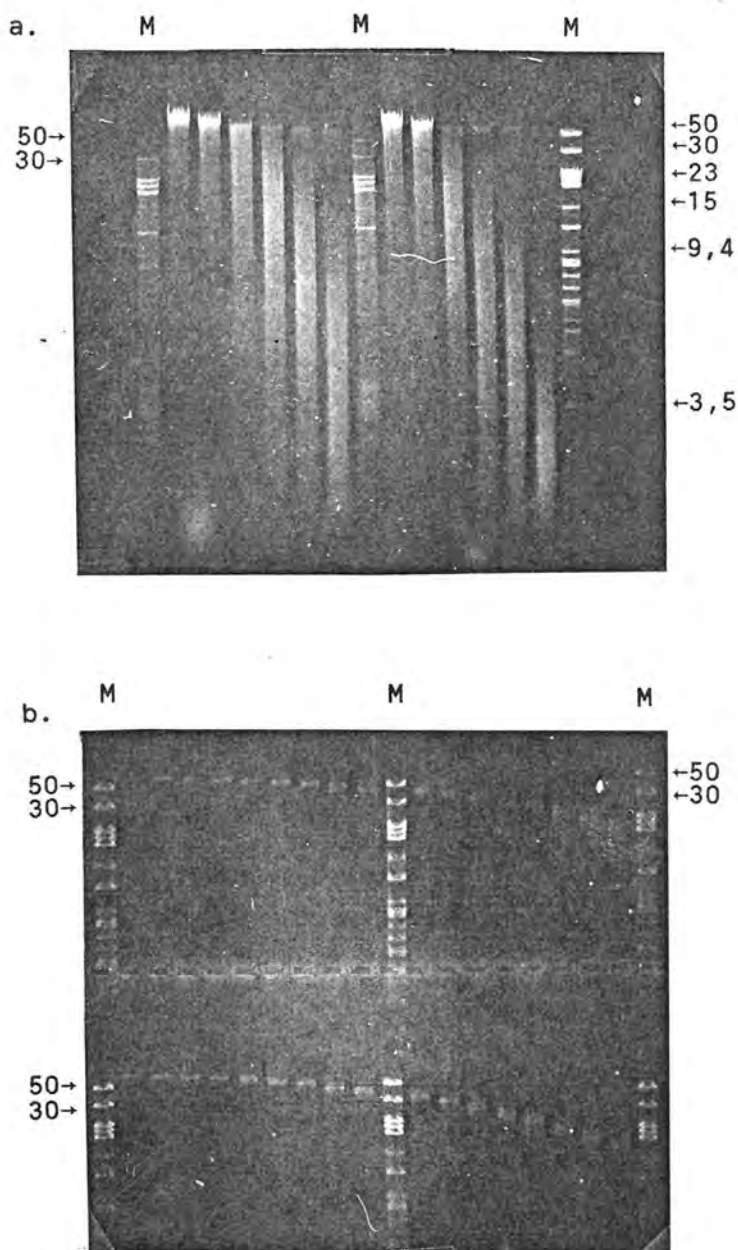
6.2.6.2 Konstrukcija kozmidske knjižnice

U radu se koristila metoda kloniranje u kozmidu pNNL prema opisanoj uputi¹³⁵

6.2.6.2.1 Djelomična razgradnja genomske DNK

Prvi korak jest djelomična razgradnja genomske DNK s Sau 3A ili MboI enzimom. Otprilike u oko 20 zasebnih reakcija (svaka po

20 μg) razgradi se genomska DNK tako da većina DNK bude razgrađena u fragmente od 30-50 kb (Slika 10a). Nekoliko reakcija treba učiniti tako da većina fragmenta bude veća ili manja. To je zbog toga što neka područja u DNK molekulama se



Slika 10

(Opis slike na slijedećoj strani)

(Opis slike 10)

a. Djelomična razgradnja genomske DNK velike molekularne težine s Sau 3A enzimom. DNK je razgrađena s različitim koncentracijama enzima da se nađe optimalna. Za detalje, vidi tekst. Veličina standarda je u kb. M. Standardne velične DNK fragmenata u kb.

b. Elektroforetska analiza djelomično razgrađene DNK s Sau 3A i frakcioniranje na saharoznom gradijentu. Za detalje, vidi tekst. M. Isto kao pod a.

razgrađuju brže ili sporije od prosjeka. Reakcije se zaustave dodatkom 15 mM EDTA (konačna koncentracija) i 1 μ g se elektroforetski provjeri (0,3% agarozna, 40 V/16 sati). Svih 20 uzoraka (400 μ g) se skupi i ekstrahira s fenolom i sevagom.

6.2.6.2.2 Izolacija 30-50 kb dugih DNK fragmenata

Slijedeći korak je izolacija DNK fragmenata pomoću saharoznog gradijenta. Napravi se 10-40% saharozni gradijent u Beckman SW27 polialomernim epruvetama (2 x 40 ml). DNK se natsloji (1 ml po epruveti, ~200 μ g DNK) na gradijent i odcentrifugira 20 sati na 26 000 okretaja u min, 20°C (bez kočnice). Pomoću sakupljača frakcija, skupi se oko 30 frakcija, po 0,7 ml počevši od dna epruvete. Od svake se 10 μ l analizira na 0,3% agaroznom gelu i (Slika 10b) samo frakcije od 30-50 kb DNK se skupe i precipitiraju s točno 2,5 volumena etanola. Dobijena DNK se otopi u 50 μ l TE i ostavi na 4°C preko noći da se kompletno rastopi. Koncentracija DNK se odredi pomoću standarda na agaroznim pločama s etidijevim bromidom. Obično se dobije oko 20 μ g DNK fragmenata.

Naredni korak obuhvaća ligiranje (spajanje) DNK dijelova s kozmidskim vektorom.

6.2.6.2.3 Priprema kozmidskog vektora

Postupak pripreme vektora odnosi se samo na kozmid pNNL⁵². Vektorske "ruke" (dijelovi vektora koji sadrže cos komplementarna mjesta) dobiju se razgradnjom jednog uzorka (20 µg) kozmida s HpaI i drugog s ClaI. Nakon potpune razgradnje s navedenim enzimima, uzorci se ekstrahiraju s fenolom, sevagom i precipitiraju s etanolom (uz 0,3 M natrijev acetat, pH 5,2). Talog (DNK) se ispere jednom s 70% etanolom. DNK se zatim otopi u 50 µl 50 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂ i 1 mM spermidina. U tom puferu izvrši se defosforilacija 5' krajeva DNK s alkalnom fosfatazom izoliranom iz telećih crijeva (CIAP; za bakterijsku alkalnu fosfatazu treba slijediti drugačiju metodu). Inkubacija se vrši na 37°C s 0,75 jedinica CIAP (Boehringer) 30 minuta, a zatim se ponovo doda 0,75 jedinica CIAP za narednih 30 minuta. Reakcije se zaustave dodajući 40 µl H₂O (tridestilirane), 10 µl 10 x STE (100 mM Tris/HCl [pH8], 1 M NaCl, 10 mM EDTA) i 5 µl 10% SDS-a. Uzorci se zagrijavaju na 68°C, 15 minuta. Nakon toga izvrši se dva puta ekstrakcija s fenolom i dva puta sa sevagom. Svaku ekstrakciju treba reekstrahirati s dodatnih 100 µl TE pufera kako bi se gubitak vektorske DNK pri ekstrakcijama smanjio na minimum. Sve vodene faze oba uzorka se skupe i precipitiraju s etanolom. Talози se otope u 150 µl TE pufera i 1 µl se testira za kompletnu defosforilaciju, povezujući vektor sam za sebe s T4 DNK ligazom na 15°C tijekom 1 sata i analizom na 0,6% agaroznom gelu. Ukoliko je defosforilacija kompletna, vektor treba presjeći s enzimom BamHI (160 jedinica 1 sat na 37°C). Nakon kompletne razgradnje (što se provjeri na gelu) vektorske ruke treba ekstrahirati s

fenolom, sevagom i precipitirati s etanolom. Nakon pranja taloga s 70%-tnim etanolom, talog se otopi u 50 μ l TE pufera i čuva na -20°C .

6.2.6.2.4 Spajanje vektora i DNK

Genomski fragmenti DNK dugi 30-50 kb, ligiraju se s vektorom tako da se dobiju konkatameri. To se postiže ako je koncentracija DNK u reakciji veća od 10 $\mu\text{g/ml}$. Ligirajuća reakcija treba imati volumen od 10-20 μ l u kojoj, tada, uz odgovarajući pufer, ima 1,5 μg (4 μ l) genomske DNK i 1,5 μg pNNL dijelova (2 μ l). Pufer za ligaciju (koji sadrži 10 mM ATP) treba dodati nakon što se DNK zagrije 5 minuta na 70°C i ostavi 30 minuta na ledu. Nakon dodavanja T4 DNK ligaze, uzorak se inkubira 2 sata na 15°C . Uspjeh u spajanju može se vidjeti ako se 1 μ l uzorka separira na 0,6%-tnom agaroznom gelu.

6.2.6.2.5 Pakiranje kozmida

Za "in vitro" pakiranje, treba rastopiti smrznute, komercijalno pripremljene ekstrakte (Amersham) na ledu i pakirati 1-4 μ l ligiranog uzorka. Nakon 1,5 do 2 sata, pakiranje se zaustavi dodavanjem 500 μ l SM pufera i 10 μ l kloroforma. Spakirani kozmidi se čuvaju na 4°C . Titar rekombinantnih klonova opada brzo nakon nekoliko mjeseci. Bakterijske stanice *E. coli* vrste, soja K12 490A se pripreme od svježije prekonoćne kulture (L-medij s 0,2% maltoze). Bacterije se resuspendiraju u 10 mM MgSO_4 i od toga je obično dovoljno uzeti 100 μ l za titriranje knjižnice. Nakon 20 minuta inkubiranja s pakiranim kozmidima, doda se 1 ml L-medija i nastavi inkubacija za narednih 60 minuta,

kako bi se omogućila ekspresija gena za ampicilinsku rezistenciju. 200 μ l od toga se rasprostire po petrijevoj posudi (15 cm u promjeru) s L-amp agarom i inkubira preko noći. Od broja transformiranih bakterija može se izračunati količina stvorenih rekombinantnih faga.

6.2.6.2.6 Transdukcija pakiranih kozmida

Za konstrukciju reprezentativne genomske knjižnice pakira se dovoljno faga za 0,6 do 1×10^6 kozmidskih klonova. U takvoj knjižnici vjerojatnost prisutnosti neke sekvence je veća od 99,9%. Dovoljna količina pakiranih kozmida pomiješa se s dvostrukim volumenom bakterija i izvrši transdukcija kako je navedeno za titriranje knjižnice. Bakterije se direktno rasprostru na nylon filtere ("GeneScreen Plus; NEN) koji su prethodno stavljeni na velike kvadratne Lamp posude (23 x 23 cm; NUNC) i zagrijani 1 sat na 37°C. Otprilike 10 posuda se inkubira na 37°C točno 11 sati. Kolonije bakterija tada počinju biti vidljivima (0,5 mm u promjeru). Tada se napravi prva replika. Nylonski filteri, iste veličine, trebaju prethodno biti ovlaženi na Lamp pločama. Druga replika se napravi isto kao prva nakon što su primarni filteri inkubirani još 1-2 na 37°C. Treća replika se napravi s filterima namočenim na HMF-1 pločama, na kojima se i inkubiraju. Četvrta replika, također ovlažena na HMF-1 posudama, ne odvoji se od primarnih filtera, već se ostavi u tzv. "sendvič" položaju i smrzne na -70°C. Prve tri replike se inkubiraju na 37°C dok kolonije ne dosegnu 1 mm u promjeru. Prve dvije replike (20 filtera) se skinu s hranjivih podloga, bakterije se liziraju, DNK denaturira i veže za filter kako je

opisano u pogl. 6.2.6.3 . Te dvije replike se upotrebljavaju za pretraživanje knjižnice hibridizacijom s DNK ili RNK probama (6.2.8.2). Treće replike se premjeste na HMF 2 posude, inkubiraju 2 sata na sobnoj temperaturi te se sprema na -70°C nakon što se hermetički zatvore u plastične vrećice.

Treća replika služi za uzimanje kolonija koje se pronađu pretraživanjem knjižnice. Pozicija replika s obzirom na primarni filter mora se, u tu svrhu, dobro označiti kako bi se lakše mogla pronaći pozitivna kolonija. Često je nemoguće pokupiti jednu koloniju iz prvog puta te je neophodno pokupiti više kolonija s i oko područja koje nas zanima. Nakon razrijeđenja pokupljenih bakterija, ponovi se postupak pretraživanja dok pozitivna kolonija ne bude nedvojbeno identificirana. Ovako pripremljena knjižnica može biti 10-tak puta pretrežena, bez potrebe da se ponovi cijeli postupak stvaranja replika.

6.2.6.3 Pretraživanje kozmidske knjižnice

Prve dvije replike se skinu s hranjivih podloga te se stave 4 minute na 3 MM filter papir (Whatman) namočen s 10%-tnim SDS-om (kolonije gore). Zatim se replike moče po istom mehanizmu, 5 minuta u alkaličnoj (0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl) i 5 minuta u neutralizirajućoj otopini (0,5 M Tris/HCl [pH 8] i 1,5 M NaCl). Nadalje, replike se urone u neutralizirajući pufer 10-15 minuta, i rukom (s rukavicama) se odstrane kolonije s površine filtera upotrebljavajući papirnate maramice namočene u otopinu 2 x SSC, 0,1% SDS. Filteri se zatim operu 5 minuta u 2 x SSC, osuše na zraku i ispeku u vakuumu na 80°C 2 sata. Tako pripremljene replike hibridiziraju se s DNK ili RNK probama te nakon pranja,

rezultat se očita autoradiografijom.

6.2.7 Knjižnica gena komplementarne DNK (cDNK)

U radu se koristila metoda Goridisa i dr.⁴⁷

6.2.7.1 Pufferi i mediji potrebni za konstrukciju

- 5 x RT puffer: 0,25 M Tris/HCl (pH 8,3 na 42°C); 30 mM MgCl₂ i 200 mM KCl.
- 10 x S1 puffer: 0,5 M NaAc pH 4,5; 10 mM ZnCl₂; 2.5 M NaCl.
- Puffer za razrijeđivanje S1: 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 100 mM ZnCl₂.
- 10 x Tris/KAc pH 7,9: 330 mM Tris/CH₃COOH pH 7,9 (pH na 37°C); 660 mM KAc.
- 10 x puffer za ligaciju: 0,5 M Tris/HCl (pH 7,8 na 12°C); 50 mM MgCl₂; 200 mM DTT.
- 10 x Eco RI puffer: 1 M Tris pH 7,5; 0,5 M NaCl; 50 mM MgCl₂.
- Gornji (mekani) agar: 8,0g/1 tryptone; 5,0g/1 ekstrakta kvašćevih gljivica; 5,0g/1 NaCl; 7,5/1 agaroze.
- Hranjivi medij za rast Y1090 s agarozom: 8,0g/1 tryptone; 5,0g/1 ekstrakta kvašćevih gljivica; 15 g/1 agar; 50 µg/ml ampicilin, dodanog na 55°C.
- Xgal: 5-bromo-4-kloro-3-indolilbeta-D-galaktozid (2%) otopljen u dimetilformamidu (DMF; treba izbjegavati plastiku).
- IPTG: 10 mM izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozid.

6.2.7.2 Konstrukcija cDNK knjižnice u λ gt11 vektoru

Jedna od najvažnijih mjera opreza jest upotreba otopina, pipeta, posuda od stakla ili plastike u kojima nema enzima ribonukleaze (RNaza A), koja se, inače, često nalazi posvuda, jer je nosimo na koži. RNaza se inaktivira s 0,5% dietilpirokarbonatom (DEPC) i naknadnim autoklaviranjem ili dobrim ispiranjem s vodom, jer DEPC može dodatno uništiti i mRNK. Osim ove mjere, trebalo bi silikonizirati sve epruvete u kojima se vrše reakcije da se smanji adhezija RNK i DNK molekula za stijenke.

6.2.7.2.1 Sinteza prvog lanca cDNK

Za sintezu prvog lanca (uzvojnice) cDNK, po redu treba odpipetirati slijedeće (na ledu):

H₂O do 100 μ l konačnog volumena, 10 μ l 0,1 M DTT, 20 μ l 5 x RT pufera, 10 μ l RNAsin (150 J, Bio-Tec, 35 J/ μ l), 10 μ l oligo dT₁₂₋₁₈ (1 mg/ml)(P.L. Biochemicals), 6,25 μ l od svakog 8 mM dGTP, dATP, dTTP (konačna konc. 0,5 mM), 3,13 μ l 8 mM dCTP (konačna konc. 0,25 mM), 4 μ l (40 μ Ci) α^{32} P dCTP (3000 Ci/mmol), 10 μ l polyA⁺ RNK 1 mg/ml (vjerajlatno 50% polyA⁺). Nakon 10 minuta na 0°C, uzorak treba zagrijati na 42°C i nakon 2 minute dodati 72 jedinica (J) AMV reverzne transkriptaze (6 μ l Stehelin 12 J/ml). Inkubacija se produži još 60 minuta na 42°C. Reakcija se zaustavi kratkotrajnim grijanjem (3 minute) na 100°C i ostavi 5 minuta na 0°C. Uzorak se, tada, centrifugira (12 000 rpm, 2 minute na 4°C) i drži na ledu. Uzme se 5 μ l za analizu na alkalnom gelu (vidi 6.2.8.1).

