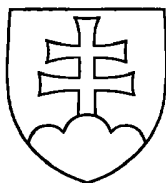


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 19.04.96
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/424 995, 08/483 959
(32) Dátum priority: 19.04.95, 07.06.95
(33) Krajina priority: US, US
(40) Dátum zverejnenia: 06.08.99
(86) Číslo PCT: PCT/US96/05434, 19.04.96

(21) Číslo dokumentu:

1424-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶ :

A 61K 38/17,
39/395, 38/39,
C 12N 15/12,
C 12N 5/10,
C 07K 16/28,
A 01K 67/027,
G 01N 33/50,
G 01N 33/68

(71) Prihlasovateľ: ACORDA THERAPEUTICS, New York, NY, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Schachner Melitta, Zürich, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Rekombinantná molekula DNA, vektor, transformovaný hostiteľ, protilátka, bunková kultúra a bunkový systém, transgénne cicavce, farmaceutický prostriedok, spôsob testovania látky, skúškový systém tohto testovania a použitie farmaceutického prostriedku**

(57) Anotácia:

Je opísaná rekombinantná molekula DNA na podporu rastu in vivo v centrálnej nervovej sústave (CNS) cicavca obsahujúca látku vybranú zo skupiny skladajúcej sa z L1, N-CAM a glykoproteínu asociovaného s myelínom, látku odvodenú z molekúl, ktoré obsahujú štruktúrne motívy podobné homológny opakovaniám 1 až 2 vo fibronektíne typu III a doménam podobným imunoglobínu I až II, III až IV a V až VI, ktoré sú spojené s expresnou kontrolnou sekvenciou, modulácia rastu neurónov v CNS, spôsoby a sprievodné látky, konštrukcie a prostriedky prispievajúce k zlepšeniu rastu neurónov v CNS. Ďalej je opísané používanie bunkových adhézných molekúl, predovšetkým nervových adhézných molekúl, ako aj L1 na podporu a zlepšenie takého rastu neurónov.

Rekombinantná molekula DNA, vektor, transformovaný hostiteľ, protilátka, bunková kultúra a bunkový systém, transgénne cicavce, farmaceutický prostriedok, spôsob testovania látky a skúškový systém tohto testovania a použitie farmaceutického prostriedku

Oblasť techniky

Preložený vynález sa všeobecne týka modulácie rastu neurónov (nervových buniek) v centrálnej nervovej sústave a zvlášť spôsobov a sprievodných látok, konštrukcií a prostriedkov prispievajúcich k zlepšeniu rastu neurónov v centrálnej nervovej sústave. Predložený vynález sa týka najmä používania bunkových adhézných molekúl a predovšetkým nervových adhézných molekúl, ako je L1, za účelom podpory a zlepšenia takéhoto rastu neurónov.

Doterajší stav techniky

Schopnosť neurónov predlžovať neurity je veľmi dôležitá pre tvorbu nervových spojení počas vývoja nervovej sústavy. Táto schopnosť je tiež potrebná na tvorbu nových spojení počas regenerácie, ak bola nervová sústava poškodená v dôsledku poranenia.

Neurity sa predlžujú predovšetkým počas vývoja centrálnej a periférnej nervovej sústavy všetkých druhov vyšších organizmov (Cajal (1928) Degeneration and regeneration in nervous system, Oxford University Press, London). Táto vlastnosť prislúcha axónom a dendritom. Avšak u dospelých organizmov je obnovený rast axónov a dendritov v centrálnej nervovej sústave zastavený.