6.2.7.2.2 Sinteza drugog lanca cDNK

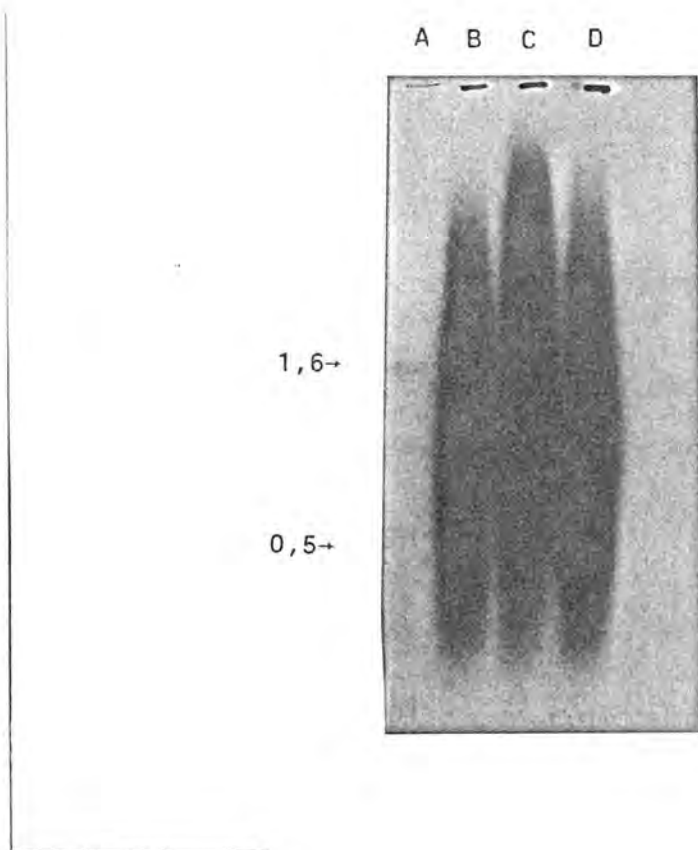
Za vrijeme sinteze prvog lanca cDNK pripremi se na ledu slijedeće:

H₂O do 400 μ l (uključujući i prvi lanac) konačnog volumena, 25 μ l od svakog 8 mM dATP; dGTP, dTTP (konačna konc. 0,5 mM), 12,5 μ l 8 mM dCTP (konačna konc. 0,25 mM), 4 μ l (40 μ Ci) α^{32} P dCTP (3000 Ci/mmol), 40 μ l 0,5 M HEPES-KOH pH 6,9 (konačna konc. 50 mM), 28 μ l 1,0 M KCl (konačna konc. oko 80 mM), 40 μ l 0,2 M MgCl₂ (konačna konc. oko 27,5 mM), 4 μ l 1 M DTT, 200 μ l BSA 1 mg/ml i preostalih 95 μ l od uzorka sa sintezom prvog lanca. Na kraju treba dodati još 125 jedinica DNK polimeraze I. Inkubira se preko noći na 12°C. Zatim se doda 20 μ l tRNA 1 mg/ml, 20 μ l 0,5 M EDTA i uzorak se ekstrahira s 440 μ l sevaga. Precipitacija s etanolom se izvrši dva puta u 2,5 M amonijevom acetatu (NH₄Ac). Talog se ispere nakon svake precipitacije tri puta s 100% etanolom. Talog se resuspendira u 95 μ l H₂O, čuva na -70°C, a 5 μ l se uzme za analizu na alkalnom gelu (vidi 6.2.8.1).

6.2.7.2.3 Razgradnja sa S1 nukleazom

Količina potrebne razgradnje sa S1 nukleazom ustanovi se titracijom upotrebljavajući 1/100 ili 1/50 uzorka. Reakcije s različitim količinama S1 nukleaze se zaustave s EDTA i analiziraju na 1,4% alkalnom agaroznom gelu (vidi 6.2.8.1), zajedno s dijelovima sačuvanih uzoraka od sinteze 1. i 2. lanca. Najpovoljnija količina potrebne S1 nukleaze odabere se tako da migracija S1 razgrađene cDNK bude jednaka migraciji sintetiziranih prvih lanaca cDNK (Slika 11). Zatim se u preostalih

90 μ l cDNK doda 10 μ l 10 x S1 pufera i odgovarajući broj μ l



Slika 11

Separacija cDNK lanaca na gelu. Uzorci cDNK (od BDFL1.1 mRNK) su radioaktivno obilježeni i nakon elektroforeze u 1,4%-tnom alkalnom agaroznom gelu autoradiografirani. A. Standardne velične fragmenata DNK lanaca u kb; B. Produkt sinteze prvog lanca cDNK; C. Produkt sinteze druge uzvojnice cDNK; D. cDNK nakon razgradnje sa S1 nukleazom.

razrijeđenja S1 nukleaze (70 jedinica, Stehelin) u puferu za razrijeđivanje S1.

Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, reakcija se zaustavi s 4 μ l 0,5 M EDTA i dva puta precipitira s etanolom u 2,5 M NH_4Ac . Talog se svaki puta ispere s 100% etanolom i resuspendira konačno u 65 μ l H_2O , od čega se 3 μ l provjeri na alkalnom gelu (Slika 11).

6.2.7.2.4 Reakcija s T4 DNK polimerazom (poliranje krajeva cDNK)

U preostalim 62 μ l cDNK doda se redom:

10 μ l 10 x Tris/KAc pH 7.9, 10 μ l 0.1 M MgAc, 1 μ l 50 mM DTT, 10 μ l 1 mg/ml BSA, 5 μ l 2 mM dTNP mješavina (pomiješaju se jednaki volumeni 8 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 2 μ l T4 DNA polimeraze I (oko 12 jedinica) i inkubira 20 min na 37°C. Reakcija se zaustavi s 4 μ l 0.5 M EDTA. Uzorak se ekstrahira s 110 μ l sevaga i precipitira dva puta s etanolom u 2,5 M NH_4Ac . Konačni talog se resuspendira u 15 μ l H_2O i čuva na -70°C.

6.2.7.2.5 Spajanje poveziavača s cDNK

EcoRI poveziavači (10-12 nukleotida dugi i fosforilirani) pomiješaju se s cDNK i ligiraju pod slijedećim uvjetima: 15 μ l cDNK (0,5-2 μ g), H_2O do konačnog volumena od 40 μ l, 4 μ l 10 x pufera za ligaciju, 2 μ l 10 mM ATP, 0,5-2 μ g poveziavača, 12 μ l 50% PEG (polietilenglikol 6000) i 2 μ l T4 DNK ligaze (oko 400 jedinica/ μ l). DNK se, zapravo, ligira u precipitiranom stanju (zbog 10% PEG-a) inkubacijom na 12°C preko noći. Nakon toga se uzorak odcentrifugira na 12 000 rpm 10 minuta na 4°C. Na talog

se direktno doda 80 μ l kloroforma (bez izoamilnog alkohola) te nakon centrifugacije na 12 000 rpm, 10 minuta na 4°C i odstranjivanja nadtaloga, cDNK (talog) se otopi u 22 μ l H₂O.

6.2.7.2.6 Razgradnja s EcoRI

U 22 μ l cDNK otpipetira se 3 μ l 10 x EcoRI pufera, 3 μ l 1 mg/ml BSA, 2 μ l EcoRI (20 jed./ μ l) i reakcija se inkubira 5 sati na 37°C. Nakon zaustavljanja reakcije s 1,2 μ l 0,5 M EDTA i dodatka 10 μ l TE pufera (pH 8) uzorak se kratko zagrije (5 min) na 65°C i ostavi na ledu do slijedećeg koraka.

6.2.7.2.7 Kromatografija na biogelu

Biogel A14m (50-100 mesh; BioRad) se ekvilibrira u TE puferu i kratkoj, sterilnoj i silikoniziranoj Pasteur pipeti začepljenoj sa silikoniziranom staklenom vunom. Nakon aplikacije uzorka, skupljaju se frakcije od 50 μ l. Frakcije se izmjere u brojaču β zračenja i skupe se one s najvišim (obično 4-5 frakcija).

6.2.7.2.8 Spajanje cDNK s λ gt11 vektorom

Uzme se oko 10 ng cDNK, pomiješa s 1 μ g CIAP-tretiranim, EcoRI presječenim λ gt11 (CIAP reakcija: vidi pogl 6.2.6.2.3) i precipitira s etanolom (u prisustvu 0,3 M NaAc, pH 5,2). Nakon pranja taloga u 70% etanolu, on se otopi u 5 μ l H₂O i ligira s T4 DNK ligazom u ligacijskom puferu (vidi 6.2.7.1) konačnog volumena od 10 μ l. Pakiranje spojenih cDNK dijelova i vektora vrši se kao što je opisano za kozmidske knjižnice gena (6.2.6.2.5).

6.2.7.2.9 Transdukcija pakirane rekombinantne cDNK

Bakterije *E. coli* Y1090 se pripreme tako da se od svježe pre-konočne kulture u L-mediju (ili YT mediju) uzme 2 ml i ubaci u 100 ml L-medija s 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina. Nakon što bakterije porastu, uz miješanje na 37°C, do apsorbancije od 0,6 (na 600 nm), 50 ml suspenzije bakterija se istaloži centrifugiranjem (2500 rpm, 10 min 4°C) i resuspendira u 20 ml 10 mM MgSO_4 te čuva na 4°C 2 do 7 dana. Knjižnica cDNK gena se titrira s 5 ili 10 μl suspenzije faga i 150 μl Y1090 stanica pripremljenih kako je prije opisano. Nakon inkubacije od 20 minuta na 37°C doda se 3 ml gornjeg, mekanog agara (prethodno rastopljenog i držanog 10 minuta na 48°C). Po želji, može se dodati indikator prisustva nerekombinantnih faga: 100 μl 2% X-gal u DMF-u i 50 μl 10 mM IPTG (vidi 6.2.7.1). Ovi spojevi stvaraju plavu boju u prisustvu enzima β -galaktozidaze. Budući da se mjesto kloniranja (EcoRI) u $\lambda\text{gt}11$ nalazi usred gena koji kodira dotični enzim, rekombinantni plakovi će biti bezbojni, jer neće imati β -galaktozidazu.

Mješavina se izlije na petrijevku posudu i ostavi da se stvrdne. Posude se inkubiraju 9-12 sati u izvrnutom položaju na 37°C. Prisustvo plavih plakova ne bi trebalo biti veće od 10%. Nakon titracije, za reprezentativnu knjižnicu cDNK, trebalo bi rasprostrti od $2-6 \times 10^5$ rekombinantnih faga na 2 do 6 velikih kvadratnih posuda (23 x 23 cm, NUNC) s L-amp medijem.

6.2.7.3 Pretraživanje cDNK knjižnice

Velike kvadratne posude s rekombinantnim fazima se prvo stave na 4°C 2 ili više sati, da se pri pravljenju replika ne odstrani sloj mekane agaroze. Nylonski ili nitrocelulozni filteri odgovarajuće veličine stave se na površinu agaroze s plakovima i

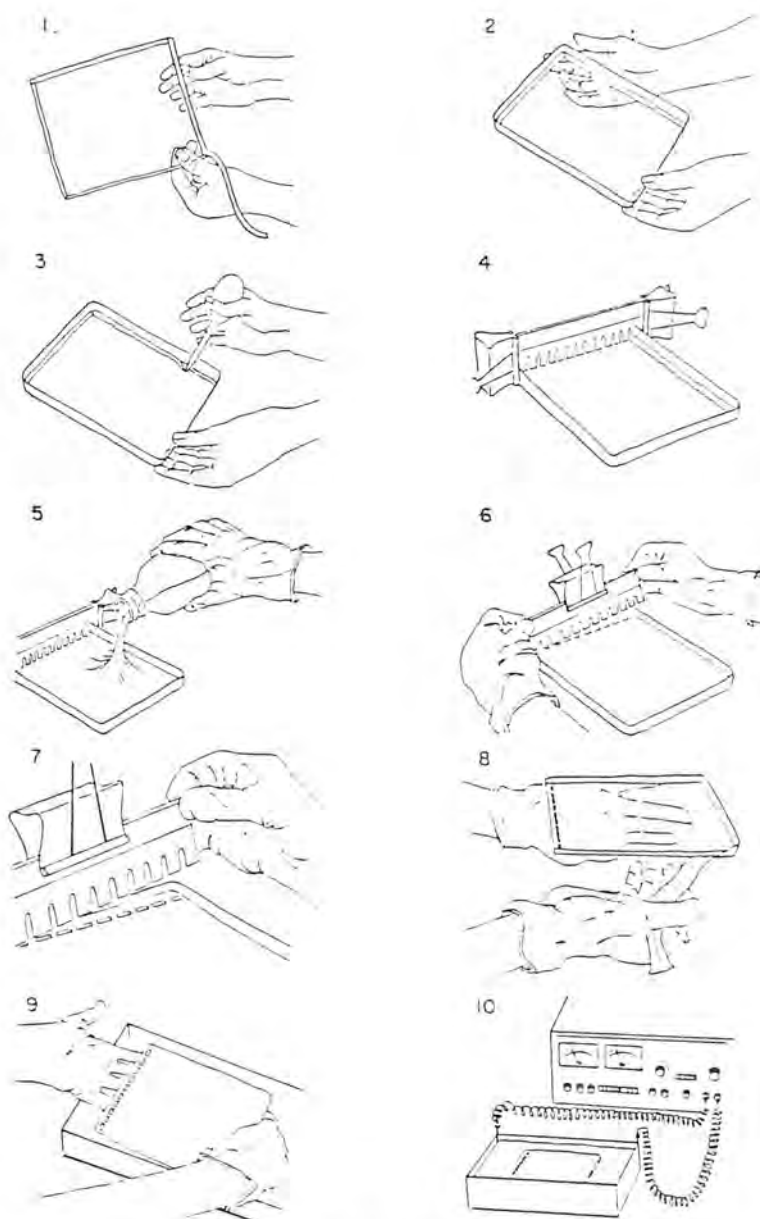
ostave minutu, dvije. Nakon toga, nitrocelulozni filteri se tretiraju isto kao što je opisano u poglavlju o pretraživanju kozmičke knjižnice, a nylonski na slijedeći način: filteri se namoče (s strane koja nije doticala plakove) u 0,5 M NaOH, 2 minute i zatim neutraliziraju u 1 M Tris/HCl (pH 7,5). Nakon ponavljanja zadnja dva koraka, filteri se osuše na zraku (nije potrebno peći na 80°C u vakuumu). Ovako pripremljene replike mogu se hibridizirati s DNK, RNK ili oligonukleotidnim probama kako je opisano u poglavljima 6.2.8.2 i 6.2.8.4.

6.2.8 Analiza DNK i RNK

6.2.8.1 Agarozna gel elektroforeza

Genomska ili klonirana DNK se razgradi s odgovarajućim restriksijskim enzimom te se elektroforetski razvuče u agaroznom gelu (obično 0,6%-tnom u 40 mM Tris-acetatu, 1 mM EDTA; 2,5 V/cm, 16 sati). Postupak pravljenja agaroznog gela prikazan je na slici 12. Kraći fragmenti mogu se u separirati na većoj voltaži i kraće.

Alkalna gel elektroforeza se upotrebljava u analizi veličine prvog i drugog lanca cDNK sintetizirane s reverznom transkriptazom. Gel se prvo napravi u neutralnoj otopini (50 mM NaCl, 1 mM EDTA) i kasnije ekvilibrira u radnom puferu (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) najmanje 30 minuta prije punjenja gela. Za alkalne gelove mogu se upotrijebiti voltaže do 7,5 V/cm.



Slika 12

Metoda pravljenja agaroznog gela⁹².

Puferi za punjenje gela sastoje se slijedećeg:

10 x pufer za agarozne gelove: 0,25% bromofenol plavilo;
0,25% ksilen cijanol i 25% Ficoll 400 (Pharmacia) u H₂O.

10 x pufer za punjenje alkalnog agaroznog gela: 0,5 M NaOH;
10 mM EDTA; 25% Ficoll 400 i 0,25% bromokrezol zelenila.

6.2.8.2 Analiza DNK specifičnim probama

U radu se upotrebljavala modificirana metoda prema Southernu⁹². Po završenoj elektroforezi gel se eksponira ultraljubičastom svjetlu (254 nm) 10 minuta i prebaci u posudu koja sadržava 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl. Nakon 20 minuta, gel se prebaci u neutralizirajući pufer (0,5 M Tris-HCl [pH 8]; 1,5 M NaCl) i ostavi također 20-30 minuta. DNK se prebaci na najlonski ili nitrocelulozni filter tako da se gel "blotira" uz pomoć 20 x SSC otopine (3 M NaCl, 0,3 M Na citrat, pH 7) (vidi Sliku 7). Nakon 12-16 sati filter se peče dva sata na 80°C u vakuumu, kako bi se DNK vezala za filter.

Specifične DNK probe su obilježene radioaktivnim ³²P pomoću tzv. "oligo-obilježavajuće" metode³⁷. U osnovi, proba se sintetizira na kalupu DNK pomoću velikog fragmenta DNK polimeraze I (Klenow fragment) i nasumce sintetiziranih oligonukleotida kao "primera".

Prvo se dio DNK, koji želimo obilježiti, odvoji od vektora (da se izbjegne unakrsna hibridizacija s sekvencama homolognim vektorskim). Dijelovi DNK se separiraju na agaroznom gelu niske temperature geliranja (BioRad No. 162-0017). Željeni fragment isječemo iz gela, promatrajući ga pod ultraljubičastim svjetlom od 360 nm. Izvađeni blok agaroze se otopi 5 minuta na 100°C i doda trostruki volumen H₂O. Ovako se pripremljena proba čuva na -20°C. Za obilježavanje s radioaktivnim ili drugim nukleotidima, proba se kratkotrajno otopi na 100°C i ostavi 10 minuta na 37°C. Od tako ohlađene probe uzme se 1 do 32 μl za obilježavanje. Reakcija sadrži, dalje, H₂O do konačnog volumena od 50 μl, 10 μl

OLB pufera; 2 μ l BSA (10 mg/ml); 5 μ l (32 P) dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham) i 2 jedinice Klenow fragmenta DNK polimeraze I. Sinteza dosiže platô za 2-3 sata (30-50 ng DNK), 5 sati (10-30 ng) ili preko noći (10 i manje ng) na sobnoj temperaturi. Reakcije se pročiste gel filtracijom na G-50 Sephadex-u (Pharmacia) da se odvoje od neinkorporiranog dCTP-a.

OLB je sastavljen od slijedećeg:

Otopina O: 1,25 M Tris/HCl; 0,125 M MgCl₂ (pH 8); čuva sa na 4°C.

Otopina A: 1 ml otopina = O + 18 μ l 2-merkaptetoetanol + 5 μ l dATP, 5 μ l dTTP, 5 μ l dGTP (svaki od njih prethodno otopljen u 0,3 x TE, pH 7 pri koncentraciji od 0,1 M). Čuva se na -20°C.

Otopina B: 2 M HEPES, titriran s 4 M NaOH na pH 6,6. Čuva se na 4°C.

Otopina C: Heksadezoksiribonukleotidi (P-L Biochemicals, No. 2166) ravnomjerno suspendirani (ne otapaju se kompletno) u 0,3 x TE, pH 7 u koncentraciji od 90 O.D. (optička gustoća; apsorbanca) jedinica po ml. Čuva se na -20°C.

Da se dobije OLB treba pomiješati otopine A:B:C u odnosu 100:250:150. Čuva se na -20°C.

Filter s prenesenom DNK se hibridizira s radioaktivno obilježenom probom, tako da se inkubira na 42°C u 50% formamidu, 1 M NaCl, 5 x Denhardtova otopina (50 x Denhardt: 5 g BSA [Frakcija V]; 5 g polivinilpirolidon [K96; Fluka] i 5 g Fikola u 0,5 l H₂O), 10% dextran sulfat, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Na pirofosfat, 0,1% SDS, 150 μ g/ml denaturirane DNK od sperme lososa s 2×10^5 - 10^6 cpm/ml od radioaktivno obilježene probe. Nakon

12-24 sata hibridizacije filter se opere dva puta u 3 x SSC, 0,1% SDS i zatim još dva puta u 0,3 x SSC, 0,1% SDS na 68°C po 15 minuta.

Oligonukleotidi se najčešće obilježavaju ubacivanjem radioaktivne fosforne grupe na 5' kraj. U tipičnoj reakciji, uzme se oko 100 ng oligonukleotida, te se fosforilira s T4 kinazom. Prvo se uzme DNK, nadopuni vodom do 40 μ l konačnog volumena, i zatim se doda 4 μ l 10 x pufera za kinazu, 25 μ l γ 32 P ATP (5000 Ci/mmol; Amersham) i 2 μ l T4 kinaze. Reakcija se inkubira 30 minuta na 37°C. Nakon toga, doda se 10 μ g tRNK, kao nosača i proba se dva puta precipitira s etanolom u prisustvu 2,5 M NH_4Ac . Talog se resuspendira u TE puferu, i čuva na -20°C. 10 x pufer za kinazu se sastoji od 0,7 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M MgCl_2 i 50 mM DTT. Pri hibridizaciji s oligonukleotidnim probama (33 nt) korišten je sličan postupak. Razlike od prethodno opisane hibridizacije su u hibridizacijskoj mješavini: 20% formamida, 5 x SSC, 0,1% SDS, 5 x Denhardtova otopina, 10% dextran sulfat, 50 mM natrijev pirofosfat, 100 M ATP, 50 μ g/ml *Echerichia coli* DNK i 50 μ g/ml poly(A), te u načinu pranja filtera: 6 x SSC, 0,1% SDS dva puta na 42°C po dvadeset minuta.

6.2.8.3 Sekvenciranje DNK

U radu se koristila metoda kemijske degradacije^{40, 96} i metoda završavanja lanaca didezoksinukleotidima¹²⁰.

6.2.8.3.1 Metoda kemijske degradacije

Potrebne reagencije:

- Dimetilsulfat (DMS)

- Hidrazin (Hz)
- Mravlja kiselina
- Piperidin (10 M; treba razrijediti na 1 M neposredno prije upotrebe)
- 95% Etanol
- 80% Etanol
- 1 M Octena kiselina
- 0,3 M Natrijev acetat (NaAc) (pH 5,2;7)
- 5 M NaCl
- 1,2 M NaOH
- 1 mM EDTA
- tRNK (1 mg/ml u H₂O)

Puferi:

- DMS pufer: 50 mM natrijev kakodilat (pH 8); 1 mM EDTA (obično je nepotrebno pH-metrirati).
- DMS stop: 1,5 M natrijev acetat (pH 7); 1 M merkaptoetanol; 100 µg/ml tRNK.
- Hz stop: 0,3 M natrijev acetat; 0,1 mM EDTA; 25 µg/ml tRNK.
- Za punjenje gela: 80% (v/v) deionizirani i rekristalizirani formamid; 50 mM Tris-borat (pH 8,3); 1 mM EDTA; 0,1% bromofenol plavilo; 0,1% ksilen cijanol.

Sekvencioni gelovi:

- 20% Akrilamid: 96,5 g akrilamida; 3,35 g metilen-bis-akrilamida; 233,5 g ultra čiste uree; 100 ml 5 x TBE i H₂O do 500 ml.
- Urea mješavina: 233,5 g uree; 100 ml 5 x TBE i H₂O do 500 ml.
- 5 x TBE: 54 g Tris baze; 27,5 g borne kiseline; 20 ml 0,5 M

EDTA (pH 8) i H₂O do 1 l.

- 8% sekvencioni gel: 20 ml 20% akrilamida; 30 ml mješavine uree i 0,4 ml 10% amonijevog persulfata (svježe otopljenog u vodi). Prije izlivanja u stakleni oklop (0,2-0,4 mm širok) doda se 50 μl TEMED-a.

Obilježavanje krajeva DNK fragmenata:

5' krajevi DNK obilježe se s γ -³²P ATP i T4 DNK polinukleotidnom kinazom (vidi 6.2.6.2.3). 3' krajevi se mogu obilježiti jedino ako su recesivni (tj. 5' krajevi komplementarne uzvojnice su dulji za 2-4 baze, kao posljedica presijecanja restriksijskim enzimom). Uz pomoć DNK polimeraze I (ili Klenow fragmenta) može se dodati jedan komplementarni nukleotid koji je obilježen s ³²P. Obilježeni dijelovi DNK moraju se, tada, presjeći s drugim restriksijskim enzimom da se dobiju fragmenti obilježeni samo na jednom kraju). Oni se zatim mogu izolirati na preparativnom gelu (2-8% akrilamidni gel bez uree). Komadići gela se zdrobe i DNK se eluira inkubacijom na 37°C u 2,5 M NH₄Ac 3-5 sati. Ostaci gela se odstrane filtracijom kroz staklenu vunu. DNK se precipitira etanolom i talog otopi u H₂O.

Reakcije modificiranja baza:

G specifična reakcija: na ledu se doda redom 5 μl ³²P DNK; 2 μl (2 μg) denaturirane DNK od sperme lososa (nosač) i 200 μl DMS pufera. Reakcija započne dodatkom 2 μl DMS-a i inkubira se 1 minutu na ledu. Zatim se doda 50 μl DMS stop pufera (hladnog) i odmah zatim 750 μl etanola (prethodno ohlađenog na -20°C). Precipitirani uzorak se ostavi 1 sat na -70°C i

zatim se uzorak centrifugira 15 min na 12 000 rpm (8000 g).

G + A: na ledu se doda redom u epruvetu 10 μ l 32 P DNK, 2 μ l nosača i 25 μ l 80% mravlje kiseline. Inkubira se 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 200 μ l Hz stop pufera i 750 μ l etanola i precipitira kao što je opisano za G reakciju.

T + C: na ledu se doda 10 μ l 32 P DNK, 2 μ l nosača, 10 μ l H₂O i 30 μ l hladnog hidrazina. Nakon 3 minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, doda se 200 μ l Hz stopa i precipitira kao što je opisano za G reakciju.

C: isto kao za T + C jedino što se uzme samo 5 μ l 32 P DNK i 15 μ l 5 M NaCl mjesto 10 μ l H₂O.

Reakcije prekidanja DNK:

Metoda je zajednička za sve dosada specifične reakcije. Talozima se, nakon precipitacije, isperu dva puta s 1 ml 80%-tnog etanola. Talozima se zatim otope u 50 μ l 1 M piperidina i inkubiraju 30 minuta na 90°C u dobro začepljenim epruvetama. Zatim se doda 50 μ l 0,3 M NaAc (pH 7) i 300 μ l etanola. Nakon jednog sata na -70°C, uzorci se odcentrifugiraju 15 min na 12 000 rpm i 4°C. Talozima se isperu jednom u 1,5 ml 100% etanola (ohladenog na -20°C). Svaki talog se otopi u puferu za punjenje gela (3-5 μ l za jedno punjenje). Prije elektroforeze, uzorci se moraju 2 minute zagrijati na 100°C i držati na ledu dok se ne nanese na gel. Obično je potrebno 2 do 3 punjenja za sekvenciranje 250 do 300 bp. Elektroforeza se vrši na 75 V/cm, dok ksilen cijanol ne dođe do kraja gela (zeleni marker). Gel se napuni po drugi put i elektroforeza se nastavi dok bromofenol plavilo

(koje u 8% gelu migrira paralelno s 20 nukleotida dugom DNK) ne dođe do ruba. Za sekvenciranje prvih 25 nukleotida upotrebljava se 20% poliakrilamidni gel.

6.2.8.3.2 Metoda završavanja lanaca DNK didezoksinukleotidima

Reagencije potrebne za kloniranje:

- L medij.
- L agar: L mediji s 1,5 % agarom.
- Mekani (gornji) agar: l medij s 0,6%-tnom agarom.
- Otopina za pripremu kompetentnih stanica A: 10 mM NaCl; 50 mM MnCl₂ i 10 mM NaAc (pH 5,6).
- Otopina za pripremu kompetentnih stanica B: 75 mM CaCl₂; 100 mM MnCl₂ i 10 mM NaAc (pH 5,6).
- Minimalni agar: Prvo se pripremi otopina M9 soli u 500 ml H₂O (6 g Na₂HPO₄; 3 g KH₂PO₄; 0,5 g NaCl; 1 g NH₄Cl) i otopina agara (15 g u 500 ml H₂O). Nakon autoklaviranja, otopine se pomiješaju, ohlade na 55°C i doda se 1 ml 1 M MgSO₄; 1 ml 0,1 M CaCl₂; 1 ml 1 M Tiamin-HCl i 5 ml 40% glukoze.

Reagencije potrebne za sekvenciranje:

- gelovi su isti kao u (6.2.8.3.1).
- 10 x sekvencioni pufer: 0,5 M NaCl; 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl₂ i 0,01 M dithiothreitol (DTT).
- dNTP pratnja: 0,25 mM dATP; dCTP; dGTP i dTTP.
- Stop otopina: deionizirani formamid s 0,3%-tnim ksilen cijanolom; 0,3% bromofenol plavilom i 0,37% EDTA (pH 7).
- A mješavina: 60 μM ddATP; 1,7 μM dATP; 30 μM (dCTP, dGTP i dTTP); 50 μM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) i 1

mM DTT.

- C mješavina: 150 μ M ddCTP; 1,7 μ M dATP; 4,2 μ M dCTP; 40 μ M dGTP; 40 μ M dTTP; 50 μ M NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM DTT.
- G mješavina: 150 μ M ddGTP; 1,7 μ M dATP; 40 μ M dCTP; 4,2 μ M dGTP; 40 μ M dTTP; 50 μ M NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) i 1 mM DTT.
- T mješavina: 150 μ M ddTTP; 1,7 μ M dATP; 40 μ M dCTP; 40 μ M dGTP; 1,7 μ M dTTP; 50 mm NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) i 1 mM DTT.

Kloniranje u M13 vektor:

Prvi korak u sekvenciranju DNK je kloniranje DNK u M13. DNK mora imati krajeve koji se mogu ligirati u vektor. Duljina DNK koje se želi klonirati treba biti relativno kratka (0,3 do 1-2 kb).

Kompetentne stanice *E. coli* K12 JM 109 se prvo moraju uzgojiti na agarnim pločama s minimalnim medijem. Od jedne kolonije napravi se prekonoćna kultura. Uzme se 0,5 ml iz nje i inokulira u 100 ml L medija. Nakon što bakterije narastu do optičke gustoće od 0,2-0,3 na 550 nm, one se ohlade na ledu, odcentrifugiraju (6000 rpm 10 minuta na 4°C) i resuspendiraju u 20 ml otopine A. Nakon inkubacije od 20 minuta na ledu, ponovi se prethodni postupak i bakterije se resuspendiraju u 2 ml otopine B.

Nakon što se spoje vektor i DNK koju želimo sekvencirati (vidi 6.2.7.2.9) uzme se 100 μ l kompetentnih bakterija i pomiješa s 3 μ l ligirane mješavine. Nakon 30 minutne inkubacije na ledu, napravi se nagla promjena temperature

inkubacije. Uzorak se stavi 2 minute na 37°C i odmah zatim pomiješa s 0,2 ml prekonoćne kulture JM 109 stanice. U mješavinu se doda 3 ml mekanog agara s indikatorom rekombinantnih klonova (X gal i IPTG; vidi 6.2.7.2.9). Uzorak se izlije na Lamp agar ploču i inkubira preko noći na 37°C. Pozitivni (bezbojni) plakovi (dobro izolirani od susjednih) se uzmu sa čačkalicom i inokuliraju u 2 ml L medija s 10 µl prekonoćne kulture JM 109. Po završenoj 8 satnoj inkubaciji na 37°C, bakterije se odcentrifugiraju, a nadtalog se prebaci u epruvetu s 200 µl 2,5 M NaCl i 20%-tnog PEG- α 6000. Nakon inkubacije od 30 minuta na ledu, precipitirani fazi se odcentrifugiraju (12 000 rpm, 10 minuta na 4°C). Talog se resuspendira u 100 µl 1 x TE pufera i ekstrahira s 50 µl fenola. U vodenu fazu doda se 10 µl 3 M NaAc (pH 6) i 200 µl etanola. Nakon precipitacije (1 sat na -70°C) DNK faga se odcentrifugira (12 000 rpm, 15 minuta na 4°C) i otopi u 20-50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) i 0,1 mM EDTA. Ovakav DNK kalup se čuva na -20°C. Minimalna koncentracija DNK trebala bi biti oko 0,05 µg/µl (što se može provjeriti agaroznim gelom).

Sekvenciranje:

Prva reakcija se sastoji od priljublivanja komplementarnog primera za M13 kalup. U tu svrhu, otpipetira se 3 µl H₂O, 1 µl 10 x sekvencionog pufera, 5 µl DNK i 1 µl primera (specifični 17 ili 20 nt dugi oligonukleotidi, bilo kupovni ili sintetizirani na temelju poznate sekvence). Reakcija se inkubira na 56°C 1 sat. Zatim, doda se 2 µl ³²P dATP (3000 Ci/mmol, 1 µl 33 µM dATP i 1,5 µl (1,5 jedinica) Klenow

fragmenta. Od toga se uzme 2 μ l za svaku od 4 reakcija koje sadrže još 3 μ l A, C, G ili T mješavine. Uzorci se inkubiraju 15 minuta na 30°C. Zatim se u sve 4 reakcije doda po 1 μ l dNTP pratnje i 0,25 μ l Klenow fragmenta (0,25 jedinica). Inkubacija se produži za narednih 15 minuta i zatim se doda 5-10 μ l stop otopine. Uzorci se, prije punjenja gela, zagriju na 95-100°C. Elektroforeza se vrši kao što je opisano u 6.2.8.3.1.

6.2.8.4 Analiza RNK; zaštita od RNaze

Poli(A)⁺RNK se analizira slično kao DNK po metodi koja se nazvala Northern-blot⁹². Ukratko, mRNK se elektroforezom razvuče u 1% agaroznom gelu koji sadrži 20 mM MOPS (morfolino-propan sulfonska kiselina), 5 mM natrijev acetat (pH 7), 1 mM EDTA i 1,2 M formaldehid. RNK se prvo otopi u puferu za punjenje gela koji uz navedene sastojke još posjeduje 50% formamida, 3% fikola 400 i 0,1% bromofenol plavila. RNK (2-6 μ g) se zagrije 5 minuta na 60°C prije punjenja gela. Elektroforeza se vrši 3-5 sati pri 8-10 V/cm. Nakon elektroforeze gel se ostavi u destiliranoj vodi dva puta po 15 minuta, da se izvuče formaldehid, jer on inhibira prijenos RNK. Konačno, gel se stavi u 20 x SSC 15 minuta i izvrši prijenos, kako je opisano u 6.2.8.2.

Hibridizacija i pranje filtera s vrši isto kao pri analizi DNK.

Zaštita od RNaze, ili mapiranje RNazom¹⁵¹: hibridizacijska RNK proba sintetizira se na kalupu DNK sa SP6 polimerazom, prema uputama u komercijalnom "kitu" za in vitro sintezu RNK

(Amersham). Za sintezu, prvo se uzme 4 μ l 5 x transkripcijskog pufera (5 x T; 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 30 mM MgCl₂; 50 mM DTT i 10 mM spermidin), zajedno s 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l HPRI (humani placentalni ribonukleazni inhibitor; 20 jedinica), 1,5 μ l (-UTP) mješavine (sadrži 7 mM ATP, TTP i GTP), 10 μ l α ³²P UTP (>400 Ci/mmol), 1,5 μ l (1-2 μ g) linearizirane DNK s SP6 promoterom i na kraju 1 μ l (10 jedinica) enzime SP6 RNK polimeraze. Uzorak se tada inkubira 3 do 5 sati na 37°C. Zatim se doda DNaza I (10 jedinica) i produži inkubacija za narednih 10 minuta kako bi se razgradio komplementarni kalup. Proba se zatim dva puta precipitira s etanolom u prisustvu 2,5 M NH₄Ac. Talog se otopi u 100 μ l TE pufera i izmjeri količna radioaktivnosti. 1-2 x 10⁶ cpm probe se pomiješa s 0,5-1 μ g poli(A)⁺RNK (ili 20-50 μ g totalne RNK) u 30 μ l pufera (80% formamida, 40 mM PIPES [pH 6,4], 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) zagrije 10 minuta na 85°C i inkubira više od 8 sati na 45°C. Doda se 350 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 300 mM NaCl i 40 μ g/ml RNaze A i 2 μ g/ml RNaze T₁ i inkubira 30 minuta na 30°C, zatim se doda 50 μ g proteinaze K i 10 μ l 20% SDS i ostavi 15 minuta na 37°C. Nakon fenolne ekstrakcije i precipitacije etanolom (s 10 μ g tRNK kao nosačem) pripravak se otopi u 90%-tnom formamidu i 0,1% bromofenol plavilu, denaturira 2 minute na 100°C i frakcionira na 6% poliakrilamid/urea gelu za sekvenciranje DNK (30 V/cm).