V periférnej nervovej sústave sú axóny všetkých

stavovcov schopné po spôsobenom poranení opäť rásť (Cajal (1928); Martini (1994) J.Neurocytol. 23:1-28). Avšak u cicavcov je obnovený rast neuritov po poranení obmedzený len na neuritové výbežky. Obnovený rast v nervových procesoch je však možný u nižších druhov stavovcov (Stuermer et al. (1992) J.Neurobiol. 23:537-550). Naopak v centrálnej nervovej sústave má potenciál pre obnovený rast neuritov väčšina, ak nie všetky neuróny dospelých vyšších aj nižších stavovcov (Aguayo (1995) "Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system." In: Synaptic Plasticity (Cotman, C. W., ed.) New York, The Guildford Press, pp.457-484).

Gliové bunky sú rozhodujúce determinanty kontrolujúce obnovený rast axónov. Gliové bunky cicavcov všeobecne umožňujú rast neuritov v centrálnej nervovej sústave počas vývoja (Silver et al. (1982) J. Comp. Neurol. 210:10-29; Miller et al. (1985) Develop. Biol. 111:35-41; Pollerberg et al. (1985) J. Cell. Biol. 101:1921-1929 a v periférnej nervovej sústave dospelých jedincov (Fawcett et al. (1990) Annu. Rev. Neurosci. 13:43-60). Gliové bunky dospelej periférnej nervovej sústavy cicavcov môžu po spôsobenom poranení revertovať do určitého rozsahu na ich predchádzajúci rastový potenciál, čo im umožňuje podporovať regeneráciu (Kalderon (1988) J. Neurosci. Res. 21:501-512; Kliot et al. "Included regeneration of dorsal root fibres into the adult mammalian spinal cord," In: Current Issues in Neural Regeneration, New York, pp. 311-328; Calstedt et al. (1989) Brain Res. Bull. 22:93-102). Gliové bunky centrálnej nervovej sústavy niektorých nižších stavovcov zostávajú permissívne na rast neuritov v dospelosti (Stuermer et al. (1992) J. Neurobiol. 23:537-550). Naopak gliové bunky centrálnej nervovej sústavy dospelých cicavcov nie sú schopné podporovať obnovenie rastu neuritov po poranení.

Niekoľko rozpoznávacích molekúl, ktoré vydávajú pokyn na podporu alebo zastavenie rastu neuritov bolo identifikovaných (Martini (1996)). Medzi rozpoznávacími

molekulami podporujúcimi rast neuritov má prominentný význam nervová bunková adhézna molekula L1 (Schachner (1990) *Seminars in the Neurosciences* 2:497-507). Rast neuritov závislý na molekule L1 je sprostredkovaný homofilnou interakciou. L1 zosilňuje rast neuritov na neuritoch a Schwannových bunkách, ktoré exprimujú L1, a na fibroblastoch transfekovaných molekulou L1 (Bixby et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:2555-2559; Chang et al. (1987) *J. Cell Biol.* 104:355-362; Lagenaur et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7753-7757; Seiheimer et al. (1988) *J. Cell Biol.* 107:341-351; Kadmon et al. (1990a) *J. Cell Biol.* 110:193-208; Wililams et al. (1992) *J. Cell Biol.* 119:883-892). Expresia L1 je značne zosilnená u dospelých myší po prerušení periférnych nervov (Nieke et al. (1985) *Differentiation* 30:141-151; Martini et al (1994a) *Glia* 10:70-74). Počas dvoch dní sa L1 nahromadí v miestach kontaktu medzi neurónmi a Schwannovými bunkami, kde sú koncentrované hlavne na bunkovom povrchu Schwannových buniek, a nie neurónov (Martini et al. (1994a)). Schopnosť homofilickej väzby molekuly L1 je ďalej zosilnená molekulárnou asociáciou s nervovou bunkovou adhéznou molekulou N-CAM (Kadmon et al. (1990a); Kadmon et al. (1990b) *J. Cell Biol.* 110:209-218 a 110:193-208; Horstkorte et al. (1993) *J. Cell Biol.* 121:1409-1421). Okrem svojich vlastností, ktoré podporujú rast neuritov, sa L1 zúčastňuje tiež na bunkovej adhézii (Rathjen et al. (1984) *EMBO J.* 3:1-10; Kadmon et al. (1990b) *J. Cell Biol.* 110:209-218; Appel et al. (1993) *J. Neurosci.* 13:4764-4775), ďalej na migrácii granulových buniek (Lindner et al. (1983) *Nature* 305:427-430) a tiež na myelinácii axónov (Wood et al. (1990) *J. Neurosci.* 10:3635-3645).