6.2.9 Prijenos kloniranih gena u T stanice

U radu se koristila metoda fuzije bakterijskih protoplasta

s eukariotskim stanicama^{97, 108}. Geni su supklonirani u vektor (pTCF) koji posjeduje gen za rezistenciju prema antibioticima, kanamicinu, neomicinu i G-418⁵².

Nakon transformacije E. coli K12 soja ED8767 s kozmidskim klonom od interesa, napravi se prekonoćna kultura u 100 ml L medija s 50 µg/ml ampicilina i 3 µg/ml kanamicina. Protoplasti, koji sadrže kozmidske klonove, se pripreme tako da se prvo bakterije resuspendiraju (nakon centrifugiranja na 6000 rpm, 10 minuta na 4°C) i 10 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8) i 20% saharoze. Nakon ponovnog taloženja pod istim uvjetima kao prije, bakterije se resuspendiraju u 2,5 ml Tris/saharoznog pufera. Zatim se doda 0,5 ml lizozima (1 mg/ml, otopljenog u 0,25 M Tris/HCl pH 8) i inkubira 5 minuta na ledu. Djelomična razgradnja bakterijskog zida zaustavi se s 1 ml 0,25 M EDTA (pH 8). Nakon pet minutne inkubacije na ledu, u uzorak se doda polako (kap po kap) 1 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8) i inkubira 30 minuta na 37°C. Stvaranje protoplasta se može pratiti pomoću mikroskopa s faznim kontrastom. (Bakterije se prepoznaju jer tvore lance. Nakon razgradnje s lizozimom oni nestaju.) Nakon toga se polako doda 10 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) + 10% saharoze + 12,5 mM MgCl₂ (fuzioni pufer). Zatim se doda 0,1 ml 1 mg/ml DNaze I i inkubira 15-20 minuta na sobnoj temperaturi.

Fuzija protoplasta se vrši tako da se uzme 2 ml od dobivene suspenzije i odcentrifugira 30 minute na 3000 rpm pri 4°C. Natalog se odbaci, a na talog se dodaju eukariotske (T hibridomi, u ovom radu) stanice (30-50 x 10⁶ za T limfocite). Stanice trebaju biti u mediju bez seruma. Suspenzija se

odcentrifugira na 1200 rpm. 5 minuta. Nadtalog se odlije i u talog se polako doda 0,7 ml (zagrijanog na 37°C) PEG-DMSO mješavine (vidi kasnije). Odmah nakon toga doda se 0,7 ml druge PEG mješavine. Uzorak se zatim polako razrijedi s 25 ml DMEM-a. Stanice se istalože (1200 rpm, 5 minuta) i talog resuspendira u IMDM-u (Iscove's modified Dulbecco's medium) s kanamicinom (0,1 mg/ml). Stanice se rasporede u ploče za kulturu stanica i inkubiraju na 37°C tri do pet tjedana, odnosno do pojave transformiranih klonova eukariotskih stanica. Od trećeg dana po transfekciji (fuziji), dodaje se antibiotik G418 (1 mg/ml, konačna konc.) u hranjivi medij koji se mijenja 2 puta tjedno. (SPH hibridom luči IL-2 spontano, te se zbog toga nije dodavao.) Za kulture stanica, upotrebljavan je Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Gibco) s 1% α -tioglicerolom (Sigma), penicilinom i streptomycinom (100 mg/l) (KC Biologicals), HEPES puferom (10 mM) i 10%-tnim serumom iz telećeg fetusa (Boehringer).

Za skupljanje adherentnih stanica upotrebljavan je medij bez Ca^{++} - Mg^{++} :

Za 5 l medija treba uzeti:

41,0 g NaCl

1,09 g KCl

14,43 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

1,0 g KH_2PO_4

1,45 g EDTA

15 ml 0,5% fenol crvenila i vode do 5000 ml.

Kratice znače:

PEG-DMSO: 0,85 g PEG 1500

1 ml DMEM

0,2 ml DMSO (dimetilsulfoksid) (čuva se na -20°C)

PEG mješavina: 1 g PEG 1500

1 ml DMEM

6.2.10 Testiranje citotoksične aktivnosti limfocita T

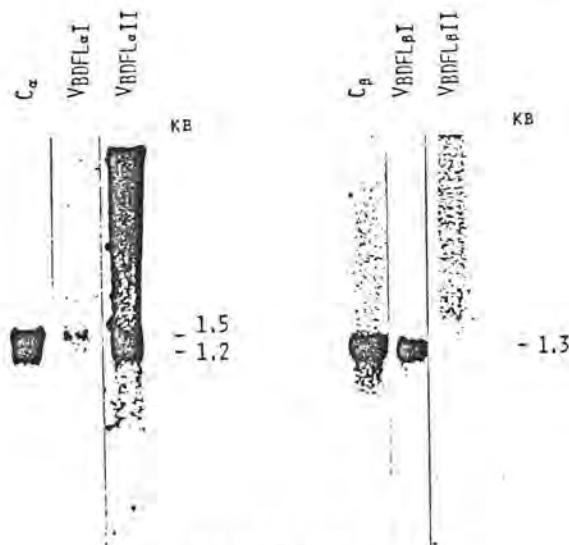
Specifično citolitičko djelovanje T limfocita se određivalo na limfoblastima ili L fibroblastima. Za dobivanje ciljnih stanica, stanice iz mišje slezene su kultivirane u IMDM mediju ($10^6/\text{ml}$) s $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (lipopolisaharid, E.coli 0.55:B5, Difco Lab., Detroit). Nakon 2 dana, limfoblasti su izolirani centrifugiranjem preko Ficol-Urovison-a ($\rho = 1,077\ \text{g}/\text{cm}^3$). L stanice kultivirane su IMDM mediju. Ciljne stanice su vezane s haptenom SP tako da se 5×10^6 do 20×10^6 limfoblasta ili L stanica ostavi u boratnom puferu (pH 8,4) koji sadržava 50 mM SP, 20 minuta na 4°C . Za vezanje s FL, stanice se inkubiraju u boratnom puferu (pH 8,7) s 2,5 mM FL 15 minuta na 37°C .

Za test citotoksične limfolize, klonovi citoksičnih T limfocita su pokupljeni, nakon inkubacije u mediju bez Ca^{++} i Mg^{++} (5 minuta) i resuspendirani u IMDM mediju u koncentraciji od $1-2 \times 10^6$ stanica/ml. Nakon obilježavanja ciljnih stanica s ^{51}Cr , one su pomiješane s citotoksičnim limfocitima i specifično otpuštanje ^{51}Cr izmjereno je nakon 3 do 5 satnog testa⁵⁶.

7. REZULTATI

7.1 Izolacija alela α i β lanaca

Citotoksični klon limfocita T BDFL 1.1.3 (BDFL) koji je izoliran iz (C57BL/6 x DBA/2) F_1 miša je specifičan za haptens fluorescein (FL) i MHC antigen I razreda D^d. Od DNK i RNK stanica BDFL napravljene su genomska i knjižnica gena komplementarne DNK (cDNK, od engl. complementary DNA) upotrebljavajući kozmid pNNL i λ gt11 vektore. Iz cDNK knjižnice izolirana su dva klona α lanaca i četiri klona β lanaca pomoću proba specifičnih za konstante dijelove gena (opisane u ref. 33,128). DNK sekvenca cDNK α i β lanaca pokazala je da oba α i svi β klonovi potječu od jednog, vjerojatno, funkcionalnog alela za α i β lanac. Northern blot analiza poli(A)⁺RNK od BDFL, s probama za konstantu regiju α i β lanca, je pokazala α mRNK (od engl. messenger RNA) dugačku 1,5 kb i 1,2 kb, i 1,3 kb dugu β mRNK (slika 13). Klonovi cDNK



Slika 13

(Opis slike na sljedećoj strani)

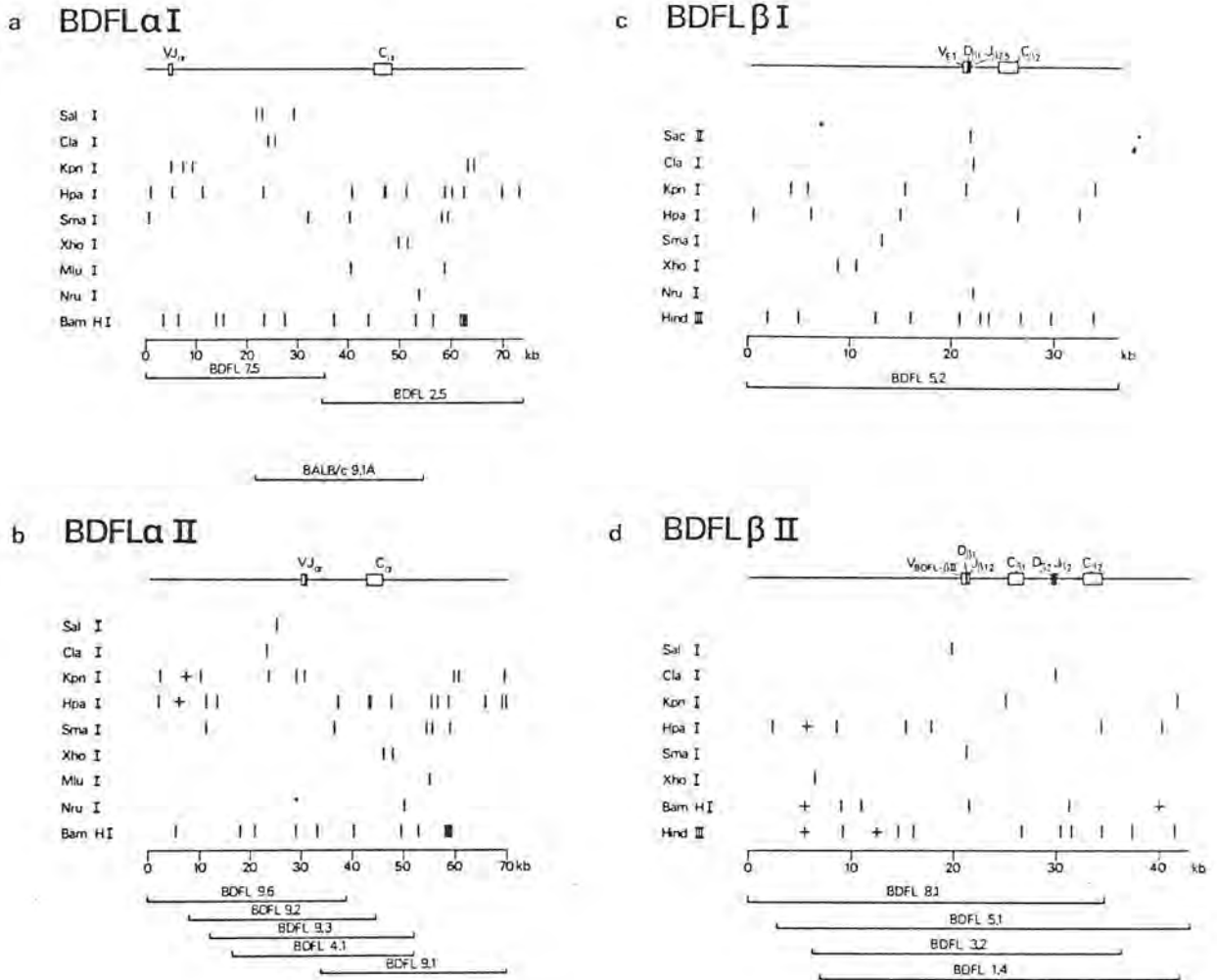
(Opis slike 13)

Nothern blot analiza gena receptora klona citotoksičnih T limfocita BDFL. Poli(A)+RNK je elektroforetski razdvojena u 1%-tnom formaldehidnom gelu, prenesena na nitrocelulozni filter i hibridizirana s označenim probama (vidi metode). C_α proba je identična probi 2 opisanoj u ref. 33. VBDFL α I proba je RsaI-EcoRI fragment cDNK klona α lanca pTBD1.9, izoliranog iz knjižnice gena napravljene od BDFL mRNA. Ta proba sadrži 200 bp V regije BDFL α I gena i 25 bp konstantne regije (C_α). VBDFL α I proba je 4 kb BamHI fragment koji sadrži V-JBDFL α II exon, a izolirana je iz kozmidskog klona BDFL9.3 (vidi sliku 14). C_β proba je 300 bp duga cDNK β lanca, izolirana iz klona 4.4 i opisana u ref. 69. VBDFL β I proba je 200 bp EcoRI-PstI fragment od cDNK β lanca izolirane iz cDNK knjižnice gena od BDFL. VBDFL β II proba je 1,2 kb Sali-BamHI fragment od kozmidskog klona BDFL3.2 (vidi sliku 14). Relativna molekularna masa RNK je određena pomoću DNK standarda. Blot dobiven s VBDFL α II probom je eksponiran dulje vrijeme da bi se bolje prikazala crta 1,2 kb prijepisa α gena.

α lanca odgovaraju većem prijepisu, što je pokazano hibridizacijom sa specifičnom probom za V regiju VBDFL α I.

Kozmidski klonovi su izolirani iz genomske knjižnice gena upotrebom probe za konstantne regije α i β lanca probe za varijabilni dio α lanca VBDFL α I. VBDFL α I proba detektira jedan V genetski segment u embrionalnoj DNK (nije prikazano). Pomoću

preklapajućih restrikcijskih mapa ovi kozmidi su poredani u 4 grupe koje definiraju alele α i β lanaca BDFL (slika 14). Uspoređujući mape kloniranih gena s embrionalim^{8,9,14,6} otkriveno je da su sva 4 alela bila podvrgnuta preuređenju DNK.



Slika 14

Molekularne mape preuređenih alela α i β lanaca receptora T stanica iz BDFL. Pravokutnici označavaju mjesto i otprilike veličinu V i C genetskih segmenata; njihovi položaji su određeni sekvenciranjem (vidi

(Nastavak opisa na sljedećoj strani)

(Nastavak opisa slike 14)

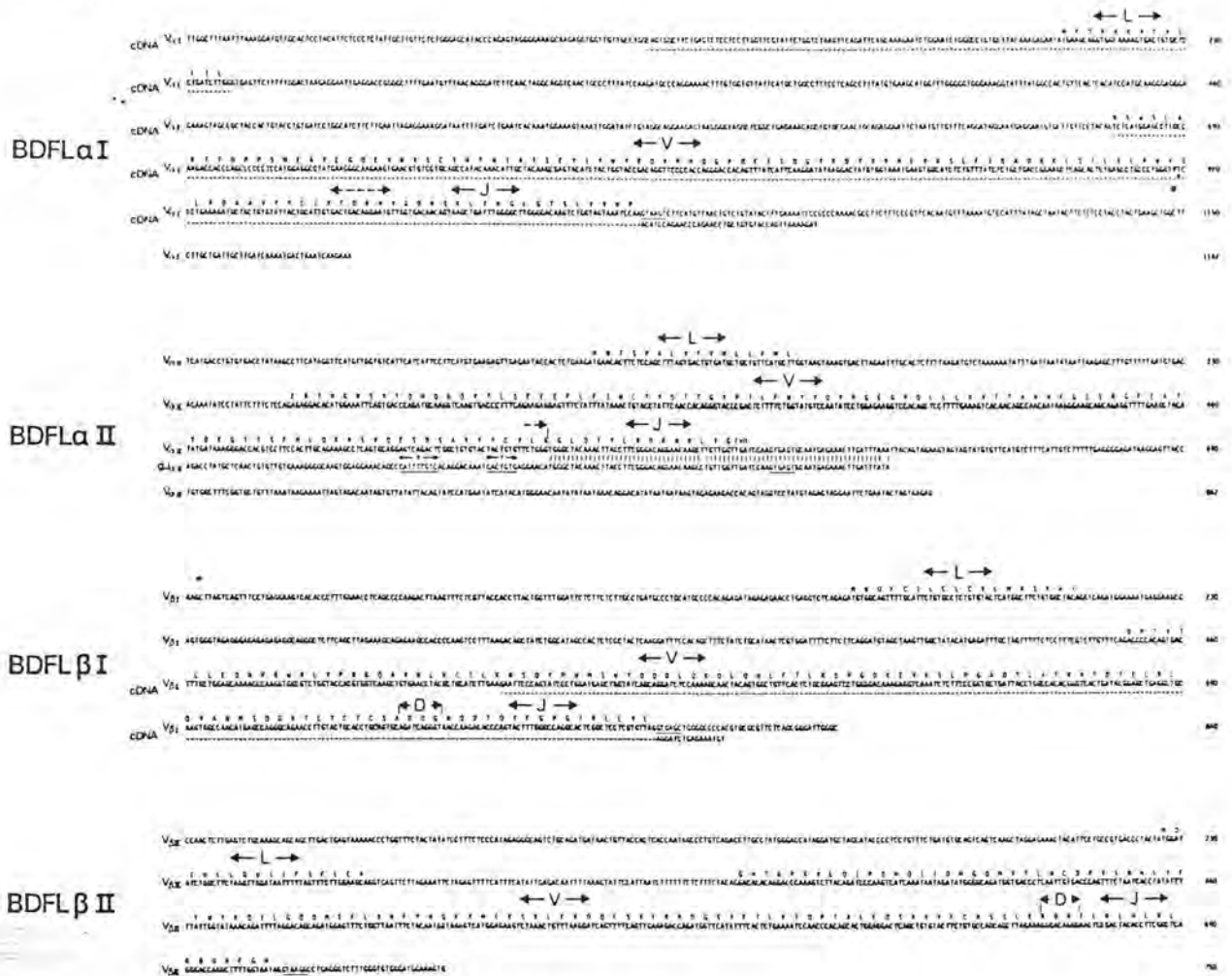
sliku 15) i Southern blot analizom upotrebljavajući probe za V i C regije koje su opisane u opisu slike 13. $D_{\beta 2}-J_{\beta 2}$ preuređenje u genu BDFL β II je pretpostavljeno na temelju usporedbe restrikcijskih fragmenata u toj regiji sa restrikcijskom mapom embrionalne konfiguracije⁸⁹, ali nije sekvencirano. Mjesta gdje restrikcijski enzimi presijecaju DNK su označena vertikalnim crtama. + označava prisutvo barem još jednog restrikcijskog mjesta za dotični enzim u naznačenom segmentu.

a) BDFL α I alel je definiran s dva kozmidska klona koja se preklapaju i čija DNK je podrijetlom iz DBA/2 kromosoma (vidi ref. 33); budući da se oni prekrivaju sa samo 0,5 kb DNK, izoliran je iz knjižnice gena od embrionalne DNK mišjeg soja BALB/c¹³⁴ kozmidski klon BALB/c9.1A, radi potvrđivanja preklopa. b) BDFL α II alel je definiran s pet preklapajućih kozmidskih klonova čija DNK potiče iz C57BL/6J kromosoma (vidi ref. 33). c) BDFL β I alel je definiran s jednim kozmidskim klonom. On ne sadrži niti jedno mjesto za restrikcijski enzim Sall. d) BDFL β II alel je definiran s četiri kozmidska klona koji se međusobno preklapaju. Kozmidska knjižnica gena koja je napravljena od genomske DNK BDFL stanica (vidi metode) pretražena je s radioaktivno-obilježenim probama C_{α} , C_{β} i VBDFL α I (vidi opis slike 13). Proba upotrebljena za izolaciju kozmidskog klona BALB/c9.1A je 2 kb dug fragment od početka do prvog BamHI mjesta s lijeve strane kozmidskog klona BDFL2.5.

7.2 Identifikacija funkcionalnih alela

Da bi se karakterizirali aleli, određene su DNK sekvence oko mjesta preuređenja. Aleli α I i β I su funkcionalno preuređeni geni, dok α II i β II sadrže nefunkcionalna preuređenja. Sva četiri alela imaju preuređene V segmente (slika 15).

Dva α alela su formirana preuređenjem dvaju V genetska segmenta, nazvana $V_{BDFL\alpha I}$ i $V_{BDFL\alpha II}$, do Ja genetskih segmenata, smještenih 40 i 10 kb uzvodno od $C\alpha$ (slike 14a,b i 15). Dva $V\alpha$ i $J_{BDFL\alpha I}$ genetska segmenta nisu dosada opisana u literaturi, dok $J_{BDFL\alpha II}$ genetski segment je nađen⁵ u cDNK klonu α lanca. Sekvenciran je, također, i $J_{BDFL\alpha II}$ genetski segment iz klona embrionalne DNK od soja miša BALB/c (slika 14a i 15).



Slika 15

Sekvence nukleotida i aminokiselina (pretpostavljenih na temelju genetskog koda) gena α i β lanaca receptora T stanica iz BDFL.

(Nastavak opisa slike na slijedećoj strani)

(Nastavak opisa slike 15)

Označene su L, V, D i J regije. U BDFL α I i BDFL α II iscrtkane strijele označavaju nepoznate granice i prisustvo dodatnih nukleotida (N) između V i J. Iscrtkana linija ispod sekvence nukleotida pokazuje gdje su sekvence cDNK identične genomskim. J α II u BDFL α II jest sekvenca JBDFL α II u embrionalnoj konfiguraciji, dobivena iz kozmidskog klona BALB/c9.1A (vidi sliku 14). Pretpostavljene signalne sekvence (nonamer i heptamer) za preuređenje DNK su označene brojkama. Mjesta davanja za preradu RNK na 3' kraju J genetskog segmenta su potcrtana.

BDFL α I i BDFL β I cDNK (vidi metode) je izolirana iz λ gt11 vektora i supklonirana u pUC9 ili M13mp18. Određeni fragmenti od kozmidskih klonova (vidi kasnije) su supklonirani u pUC9 ili M13mp18/19. Sekvenciranje se izvršilo prema opisanim metodama (vidi metode 6.2.8.3). Za sekvenciranje didezoski-metodom, osim kupljenog M13 primera, upotrebljeni su i sintetizirani oligonukleotidi⁷⁵ (17 nt) specifični za krajeve sekvenci dobivenih s kupovnim primerima ili drugom metodom. Slijedeći fragmenti su izolirani za sekvenciranje (usporedi sa slikom 14): 3 kb BamHI od kozmida BDFL7.5 koji sadrži VBDFL α I gen (ovaj klon je nazvan pV α -1); 4 kb BamHI fragment od kozmidskog klona BDFL9.3 koji sadrži VBDFL α II gen; 1,2 kb HindIII-ClaI fragment od kozmidskog klona BDFL5.2 koji sadrži VBDFL β I gen; 1,2 kb Sali-BamHI fragment od kozmidskog klona BDFL3.2 koji sadrži VBDFL β II gen; i 9 kb BamHI fragment od kozmidskog klona BALB/c9.1A koji sadrži nepreuređeni JBDFL α II genetski segment.

Alel BDFL α I ima otvoreni kodirajući okvir kroz cijeli V gen i mjesto otcjepljivanja introna na očekivanoj poziciji na kraju J genetskog segmenta. Genomska sekvenca V regije je identična sekvenci cDNK klona α lanca BDFL (slika 15). To znači, da je α I gen funkcionalni alel. Zanimljivo je spomenuti, da V gen ima neuobičajeno dug intron od 430 bp

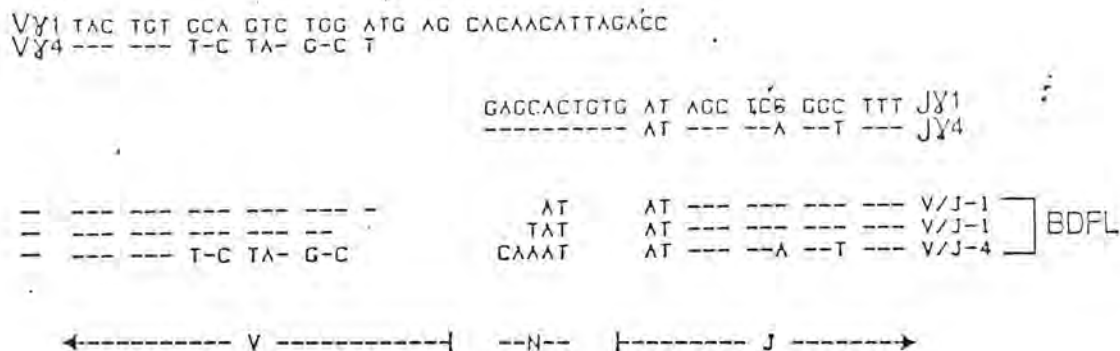
između exona vodećeg polipeptida (L, od engl. leader) i exona varijabilne regije. Alel BDFL α II nije funkcionalan.

Preuređenje je vezalo V i J genetske segmente, tako da se pojavljuje prijevremeni kod za završetak translacije na kraju V gena. α II gen je prepisan u RNK u BDFL, premda u manjoj mjeri od α I gena, rezultirajući s 1,2 kb dugom mRNA (slika 13). Nepoznato je zbog čega postoji neuobičajeno kratak prijepis.

Alel BDFL β I pokazuje V-D-J β 2.5 preuređenje, koje je izbacilo C β 1 gen za konstantnu regiju (slike 14c, 15). BDFL β I je funkcionalan β alel, jer ima otvoreni kodirajući okvir i sekvenca mu je identična s cDNK klonovima β lanca od BDFL. Zanimljivo je da ovaj β gen sadrži isti V genetski segment (E1), otkriven prije¹¹² u klonu pomoćničkih T stanica, specifičnih za trinitrofenol (TNP) i I-A^d MHC molekulu. Tako, kao što je ranije pokazano^{3,9,117}, isti V genetski segment može biti upotrebljen u T stanicama koje prepoznaju antigen u kontekstu MHC molekula, bilo I ili II razreda. Alel BDFL β II ima preuređen V genetski segment do D β 1 i J β 1,2 (slike 14d, 15). Preuređenje je uzrokovalo nepostojanje otvorenog kodirajućeg okvira, jer se prijevremeni kod za završetak sinteze polipeptida susreće na početku C regije. Po tim kriterijima BDFL β II nije funkcionalan. Isto tako, on ne proizvodi mRNA β lanca koja se može detektirati analizom pomoću Northern blota (slika 13). V genetski segment BDFL β II gena nije dosad opisan u literaturi.

7.3 Izolacija preuređenih γ gena

BDFL stanice posjeduju ukupno 7 γ alela (4 na C57BL/6 i 3 na DBA/2 kromosomu; vidi opis slike 1). Analizom genomske DNK od klona BDFL pomoću Southern blota ustanovljeno je, da su samo tri gena preuređena; oba γ -1 alela i jedan γ -4 alel (nije prikazano). Iz cDNK i kozmidske knjižnice gena izolirani su γ klonovi pomoću specifične probe za konstantnu regiju. DNK sekvenca oko mjesta preuređenja pokazala je da su oba γ -1 alela i γ -4 gen neproduktivni, tj. preuređenje je spojilo V-J genetske segmente tako da se prijevremeno nalazi kod za završetak sinteze proteina (slika 16).

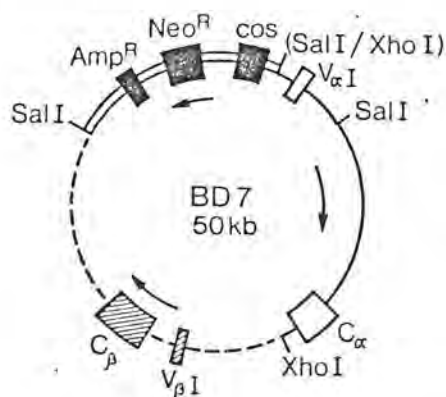


Slika 16

Usporedba sekvenci nukleotida V_{γ} i J_{γ} genetskih segmenata. Brojevi na desnom rubu sekvence označavaju određeni γ alel iz BDFL (usporedi sa slikom 1). Nukleotidi su prikazani u grupama od troje da se uoči otvoreni kodirajući okvir, $V_{\gamma}1$, $V_{\gamma}4$, $J_{\gamma}1$ i $J_{\gamma}4$ su sekvence genetskih segmenata u embrionalnoj konfiguraciji¹⁴⁰. Iscrtkana linija označava identičnost sekvence s prvom odozgo.

7.4 Transfekcija funkcionalnih alela

Za prijenos BDFL α I i β I gena u drugu stanicu T, konstruirana je kozmidska molekula BD7 koja sadržava oba gena s jednakom transkripcijskom orijentacijom i gen rezistencije prema neomicinu kao pozitivni marker za selekciju (slika 17).



Slika 17

Struktura vektora upotrebljenog za prijenos gena α i β lanaca receptora T stanica iz BDFL. Kozmid BD7 je sastavljen od BDFL α I i BDFL β I gena i kozmida pTCF (opisan u ref. 52). V i C geni su označeni pravokutnicama. Amp^R je gen β laktamaze iz pBR322; Neo^R je gen aminoglukozil 3'-fosfotransferaze iz Tn-5; cos je kohezivni dio bakteriofaga λ . Strelice označavaju orijentaciju prepisivanja. Dvostruka linija predstavlja vektor; segment s punom linijom predstavlja dijelove koji potiču od kozmidskih klonova BDFL7.5 i BDFL2.5; segment s iscrtkanom linijom predstavlja dio od kozmidskog klona BDFL5.2. Mjesta razgradnje restrikcijskim enzimima koji su upotrebljeni pri konstrukciji su označena. Mjesta u zagradi znače da su ista inaktivirana u procesu supkloniranja.

(Nastavak opisa na slijedećoj strani)

(Nastavak opisa slike 17)

Vektor za prijenos gena je napravljen u nekoliko koraka: (1) u $pV_{\alpha-1}$ (vidi opis slike 15) jedinstveno mjesto razgradnje enzimom SmaI u pUC9 vektoru je promijenjeno u mjesto za XhoI enzim, ubacujući XhoI poveziivače. (2) Cijeli umetak od $pV_{\alpha-1}$ je tada izvađen sa Sall i XhoI enzimima i supkloniran u Sall mjesto kozmidskog vektora pTCF. Jedan od dobivenih klonova pTCFV $_{\alpha}$ -C, imao je jedinstveno mjesto za Sall 3' od BDFL α I gena (drugo mjesto za Sall nije regenerirano jer su se spojili krajevi DNK razgrađeni sa Sall i XhoI). (3) 15 kb dug Sall-XhoI fragment od kozmida BDFL2.5, zajedno sa 24 kb dugim Sall-XhoI fragmentom od kozmida BDFL5.2D (dobivenim od kozmida BDFL5.2 konverzijom jedinstvenog mjesta za SmaI u XhoI; usporedi sa slikom 14) je ubačen u Sall mjesto pTCFV $_{\alpha}$ -C. Od dobivenih klonova, kozmid BD7, s jednim mjestom za XhoI i s dva mjesta za Sall je odabran za pokuse s prijenosom gena.

Ukratko, 40 kb veliki intron između exonu koji kodiraju V i C regiju α lanca je odstranjen, tako da bi se gen α lanca, zajedno s genom β lanca mogao smjestiti u kozmidski vektor, Delecija introna završava 10 kb uzvodno od C α gena i ostavlja barem jedan Ja genetski segment¹⁴⁶. Razlog tome je u pretpostavci, ako gen receptora T stanica za α lanac posjeduje tkivno specifični pojačivač na sličnom mjestu kao geni za laki i teški lanac imunoglobulina^{13,43,113}, onda bi on trebao biti smješten nizvodno od zadnjeg J segmenta i time bi bio zadržan u konstruiranoj molekuli. Smanjen α I gen na fragmentu od 18 kb DNK ubačen je zajedno s 24 kb dugim fragmentom, koji sadrži β I gen, u kozmidski vektor pTCF koji sadrži, uz simian virus 40 (SV40) promotor i pojačivač, gen za rezistenciju prema

antibiotiku G-418. U konstruiranoj molekuli, αI i βI geni su zadržali 1 i 8 kb sekvence uzvodno od V gena.

BD7 molekula je prenešena putem fuzije protoplasta u citotoksični klon hibridoma T stanica SPH1.3 (SPH), koji prepoznaje haptenu 3-(sulfofenildiazo)-4-hidroksifeniloctenu kiselinu (SP) i K^k MHC molekulu I razreda. SPH hibridom je dobiven fuzijom citotoksičnog klona limfocita T, iz mišjeg soja CBA s timomom BW5147 (izoliranog iz mišjeg soja AKR)⁵⁴.

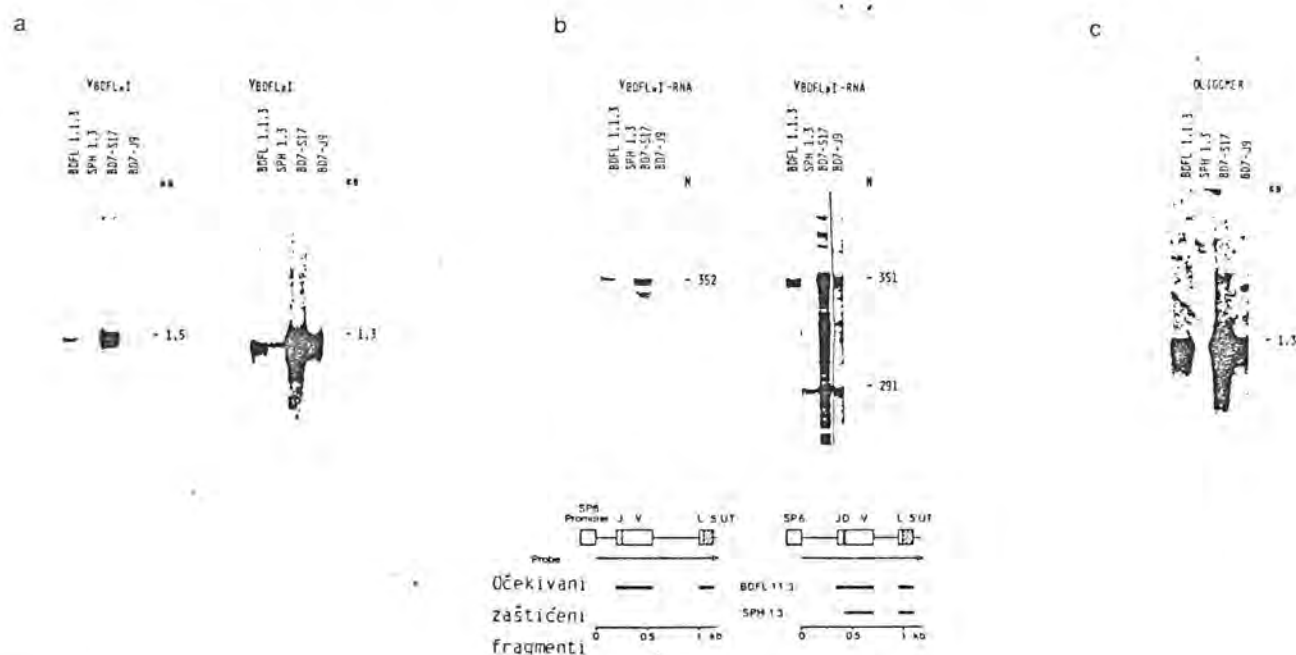
Iz 4 pokusa s BD7 izoliran je 41 klon s rezistencijom prema G-418. Od tih, 22 je zadržalo specifičnost recipijenta (SPH hibridoma)(nije prikazano), a 12 klonova je dalje analizirano.

7.5 Klon BD7-S17 prepisuje prenešene gene

Budući da nije bilo moguće analizirati ekspresiju BDFL αI i BDFL βI gena putem anti-idiotipskog antitijela protiv receptora za antigen i MHC BDFL stanica (jer takvo antitijelo nije proizvedeno), analizirana je transkripcija ubačenih gena. Northern blot metodom, upotrebom VBDFL αI i VBDFL βI probe, pokazano je da samo jedan transfektant (BD7-S17) posjeduje mRNK od BDFL αI i βI gena (slika 18a). Drugi transfektant (BD7-J9) posjeduje samo prijepis BDFL βI gena (slika 18a).

Za razliku od VBDFL αI probe, VBDFL βI proba hibridizira slabo s RNK od stanica primaoca (SPH; slika 18a), što znači da je isti ili vrlo srodni V β genetski segment prepisan u SPH stanicama. Kako bi se jednoznačno pokazalo da su ubačeni BDFL α

i β geni transkripcionalno aktivni u transfektiranim stanicama napravljeno je tzv. mapiranje RNazom ili pokus zaštite od RNaze. Kao probe u tim pokusima uzete su radioaktivno



Slika 18

Analiza transfektanata Northern blotom i zaštitom od RNaze. a) Northern blot analiza. VBDFL α I i VBDFL β I probe su opisane u legendi slike 13. b) Zaštita od RNaze. Fragmenti DNK koji sadrže V regije gena α I i β I su supklonirani u pSP6 vektor, RNK probe su sintetizirane i ujedno i radioaktivno obilježene te zatim hibridizirane s poli(A)⁺ ili cijelom RNK iz naznačenih stanica (vidi 6.2.8.4). V α I RNK proba je dobivena od 1,2 kb dugog umetka delecijuskog supklona koji je napravljen od pV α -1 (vidi opis slike 15); V β I RNK proba je dobivena od 1,2 kb HindIII-ClaI fragmenta kozmidskog klona BDFL5.2 (vidi opis slike 15). Veličine zaštićenih RNK fragmenata su određene pomoću poznatih sekvenca DNK elektroforetski razdvojenih u istom gelu. Veličine očekivanih zaštićenih fragmenata RNK su prikazane u dijagramu ispod. c) Northern blot analiza. Isti filter iz slike a je hibridiziran s 33 nt dugim oligonukleotidom (vidi 6.2.8.2) specifičnim za V-D-JBDFL α I spoj (pozicije 729-761 u slici 15).

obilježeni obrnuti (anti-sense) prijepisi RNK, dobiveni *in vitro* sintezom RNK na kalupu $V_{\alpha I}$ i $V_{\beta I}$ gena (slika 18b). Te probe su hibridizirane s RNK od stanica BDFL, SPH, BD7-S17 i BD7-J9 te su potom razgrađene s RNazom i analizirane na 6% sekvencionom gelu. Kako je prikazano na slici 18b, RNK iz BDFL i BD7-S17 je zaštitila 352 nukleotida (nt) dug fragment $V_{\alpha I}$ i 351 nt dug fragment $V_{\beta I}$ RNK probe. RNK iz BD7-J9 zaštitila je 351 nt dug fragment $V_{\beta I}$ RNK probe, ali nije pružila zaštitu od RNaze $V_{\alpha I}$ RNK probi. RNK iz SPH nije zaštitila $V_{\alpha I}$ RNK probu, ali je (isto kao i RNK od dva transfektanta) zaštitila 291 nt dugačak fragment $V_{\beta I}$ RNK probe, ponovno pokazujući da je isti ili sličan V_{β} gen, prepisan u SPH i BDFL stanicama, međutim, zbog razlike u veličini zaštićenih V_{β} fragmenata od strane RNK iz SPH i BDFL, geni β lanca kod tih dvaju staničnih klonova moraju se razlikovati barem u sekvenci oko D regije.

Rezultati pokusa zaštitom od RNaze potvrđuju da su ubačeni BDFL αI i βI geni, prepisani i prerađeni u BD7-S17 klonu, dok je samo βI gen prepisan i prerađen u BD7-J9. Nije pronađen zaštićeni fragment koji bi odgovarao exonu 5' neprepisane regije i vodećeg peptida α i β gena, vjerojatno zbog prijevremenog završetka prijepisa većine *in vitro* sintetiziranih RNK molekula.

Slika 18c prikazuje analizu RNK od dva transfektanta i T stanica davaoca i primaoca, upotrebom oligonukleotidne probe, specifične za $V_{BDFL\beta I}$ gen. S tom probom, prijepisi iste veličine nađeni su u transfektantima i u stanicama davaoca (BDFL), međutim, nije pronađena hibridizacija s RNK iz stanica

primaoca (SPH). Može se zaključiti da su prijepisi BDFL α i β gena ispravno započeti, prerađeni i završeni u transfektiranim stanicama.

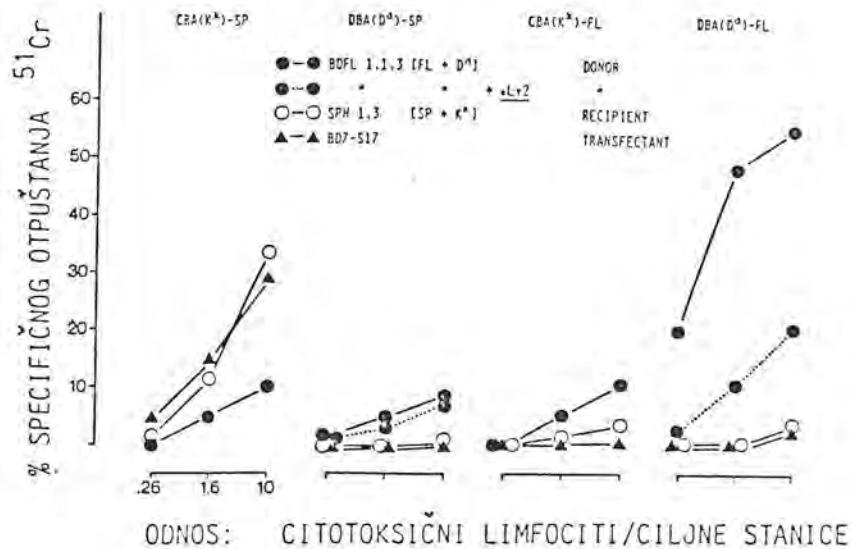
7.6 Specifičnost BD7-S17 transfektanta

Da bi utvrdili, jesu li ubačeni i prepisani BDFL α I i β I geni omogućili transfektantu BD7-S17 da prepozna iste ciljne stanice kao BDFL, testiran je njihov efekt na H-2^d i H-2^k pozitivne stanice koje su prethodno povezane s haptenom FL ili SP. Upotrebljene su dvije vrste ciljnih stanica: blasti B limfocita i L stanice fibroblasta.

Na slici 19 prikazani su rezultati testa s B stanicama. BD7-S17 transfektant je lizirao H-2^k pozitivne blaste B stanica, povezane sa SP, ali nije mogao lizirati H-2^d pozitivne blaste, povezane s FL. Prema tome, transfektant je zadržao citotoksičnu specifičnost primaoca (SPH-recipient) i nije zadobio specifičnost stanica davaoca (BDFL-donor), kada je testiran na limfocitima B.

Pretpostavlja se, da T stanice koje pokazuju relativno slabu avidnost za MHC i antigen, trebaju dodatne molekule (kao CD8 i CD4, kako bi se pojačala interakcija s ciljnim stanicama^{50, 55}, (Pogl. 5.3). Potreba za CD4 molekulom da stabilizira interakciju između T i ciljne stanice može se smanjiti ukoliko se poveća koncentracija antigena na površini ciljne stanice^{50, 53}. Iz nepoznatih razloga hibridomi T stanica napravljeni fuzijom s BW5147 timomom, nemaju ekspresiju CD8

molekula¹²⁶. Dakle, moguće objašnjenje za nemogućnost BD7-S17 transfektanta, da lizira B limfoblaste jeste što on treba CD8 molekulu, koja nije izražena na stanicama primaoca (SPH hibridoma)(nije prikazano). U prilog tome govori i činjenica

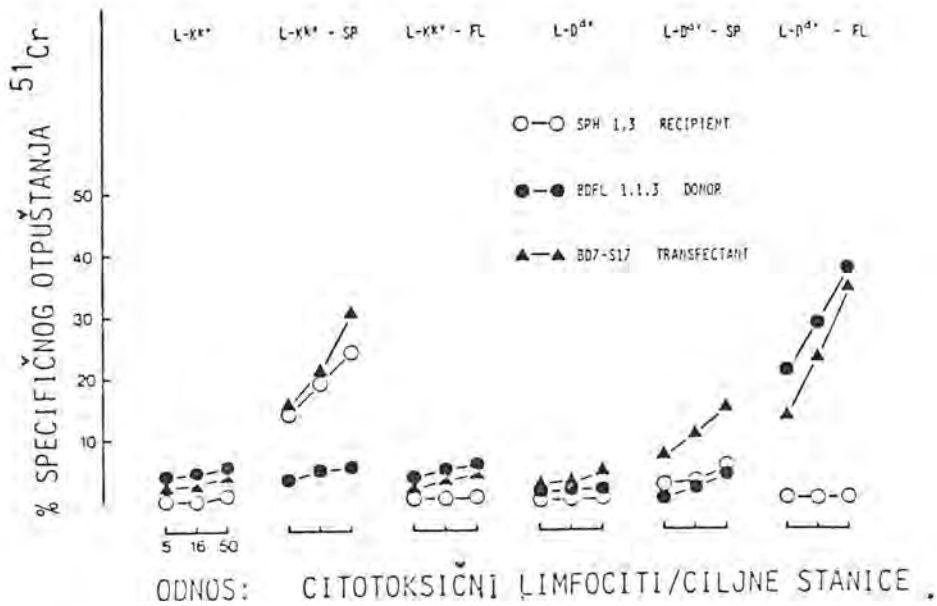


Slika 19

Citotoksična aktivnost klonova limfocita T SPH (primaoc; recipient), BDFL (davaoc; donor) i BD7-S17 (tranfectant), testiranih s B limfoblastima stimuliranim s lipopolisaharidom (LPS) i povezanim s haptenom 3-(p-sulfofenildiazo)-4-hidroksifeniloctenom kiselinom (SP) ili s fluoresceinom (FL). Ciljne stanice su obilježene s ⁵¹Cr i specifično otpuštanje ⁵¹Cr je određeno posebnim testom (vidi 6.2.10). Za inhibiciju s anti-CD8 antitijelima (53-6.72; 100 µg/ml), citotoksične stanice su inkubirane s pročišćenim antitijelima 15 minuta prije dodavanja ciljnih stanica.

da se citotoksična aktivnost BDFL stanica može blokirati s anti-CD8 antitijelima (slika 19). Dakle, u nadi da će se smanjiti potreba za CD8 molekulom testirane su ciljne stanice koje nose na svojoj površini veće količine D^d antigena.

U tu svrhu upotrebljena su dva različita klona L fibroblasta koji posjeduju velike količine D^d i K^k MHC molekula (slika 20) na staničnim površinama. L stanice, koje izražavaju



Slika 20

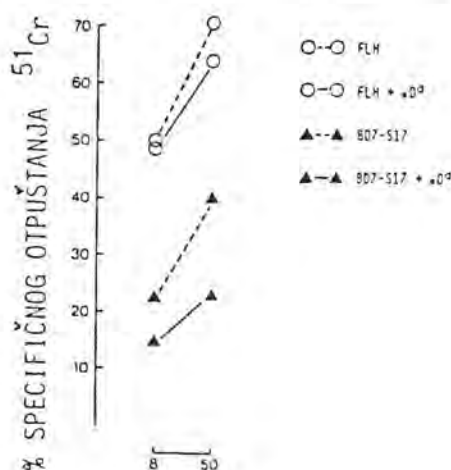
Citotoksična aktivnost označenih klonova testiranih s L fibroblastima kao ciljnim stanicama. L-K^k su LS5 stanice (Flow Laboratories), a dobivene su iz linije fibroblasta L929 probirom za visoku koncentraciju K^k antigena. L-D^d stanice su CA25.8.1 stanice u koje je transfekcijom ubačen gen za D^d molekulu I razreda MHC; te stanice nose na staničnoj površini oko 1/10 koncentracije K^k antigena na LS5 stanicama. Pomoću analize s FACS-om (fluorescence-activated cell sorter) ustanovljeno je da količina K^k antigena na LS5 stanicama je nešto malo veća od količine D^d antigena na CA25.8.1 stanicama (upotrebljavajući monoklona antitijela HO-100-5/28 [anti-K^k] i 34-7-23 [anti-D^d] pri koncentraciji od 100 µg/ml).

veće količine D^d antigena (L-D^d; 5-7 puta više nego A20 B stanični limfom), dobivene su transfekcijom gena⁵⁰. Budući da

su L stanice C3H-mišjeg podrijetla, transfektirane L stanice isto tako nose i K^k antigen. L fibroblasti koji nose veliku količinu K^k antigena ($L-K^{k\uparrow}$; otprilike isto koliko D^d molekula ima na površini $L-D^{d\uparrow}$ stanica i oko 10 puta više K^k od $L-D^{d\uparrow}$ stanica) dobivene su selekcijom (vidi opis slike 20). Obadvije L stanične linije su povezane sa FL ili SP haptenom i upotrebljene kao ciljne stanice za citotoksične T stanice davaoca, primaoca i transfektanta.

Kao što je prikazano na slici 20, BDFL T stanice davaoca lizirale su dobro samo $L-D^{d\uparrow}$ ciljne stanice, povezane s FL i proizvele su nešto neznačajne lize s ostalim ciljevima. SPH T stanice primaoca lizirale su dobro $L-K^{k\uparrow}$ ciljeve povezane sa SP haptenom i nešto malo iznad background razine $L-D^{d\uparrow}$ ciljeve povezane sa SP. BD7-S17 transfektant je lizirao obadvije ciljne stanice: $L-D^{d\uparrow}$ povezane s FL i $L-K^{k\uparrow}$ povezane sa SP. Međutim, isto je pokazao viši stupanj citotoksičnosti prema $L-D^{d\uparrow}$ ciljnim stanicama, povezanim sa SP, kao i T stanice primaoca. Čini se da je liza $L-D^{d\uparrow}$ ciljnih stanica povezanih sa SP, od strane transfektiranih T stanica, rezultat prepoznavanja endogenih K^k antigena i SP na površini ciljnih stanica (specifičnost primaoca). Ukoliko odzujemo postotak background lize $L-D^{d\uparrow}$ stanica nepovezanih s haptanima, tada preostaje oko 10% specifične lize od strane transfektanta i 6% specifične lize od strane primaoca, ciljnih stanica $L-D^{d\uparrow}$ povezanih sa SP. Budući da te dvije vrijednosti nisu značajno različite, ne postoji dokaz koji bi ukazivao da su se stvorili receptori s pomiješanim specifičnostima na površini

transfektanta. Dakle, liza L-Dd⁺ ciljnih stanica, povezanih s FL, jedina je nova specifičnost koja je pronađena kod transfektanta, a to se moglo i očekivati, ukoliko je specifičnost za MHC i antigen davaočevih limfocita T izražena kod transfektanta. U prilog tome ide i opažanje da je liza L-Dd⁺ ciljnih stanica povezanih s FL od strane transfektanta značajno inhibirana s anti-Dd^d antitijelima (slika 21).



ODNOS: CITOTOKSIČNI LIMFOCITI/CILJNE STANICE

Slika 21

Inhibicija citotoksične aktivnosti transfektanta BD7-S17 pomoću preinkubacije L-Dd⁺-FL ciljnih stanica s anti-Dd^d (34-7-23) antitijelima (100 µg/ml) 15 minuta prije dodavanja citotoksičnih stanica T. Kao kontrola, uzet je klon limfocita T FLH čija specifičnost nije ograničena polimorfnim značajkama MHC molekula⁵³.

Za razliku od BD7-S17, BD7-J9 transfektant koji prepisuje samo BDFLβI, ali ne i αI gen, ne lizira L stanice s velikim količinama Dd^d antigena i povezanim s FL (nije prikazano). Prema tome, izgleda da samo β lanac ne može prenijeti specifičnost (sudeći po testovima u ovom sustavu) limfocita T.

Dakle, u ovom sustavu α i β lanci receptora stanica T su dovoljni da se prenese specifičnost za antigen i MHC stanicama primaoca.

8. Diskusija

8.1 Specifičnost α/β heterodimera

Na pitanje, da li T stanice upotrebljavaju jedno ili više mjesta koja vežu MHC i antigen, prvo se probalo odgovoriti u pokusima s fuzijom između klonova T stanica različitih specifičnosti. Pokazano je, da pomoćničke i citotoksične hibridne stanice T imaju originalne specifičnosti od partnera fuzije i da nisu dobile nikakve nove mjerljive specifičnosti^{53,73}. Tako ti pokusi nisu uspjeli pokazati različita mjesta vezivanja za MHC i antigen.

Izolacija i karakterizacija mutanata je upotrebljena za definiranje gena koji kodiraju specifičnost T stanica. Osnovna ideja koja stoji iza takvog pristupa jeste u tome, da mutacije koje se dešavaju nasumce ili gubitak kromosoma bi odstranio s većom frekvencijom funkcionalne alele (prisutne u jednoj kopiji) gena receptora T stanica, nego druge gene zastupljene s dva funkcionalna alela u genomu. U jednom radu¹⁴⁸, hibridom T pomoćnika, specifičan za kokošji ovalbumin i MHC A_dA_d _{α β} molekulu II razreda, dugo je kultiviran in vitro i zatim su izabrane one spontane varijante koje su izgubile mogućnost prepoznavanja antigena i MHC. Analiza DNK putem Southern blota pokazala je, da su varijante izgubile karakteristične preuređene crte za bilo α ili β lanac ili za oboje. Kad je fuzijom spojena mutanta bez α lanca s varijantom bez β lanca, hibridne stanice su ponovno odgovorile na antigenski podražaj,

na isti način kao i parentalni hibridom T stanica. Odgovor se nije mogao dobiti ukoliko je mutanta bez α ili bez β lanca spojena s varijantom koja je izgubila gene i α i β lanca. Ovi rezultati pokazuju da su geni α i β lanca neophodni za izražavanje specifičnosti limfocita T prema antigenu i MHC.

U drugom radu¹¹⁰, mutante bez gena za β lanac su rekonstituirane putem prijenosa gena. Jurkat stanice, koje su ozračene γ zrakama i probrane na temelju toga što su izgubile prijepise mRNK od β lanca, transfektirane su s funkcionalnim genom (kao cDNK) za β lanac koji je izoliran iz Jurkat stanica. To je povratilo sposobnost stanicama da proizvode IL-2 nakon stimulacije s PMA (forbol miristat acetat) i klono-specifičnim monoklonalnim antitijelom, upravljanim protiv receptora T stanica i dovelo do ponovne ekspresije α/β heterodimera na staničnoj površini.

Ti pokusi su sugerirali mogućnost da se s genima za α i β lanac prenese specifičnost limfocita T za antigen i MHC.

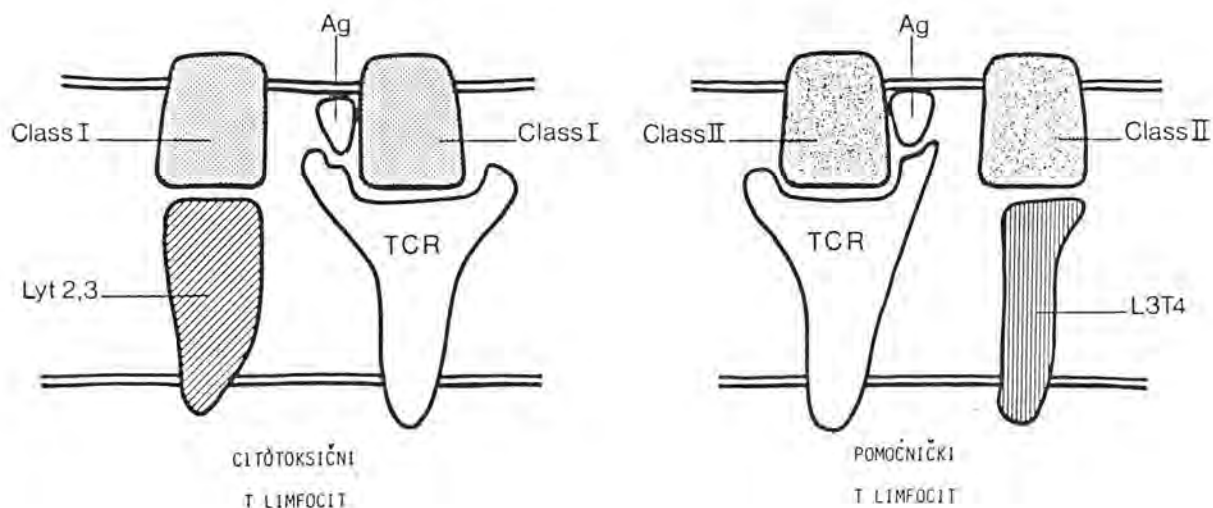
U ovom radu je opisan upravo takav pokus upotrebom citotoksičnog klona T stanica kao davaoca i citotoksičnog T hibridoma kao primaoca gena. Davaoac ubija ciljne stanice koje izražavaju MHC molekulu I razreda D^d povezane s fluoresceinom (FL), dok je primalac specifičan za haptent SP, zajedno s K^k. Funkcionalno preuređeni davaočevi geni za α i β lanac su izolirani, karakterizirani i prenešeni u stanice primaoca. Analizom transfektanata identificiran je jedan klon koji je pokazivao da su prenešeni geni davaoca prepisani u mRNK. Taj

klon je funkcionalno testiran, da se vidi da li može lizirati iste ciljne stanice kao davalac i primalac. Početni pokusi s B limfoblastima kao ciljnim stanicama nisu uspjeli pokazati da je tranfektant dobio specifičnost davaoca, premda je zadržao specifičnost primaoca.

Da je transfektant dobio i davaočevu specifičnost pokazuju pokusi kad su kao ciljne stanice upotrebljeni L fibroblasti, povezani s FL, koji na svojim staničnim membranama nose sedam puta više D^d molekula od B limfocita (vidi 7.6). Može se pretpostaviti, da transfektant nije mogao lizirati ciljne stanice davaoca, koje imaju normalnu količinu D^d molekula, zbog toga što mu nedostaje CD8 molekula. Pokazano je da se CD8 molekula nalazi na površini stanica davaoca i monoklonalna antitijela protiv CD8 molekule mogu inhibirati davaoca pri lizi ciljnih stanica (vidi 7.6). Postoje i druga moguća objašnjenja potrebe za ciljnim stanicama s povećanom koncentracijom MHC molekula. Na primjer, niska koncentracija α/β heterodimera od davaoca na staničnoj površini transfektanta može proizvesti navedeni efekt. Isto tako, možda je potrebna još neka (zasada neotkrivena) molekula koja bi stabilizirala interakciju s ciljnom stanicom. Takva molekula čini se da nije produkt γ gena, jer davalac nema funkcionalno preuređene γ gene (vidi 7.3).

Usprkos tim problemima, pokus prijenosa gena jasno pokazuje

da u tom sustavu, a vjerojatno i u drugima, geni α i β lanaca su dovoljni za kodiranje prepoznavanja kombinacije antigena i MHC molekule (slika 22).



Slika 22

Model interakcije između T i ciljne stanice. TCR-receptor stanica T; Ag-antigen; Class I i II - MHC molekule I i II razreda.

8.2 Pokušaji korelacije strukturalnih dijelova receptora limfocita T s prepoznavanjem antigena i MHC

Pokusi prenošenja gena trebali bi otvoriti nove putove u proučavanju odnosa strukture/specifičnosti i strukture/funkcije T staničnog receptora. Geni koji kodiraju α i β lance mogu se izmjeniti među različitim T stanicama u pokušaju da se korelira α i β lanac s prepoznavanjem antigena ili MHC. Isto tako, pokusi tzv. miješanja exona i još finiji pokusi in vitro

mutageneze mogu se napraviti da se vidi da li određeni dijelovi ili neke aminokiseline u molekuli imaju funkciju prepoznavanja ili efektoru.

Problem, da li α ili β lanac može biti doveden u vezu s prepoznavanjem bilo antigena ili MHC, već je bio proučavan putem uspoređivanja sekvenci α i β lanaca između T stanica različitih specifičnosti. Početni pokusi nisu uspjeli pokazati jednostavnu korelaciju između upotrebe V_β , D_β , J_β , C_β ili C_α gena i prepoznavanja MHC i antigena^{9, 12, 25, 49, 79, 118}: različite T stanice koje prepoznaju određenu kombinaciju antigena i MHC imaju razlike u sekvencama β lanaca i T stanice koje imaju različitu MHC i antigensku specifičnost mogu upotrijebiti iste genetske segmente. Konačno, T pomoćnici i citotoksične stanice upotrebljavaju isti skup V i C genetskih segmenata pri stvaranju svojih repertoara^{9, 117}, pogl. 7.2.

Nedavno je izvršena opsežnija analiza sekvenci α i β lanaca kod pomoćničkih klonova T stanica, izoliranih iz mišjeg soja B10.A, specifičnih za golublji citokrom c i međusobno različitih u tzv. finoj specifičnosti, koja je proširila početna znanja. Pokazano je prvo, da α i β lanci pridonose specifičnosti za antigen i MHC i da razlika u sekvenci aminokiselina na granicama V(D)J spojnih mjesta ima utjecaj na specifičnost prepoznavanja. Drugo, upotreba različitih V_β genetskih segmenata korelira sa sposobnošću tih klonova da prepoznaju antigen udružen s različitom MHC molekulom. Treće, klon u kojem je upotrebljen jedinstveni J_α genetski segment, pokazuje, dodatno MHC aloreaktivnost³⁸.

Uzevši sve zajedno, navedeni pokusi ne dozvoljavaju čvrste

zaključke i odnosu strukture i specifičnosti.

8.3 Buduća istraživanja

Postoji nekoliko važnih pitanja o odnosu na specifičnost limfocita T, koja se može proučavati prijenosom gena u druge kultivirane stanice.

Uz *in vitro* mutagenezu, kojom se može istraživati odnos strukture i funkcije, regulatorne elemente transkripcije, puteve signaliziranja, uloga CD4 i CD8 dodatnih molekula, može se analizirati i kombiniranje različitih α i β lanaca. Isto tako, pokušat će se konstruirati stanice koje će moći proizvoditi puno i isto tako izlučivati α i β lance, kako bi se dobilo dovoljno materijala za kristalografsku i funkcionalnu analizu. Ti pokusi bi, konačno, trebali pokazati da li je model "dvostrukog prepoznavanja" ili "promijenjenog-vlastitoga" prepoznavanja točan.

U isto vrijeme, napraviti će se transgenični miševi s preuređenim, funkcionalnim T staničnim receptorom u embrionalnoj DNK. To će omogućiti proučavanje problema, kao što su, tkivna specifičnost, alelna isključivanje, ontogeneza limfocita T, indukcija tolerancije i MHC-restrikcija. Isto tako, uloga enigmatskog γ gena može se analizirati konstrukcijom transgeničnih miševa s γ genima u normalnom (tzv. sense) položaju i u obrnutom (tzv. anti-sense) položaju.

Prema tome, u bliskoj budućnosti ostvarit će se veliki napredak u pogledu proučavanja funkcije limfocita T.

9. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada daju prvi konačni dokaz da geni α i β lanca T staničnog receptora mogu prenijeti funkcionalnu specifičnost (prepoznavanje antigena i MHC molekule I razreda) s jednog limfocita T na drugi. Drugim riječima, geni α i β lanca receptora su potrebni i dovoljni limfocitima T za prepoznavanje antigena u kontekstu MHC.

10. LITERATURA

1. AAIJ, C. i BORST, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochem. biophys. Acta* 269: 192-200.
2. ABEL, P. i TRAUTNER, T.A. 1964. Formation of an animal virus within a bacterium. *Z. Vererb-Lehre* 95: 66-72.
3. ACUTO, O., CAMPEN, T.J., ROYER, H.D., HUSSEY, R.E., POOLE, C.-B. i REINHERZ, E.L. 1985. Molecular analysis of T-cell receptor (Ti) variable region (V) gene expression. *J. Exp. Med.* 161: 1326-1343.
4. ACUTO, O., FABBI, M., SMART, J., POOLE, C.B., PROTENTIS, J., ROYER, H.D., SCHLOSSMAN, S.F. i REINHERZ, E.L. 1984. Purification and NH₂-terminal amino acid sequencing of the β subunit of a human T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3851-3855.
5. ARDEN, B., KLOTZ, J.L., SIU, G. i HOOD, L.E. 1985. Diversity and structure of genes of the alpha family of mouse T-cell antigen receptor. *Nature* 316:783-787.
6. ASHWELL, J.D. i SCHWARTZ, R.H. 1986. T-cell recognition of antigen and the Ia molecule as a ternary complex. *Nature* 320: 176-179.
7. BABBIT, B.P., ALLEN, P.M., MATSUEDA, G., HABER, E. i UNANUE, E.E. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317: 359-360.
8. BANK, I., DE PINHO, R.A., BRENNER, M.B., CASSIMERIS, J., ALT, F.W. i CHESS, L. 1986. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human

- thymocytes. *Nature* 322: 179-181.
9. BARTH, R.K., KIM, B.A., LAN, N.C., HUNKAPILLER, T., SOBIECK, N., WINOTO, A., GERSHENFELD, H., OKADA, C., HANSBURG, D., WEISSMAN, I.L. i HOOD, L. 1985. The murine T-cell receptor uses a limited repertoire of expressed V beta segments. *Nature* 316: 517-523.
 10. BASTIA, D., SNEOKA, N. i COS, E.C. 1975. Studies on the late replication of phage lambda: rolling circle replication of the wild type and a partially suppressed strain, Oam29, Pam80. *J. Mol. Biol.* 98: 305-320.
 11. BECKER, D.M., PATEN, P., CHIEN, Y.H., YOKOTA, T., ESHHAR, Z., GIEDLIN, M., GASCOIGNE, N.R.J., GOODENOW, C., WOLF, R., ARAI, K. i DAVIS, M.M. 1985. Variability and repertoire size of T-cell receptor V alpha gene segments. *Nature* 317: 430-434.
 12. BEHLKE, M.A., CHOU, H.S., HUPPI, K. i LOH, D.Y. 1986. Murine T-cell receptor mutants with deletions of beta-chain variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 767-771.
 13. BERGMAN, Y., RICE, D., GROSSCHEDL, R. and BALTIMORE, D. 1984. Two regulatory elements for immunoglobulin κ light chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7041-7045.
 14. BLANDEN, R.V. i ADA, G.L. 1978. A dual recognition model for cytotoxic T cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self H-2 antigens. *Scand. J. Immun.* 7: 181-184.
 15. BLATTNER, F.R., WILLIAMS, B.G., BLECHL, A.E. et al. 1977. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 196: 161-169.
 16. BLUE, M.-L.B., DALEY, J.F., LEVINE, H. i SCHLOSSMAN, S.F.

1985. Class II major histocompatibility complex molecules regulate the development of the T4⁺T8⁺ inducer phenotype of cultured human thymocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8178-8182.
17. VON BOEHMER, H. 1986. The selection of the α, β heterodimeric T-cell receptor for the antigen. Immunol. Today 7: 333-336.
18. VON BOEHMER H., HAAS, W. i JERNE, N.K. 1978. Major histocompatibility complex-linked immune responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high responder mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2439-2444.
19. BRENNER, M.B., MCLEAN, J., DIALYNAS, D.P., STROMINGER, J.L., SMITH, J.A., OWEN, F.L., SEIDMAN, J.G., IG, S., ROSEN, F. i KRANGEL, M.S. 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. Nature 322: 145-149.
20. BRODA, P. 1979. Plasmids. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
21. BUUS, S., COLON, S., SMITH, C., FREED, J.H., MILES, C. i GREY, H.M. 1986. Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 3968-3971.
22. CACCIA, N., KRONENBERG, M., SAXE, D., HAARS, R., BURNS, G.A.P., GOVERMAN, J. MALISSEN, M., WILLARD, H., YOSHIKAI, Y., SIMON, M., HOOD, L. i MAK, T.W. 1984. The T-cell receptor beta chain genes are located on chromosome 6 in mice and chromosome 7 in humans. Cell 37: 1091-1099.
23. CARLE, G.F., FRANK, M. i OLSON, M.V. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of

- the electric field. *Science* 232: 65-68.
24. CEREDIG, R., DIALYNAS, D., FITCH, F. i MACDONALD, H. 1983. Precursors of T cell growth factor producing cells in the thymus. *J. Exp. Med.* 158: 1654-1671.
25. CHIEN, Y.H., GASCOIGNE, N.R.J., KAVALER, J., LEE, N.E. i DAVIS, M.M. 1984. Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 309: 322-326.
26. CHIRGWIN, J., PRZYBYLA, A., MACDONALD, R. i RUTTER, W. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
27. COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y. i HSU, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114.
28. COHN, M. i EPSTEIN, R.W. 1978. T cell inhibition of humoral responsiveness. II. Theory on the role of restrictive recognition in immune regulation. *Cell. Immun.* 39: 125-128.
29. COLLINS, J. i HOHN, B. 1978. Cosmids: a type of plasmid gene cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage λ heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4242-4246.
30. CROCE, C.M., ISOBE, M., PALUMBO, A., PUCK, J., MING, J., TWEARDY, D., ERIKSON, J., DAVIS, M. i ROVERA, G. 1985. Gene for the α chain of human T-cell receptor: location on chromosome 14 region involved in T-cell neoplasms. *Science* 227: 1044-1047.
31. CUNNINGHAM, A.J. i LAFFERTY, K.J. 1977. A simple, conser-

- vative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 6: 1-4.
32. DAVIS, M.M. 1985. Molecular genetics of T-cell receptor β chain. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 537-560.
 33. DEMBIĆ, Z., BANNWARTH, W., TAYLOR, B.A. i STEINMETZ, M. 1985. The gene encoding the T-cell receptor alpha-chain maps close to the NP-2 locus on mouse chromosome 14. *Nature* 314: 271-273.
 34. DROEGE, W. 1979. Hypothesis on the origin of strong alloreactivity. *Immunobiology* 156: 2-5.
 35. DUSSOIX, D. i ARBER, W. 1962. Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage λ . *J. Molec. Biol.* 5: 37-49.
 36. FALKOW, S. 1975. Infectious multiple drug resistance. London, Pion.
 37. FEINBERG, A. i VOGELSTEIN, B. 1984. Addendum "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Analyt. Biochem.* 137: 266-267.
 38. FINK, J.P., MATIS, L.A., MCELLIGOTT, D.L., BOOKMAN, M. i HEDRICK, S.M. 1986. Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. *Nature* 321: 219-226.
 39. FLEISCHER, B., BECKT, H. i ROTT, R. 1985. *J. Immunol.* 135: 2800-2807.
 40. FRISCHAUF, A.M., GAROFF, H. i LEHRACH, H. 1980. *Nucleic Acids Res.* 8: 5541-5545.
 41. GIBSON, J., BASTEN, A., WALKER, K.Z. i LOBLAY, R.H. 1985. A role for suppressor T cells in induction of self-tolerance.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5150-5154.
42. GILL, P., JEFFREYS, A.J. i WERRETT, D.J. 1985. Forensic application of DNA "fingerprints". Nature 318: 577-579.
 43. GILLIES, S.D., MORRISON, S.L., OI, V.T. i TONEGAWA, S. 1983. A tissue specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. Cell 33: 717-728.
 44. GLISIN, V., CRKVENJAKOV, R. i BYUUS, C. 1977. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13: 2633-2637.
 45. GLOVER, D.M. (ed.) 1985. DNA cloning. Vols. I i II, IRL Press, Oxford, Washington DC.
 46. GOLD, D.P., PUCK, J.M., PETTEY, C.L., CHO, M., COLIGAN, J., WOODY, J.N. I TERHORST, C. 1986. Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. Nature 321: 431-434.
 47. GORIDIS, C., HIRN, M., SANTONI, M.-J., GENNARINI, G., DEAGOSTINI-BAZIN, H. JORDAN, B.R., KIEFER, M. i STEINMETZ, M. 1985. Isolation of mouse N-CAM-related cDNA: detection and cloning using monoclonal antibodies. EMBO J. 4: 631-635.
 48. GOVERMAN, J., HUNKAPILLER, T. i HOOD, L. 1986. A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. Cell 45: 475-484.
 49. GOVERMAN, J., MINARD, K., SHASTRI, N., HUNKAPILLER, T., HANSBURG, D., SERCARZ, E. i HOOD, L. 1985. Rearranged β T-cell receptor genes in a helper T-cell clone specific for lysozyme: no correlation between $V\beta$ and MHC restriction. Cell 40: 859-867.

50. GREENSTEIN, J.L., MALISSEN, H. i BURAKOFF, S.J. 1985. Role of L3T4 in antigen-driven activation of a class I-specific T cell hybridoma. *J. Exp. Med.* 162: 369-374.
51. GRONENBORN, B. i MESSING, J. 1978. Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites. *Nature, London* 272: 357.
52. GROSVELD, F.G. et al. 1982. The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 21: 6715-6732.
53. HAAS, W. i KISIELOW, P. 1985. Cytolytic T cell hybridomas. I. Interleukin 2-independent noncytolytic variants. *Eur. J. Immunol.* 15: 751-755.
54. HAAS, W. i KISIELOW, P. 1985. Cytolytic T cell hybridomas. II. Interleukin 2-independent cytolytic variants. *Eur. J. Immunol.* 15: 755-760.
55. HAAS, W., MATHUR-ROCHAT, J. i VON BOEHMER, H. 1985. Cytolytic T cell hybridomas. III. The antigen specificity and the restriction specificity of cytolytic T cells do not phenotypically mix. *Eur. J. Immunol.* 15: 963-965.
56. HAAS, W., MATHUR-ROCHAT, J., POHLIT, H., NABHOLZ, M. i VON BOEHMER, H. 1980. Cytotoxic T cell responses to haptened cells. III. Isolation and specificity analysis of continuously growing clones. *Eur. J. Immun.* 10: 828-834.
57. HANNUM, D., FREED, J.H., TARR, G., KAPPLER, J. i MARRACK, P. 1984. Biochemistry and distribution of the T cell receptor. *Immunol. Rev.* 81: 161-176.
58. HASTIE, N. i HELD, W. 1978. Analysis of mRNA populations by cDNA-mRNA hybrid-mediated inhibition of cell-free protein

- synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1217-1221.
59. HAYDAY, A.C., DIAMOND, D.J., TANIGAWA, G., HEILIG, J.S., FOLSOM, V., SAITO, H. i TONEGAWA, S. 1985. Unusual organisation and diversity of T-cell receptor alpha chain genes. Nature 316: 828-832.
60. HAYDAY, A.C., SAITO, H., GILLIES, S.D., KRANZ, D.M., TONIGAWA, G., EISEN, H.N. i TONEGAWA, S. 1985. Structure, organisation and somatic rearrangement of T cell gamma genes. Cell 40: 259-269.
61. HEDRICK, S.M., COHEN, D.I., NIELSON, E.A. i DAVIS, M.M. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 308: 149-153.
62. HEILIG, J.S., GLIMCHER, L.H., KRANZ, D.M., CLAYTON, L.K., GREENSTEIN, J.L., SAITO, H., MAXAM, A.M., BURAKOFF, S.J., EISEN, H.N., TONEGAWA, S., EISEN, H.N. i TONEGAWA, S. 1985. Expression of the T-cell-specific gamma gene is unnecessary in T cells recognizing class II MHC determinants. Nature 317: 68-70.
63. HENDRIX, A., ROBERTS, D., STAHL, U. i WEISBERG, D. 1983. Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
64. HOOD, L., STEINMETZ, M. i MALISSEN, B. 1983. Genes of the MHC of the mouse. Ann. Rev. Immunol. 1: 529-568.
65. HOOD, L., KRONENBERG, M. i HUNKAPILLAR, T. T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. Cell 40: 225-229.
66. IKUTA, K., OGURA, T., SHIMIZU, A. i HONJO, T. 1985. Low frequency of somatic mutation in beta chain variable region genes of human T-cell receptors. Proc. Natl. Acad. Sci USA

- 82: 7701-7705.
67. IMBODEN, J.B., WEISS, A. i STOBO, J.D. 1985. Transmembrane signalling by the T3-antigen receptor complex. *Immunol. Today* 6: 328-331.
68. ISH-HOROWICZ, D. i BURKE, J.F. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids. Res.* 9: 2989-2998.
69. IWAMOTO, A., RUPP, F., OHASHI, P.S., WALKER, C.L., PIRCHER, H., JOHO, R., HENGARTNER, H. i MAK, T.W. 1986. T cell-specific gamma genes in C57BL/10 mice. *J. Exp. Med.* 163: 1203-1212.
70. JANEWAY, C.A. JR., WIGZELL, H. i BINZ, H. 1976. Hypothesis: two different V gene products make up the T cell receptors. *Scand. J. Immun.* 5: 992-995.
71. JERNE, N.K. 1971. The somatic generation of immune recognition. *Eur. J. Immun.* 1: 1-6.
72. JOHNSON, P.H. i GROSSMAN, L.I. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels: optimizing separations of conformational isomers of double-stranded and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16: 4217-4225.
73. KAPPLER, J.W., SKIDMORE, B., WHITE, Y. i MARRACK, P. 1981. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. *J. Exp. Med.* 153: 1198-1214.
74. KAVALER, J., DAVIS, M.M. i CHIEN, Y. 1984. Localization of a T-cell receptor diversity-region element. *Nature* 310: 421-423.
75. KIEFER, H.R. i BANNWARTH, W. 1985. Strategies of oligonucleotide synthesis. U: *Immunological Methods Vol. 3* (ed. Lefkovits, I. and Pernis, B.) Academic. New York.

69-83.

76. KLEIN, J. 1975. Biology of the mouse H-2 complex. New York Springer Publishing.
77. KRANZ, D.M., SAITO, H., DISTECHE, C.M., SWISSHELM, K., PRAVTCHEVA, D., RUDDLE, F.H., EISEN, H.N. i TONEGAWA, S. 1985. Chromosomal locations of the murine T-cell receptor alpha-chain gene and the T-cell gamma gene. Science 227: 941-944.
78. KRANZ, D.M., SAITO, H., HELLER, M., TAKAGAKI, Y., HAAS, W., EISEN, H.N. i TONEGAWA, S. 1985. Limited diversity of the rearranged T-cell gamma gene. Nature 313: 752-755.
79. KRONENBERG, M., GOVERMAN, J., HAARS, R., MALLISSEN, M., KRAIG, E., PHILLIPS, L., DELOVITCH, T., SUCIU-FOCA, N. i HOOD, L. 1985. Rearrangement and transcription of the β -chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes. Nature 313: 647-653.
80. KRUISBEEK, A.M., MOND, J.J., FOWLKES, B.J., CARMEN, J.A., BRIDGES, S. i LONGO, D.L. 1985. Absence of the Lyt2⁻, L3T4⁺ lineage of T cells in mice treated neonatally with anti-I-A correlates with absence of intrathymic I-A-bearing antigen-presenting cell function. J. Exp. Med. 161: 1029-1047.
81. LANGMAN, R.E. 1978. Cell-mediated-immunity and the major histocompatibility complex. In: Rev. Physiol. Biochem. Pharmac. 81: 1-4.
82. LEDERBERG, S. i MESELSON, M. 1964. degradation of non-replicating bacteriophage DNA in non-accepting cells. J. Molec. Biol. 8: 623-8.
83. LEDOUX, L. i HUART, R. 1968. Integration and replication of

- DNA of M. lysodeikticus in DNA of germinating barley. Nature, London 218: 1256-1259.
84. LEDOUX, L., HUART, R. i JACOBS, M. 1971. Fate of exogenous DNA in Arabidopsis thaliana: translocation and integration. Eur. J. Biochem. 23: 96-108.
85. MACDONALD, H.R., GLASEBROOK A.A., BRON, C., KELSO, A. i CEROTTINI, J.C. 1982. Clonal heterogeneity in the functional requirement for Lyt-2/3 molecules on cytolytic T lymphocytes (CTL): Possible implications for the affinity of CTL antigen receptors. Immun. Rev. 68: 89-115.
86. MAK, T.W. i YANAGI, Y. 1984. Genes encoding the human T cell antigen receptor. Immunol. Rev. 81: 221-233.
87. MALCOM, A.D.B. 1981. The use of restriction enzymes in genetic engineering. In: Genetic Engineering 2: 129-173.
88. MALISSEN, M., MCCOY, C., BLANC, D., TRUCY, J., DEVAUX, C., SCHMITT-VERHULST, A., FITCH, F., HOOD, L. i MALISSEN, B. 1986. Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor beta gene rearrangements. Nature 319: 28-33.
89. MALISSEN, M., MINARD, K., MJOLSNESS, S., KRONENBERG, M., GOVERMAN, J., HUNKAPILLAR, T., PRYSTOWSKY, M.B., YOSHIKAI, Y., FITCH, F., MAK, T.W. i HOOD, L. 1984. Mouse T-cell antigen receptor: structure and organisation of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. Cell 37: 1101-1110.
90. MANDEL, M. i HIGA, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. molec. Biol. 53: 159-62.
91. MANIATIS, T., HARDISON, R.C., LACY, E. et al. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic

- DNA. Cell 15: 687-701.
92. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., i SAMBROOK J. 1983. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
93. MARRACK, P., ENDRES, R., SHIMONKEVITZ, R., ZLOTNIK, A., DIALYNAS, D., FITCH, F. i KAPPLER, J. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. II. Role of the L3T4 product. J. Exp. Med. 158: 1077-1091.
94. MATZINGER, P. 1981. A one receptor view of T cell behavior. Nature 292: 497-501.
95. MATZINGER, P. i BEVAN, M.J. 1977. Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? Cell. Immun. 29: 1-5.
96. MAXAM, A.M. i GILBERT, W. 1980. Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. Meth. Enzym. 65: 499-560.
97. MCCUBREY, J., MCKEARN, J.P. i KÖHLER, G. 1985. Transformation of B and non-B cell lines with the 2,4,6-trinitrophenyl (TNP)-specific immunoglobulin genes. Eur. J. Immun. 15: 1117-1124.
98. MELCHERS, F. i ANDERSSON, J. 1984. B cell activation: Three steps and their variations. Cell 37: 715-720.
99. MESSING, J. CREAS, R. i SEEBERG, P.H. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. Nucl. Acids. Res. 9: 309-321.
100. MESSING, J. and VIERIA, J. 1982. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strands of double digest restriction fragments. Gene 19: 269-276.

101. MEUER, S.C., ACUTO, O., HERCEND, T., SCHLOSSMAN, S.F. i REINHERZ, E. 1984. The human T-cell receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 23-50.
102. MILSTEIN, C. 1986. From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science* 231: 1261-1268.
103. MÖLLER, G. (ed.) 1985. Molecular genetics of Class I and Class II MHC antigens. *Immunological Reviews*, Vols. 84-85, Munksgaard, Copenhagen.
104. MOORE, M. i OWEN, J. 1967. *J. Exp. Med.* 126: 715-718.
105. MURRAY, N.E. i MURRAY, K. 1975. Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature* 251: 476-481.
106. MURRAY, N.E., BRAMMAR, W.J. i MURRAY, K. 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-61.
107. NAGATA, S., TAIRA, H., HALL, A., JOHNSRUD, L., STREULI, M., ESCÖDI, J., BOLL, W., CANTELL, K. i WEISSMANN, C. 1980. Synthesis in Escherichia coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature, London* 284: 316-320.
108. OCHI, A., HAWLEY, R.G., SHULMAN, M.J. i HOZUMI, N. 1983. Transfer of a cloned immunoglobulin light-chain gene to mutant hybridoma cells restores specific antibody production. *Nature* 302: 340-342.
109. OETTGEN, H.C., PETTEY, C.L., MALOY, W.L. i TERHORST, C. 1986. A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine T cells. *Nature* 320: 272-275.
110. OHASHI, P.S., MAK, T.W., VAN DER ELSEN, P.V., YANAGI, Y, YOSHIKAI, Y., CALMAN, A.F., TERHORST, C. i STODO, J.D. 1985.

- Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature* 316: 606-609.
111. PATERSON, B., ROBERTS, B. i KUFF, E. 1977. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4370-4374.
112. PATTEN, P., YOKOTA, T., ROTHBARD, J., CHIEN, Y., ARAI, K. i DAVIS, M.M. 1984. Structure, expression and divergence of T-cell receptor beta chain variable regions. *Nature* 312: 40-46.
113. PICARD, D. i SCHAFFNER, W. 1984. A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin κ gene. *Nature* 307: 80-82.
114. POUSTKA, A., POHL, T.M., BERLOW, D.P., FRISCHAUF, A.-M. i LEHRACH, H. 1987. Construction and use of human chromosome jumping libraries from NotI-digested DNA. *Nature* 325: 353-355.
115. RABBITTS, T.H., LEFRANC, M.P., STINSON, M.A., SIMS, J.E., SCHRODER, J., STEINMETZ, M., SPURR, N.L., SOLOMON, E. i GOODFELLOW. 1985. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukemia. *EMBO J.* 4: 1461-1465.
116. RAULET, D., GARMAN, R., SAITO, H. i TONEGAWA, S. 1985. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314: 103-107.
117. RUPP, F., ACHA-ORKEA, H., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. i JOHO, R. 1985. Identical V_{β} T-cell receptor genes used in alloreactive cytotoxic and antigen plus I-A specific helper T

- cells. *Nature* 315: 425-427.
118. SAITO, H., KRANZ, D.M., TAKAGAKI, Y., HAYDAY, A., EISEN, H.N. i TONEGAWA, S. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309: 757-762.
119. SAMELSON, L.E., HARFORD, J.B. i KLAUSNER, R.D. 1985. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43: 223-231.
120. SANGER, F., NICKLEN, S. i COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
121. SCHWARTZ, D.C. i CANTOR, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel eletrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
122. SCHWARTZ, R.H. 1978. A clonal deletion model for Ir gene control of the immune response. *Scand. J. Immun.* 7: 3-6.
123. SCHWARTZ, R.H. 1985. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 237-261.
124. SCOLLAY, R. 1983. Intrathymic events in the differentiation of T lymphocytes: a continuing enigma. *Immunol. Today* 4: 282-286.
125. SESHU, B. 1979. *Curr. Sci.* 48: 919-923.
126. SILVA, A., MACDONALD, H.R., CONZELMANN, A., CORTHESEY, T. i NABHOLZ, M. 1983. Rat x mouse T-cell hybrids with inducible specific cytolytic activity. *Immun. Rev.* 76: 105-129.
127. SIM, G., YAGUE, J., NELSON, J., MARRACK, P., PALMER, E., AUGUSTIN, A. i KAPPLER, J. 1984. Primary structure of human

- T-cell receptor alpha chain. *Nature* 312: 771-775.
128. SNODGRASS, H.R., DEMBIĆ, Z., STEINMETZ, M. i VON BOEHMER, H. 1985. Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus. *Nature* 315: 232-233.
129. SNODGRASS, H.R., KISIELOW, P., KIEFER, M., STEINMETZ, M. i VON BOEHMER, N. 1985. Ontogeny of the T-cell antigen receptor within the thymus. *Nature* 313: 592-595.
130. SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molec. Biol.* 98: 503-517.
131. SOUTHERN, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in Enzymology* 68: 152-576.
132. SPITS, H., VAN SCHOOTEN, W., KEIZER, H. i dr. 1986. Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science* 258: 403-405.
133. STEINMETZ, M. i DEMBIĆ, Z. 1986. Organization, rearrangement and diversification of mouse T-cell receptor genes. *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.* 126: 43-51.
134. STEINMETZ, M. et al. 1984. *EMBO J.* 3: 2995-3003.
135. STEINMETZ, M., STEPHAN, D., DASTOORNIKOO, G.R., GIBB, E. i ROMANIUK, R. 1985. *Methods in Molecular Biology: chromosomal walking in the major histocompatibility complex. U: Immunological Methods Vol. 3* (ed. LEFKOVITS, I. i PERNIS, B.) Academic. New York. 1-19.
136. THOMAS, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205.
137. THOMAS, M., CAMERON, J.R. i DAVIS, R.W. 1974. Viable mole-

- cular hybrids of bacteriophage λ and eukaryotic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 4579-4583.
138. TONEGAWA, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity, Nature 302: 575-581.
139. TOWNSEND, A.R.M., ROTHBORD, J., GOTCH, F.M., BAHADUR, G., WRAITH, D. i McMICHAEL, A.J. 1986. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short syntehtic peptides. Cell 44: 959-968.
140. TRAUNCKER, A., OLIVERI, F., ALLEN, N. i KARJALAINEN, K. 1986. Normal T cell development is possible without functional gamma chain genes. EMBO J. 5: 1589-1593.
141. WANG, J.C. i KAISER, A.D. 1973. Evidence that the cohesive ends of mature λ DNA are generated by the gene A product. Nature New Biol. 241: 16-17.
142. WATTS, T.H., BRIAN, A.A., KAPPLER, J.W., MARRACK, P. i MCCONNELL, H.M. 1984. Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity purified I-A^d. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7564-7568.
143. WIDMER, M., MACDONALD, H. i CEROTTINI, J. 1981. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T lymphocytes. VI. Ontogeny of cytolytic T lymphocyte precursors in the thymus. Thymus 2: 245-255.
144. WILLIAMSON, A.R. 1980. Three-receptor, clonal expansion model for selection of self-recognition in the thymus. Nature 283: 527-532.
145. WILLIAMSON, B. 1982. Gene therapy. Nature 298: 416-418.
146. WINOTO, A., MJOLSNESS, S. i HOOD, L. 1985. Genomic

- organization of the genes encoding mouse T-cell receptor alpha chain. *Nature* 316: 832-836.
147. WU, R. i TAYLOR, E. 1971. Nucleotide sequence analysis of DNA: complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* 57: 491-511.
148. YAGUE, J., WHITE, J., COLECLOUGH, C., KAPPLER, J., PALMER, E. i MARRACK, P. 1985. The T-cell receptor: The alpha and beta chains define idiootype and antigen and MHC specificity. *Cell* 42: 81-87.
149. YOUNG, R.A. i DAVIS, R.W. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1194-1198.
150. ZINKERNAGEL, R.M. i DOHERTY, P.C. 1974. Activity of sensitized thymus derived lymphocytes in choriomeningitis virus reflects immunological surveillance against altered self antigens. *Nature* 251: 547-550.
151. ZINN, K., D'MAIO, D. i MANIATIS, T. 1983. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. *Cell* 34: 865-879.