L1 obsahuje šesť imunoglobulínových domén a päť homológnych opakovaní podobných fibronektínu typu III. L1 pôsobí ako signálový prevodník, pričom proces rozpoznávania je prvým krokom v komplexnej sérii udalostí vedúcich ku zmenám v ustálenej úrovni intracelulárnych poslov. Týchto

poslov zahŕňajú inozitol fosfáty, Ca^{2+} , pH a cyklické nukleotidy. (Schuch et al. (1990) Neuron 3:13-20; von Bohlen a Hallbach et al. (1992) Eur. J. Neurosci. 4:896-909; Doherty et al. (1990) Curr. Opin. Neurobiol. 2:595-601), rovnako ako zmeny v aktivitách proteín kináz, ako sú proteín kináza C a pp60^{c-src} (Schuch et al. (1990) Neuron 3:13-20; Atashi et al. (1992) Neuron 8:831-842). L1 je tiež asociovaná s kazeín kinázou typu II a inými neidentifikovanými kinázami, ktoré L1 fosforizujú (Sadoul et al. (1989) J. Neurochem. 328:251-254). Rast neuritov sprostredkovaný molekulou L1 je citlivý na blokovanie kanálu Ca^{2+} typu L a na toxíny čierneho kašľa (pertussis). Tieto nálezy ukazujú na dôležitosť kanálu Ca^{2+} a proteínov G pri raste neuritov sprostredkovanom molekulou L1 (Williams et al. (1992) J. Cell Biol. 119:883-892). Molekula L1 je tiež prítomná na proliferujúcich, nezrelých astrocytoch v kultúre. Neuritový rast je na týchto bunkách podporovaný oveľa lepšie na nediferencovaných, L1 imunonegatívnych, astrocytoch (Saad et al. (1991) J. Cell Biol. 115:473-484). Avšak v podmienkach in vivo bolo zistené, že astrocyty exprimujú L1 počas akéhokoľvek vývojového stavu začínajúc 13. dňom embryonálneho vývoja až do dospelosti (Bartsch et al. (1989) J. Comp. Neurol. 284:451-462; a nepublikované údaje).

Ak má L1 kapacitu podporovať rast neuritov, je nutné zistiť, či expresia L1 a iných členov imunoglobulínovej rodiny v astrocytoch môže obísť potenciálne inhibičné molekulárne cesty, ktoré sa uvádzajú, že sú prítomné na gliových bunkách a myelíne v dospeljej centrálnej nervovej sústave Schachner et al., Perspectives in Developm. Neurobiol. in Press: Schwab et al. (1993) ann. Rev. Neurosci. 16:565-595). Toto má zvláštny význam pre vývoj účinných stratégií slúžiacich na liečbu slabosti spôsobenej porušením alebo poranením nervových tkanív CNS a týka sa to podstaty tohoto vynálezu.

Podstata vynálezu

V súlade s predloženým vynálezom je opísaná látka a príslušné spôsoby vedúce k modulácii nervového rastu a najmä k takému rastu, ktorý môže byť podporovaný v centrálnej nervovej sústave (CNS) a predovšetkým v myelinovanom nervovom tkanive. Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, sú význačné vo svojej schopnosti podporovať taký nervový rast v prostredí, na ktoré sa tradične pozeralo ako na inhibujúce známe rastové faktory. Toto inhibujúce prostredie zahŕňa hlavne tie inhibičné molekuly, ktoré sú prítomné na gliových bunkách a myelíne centrálnej nervovej sústavy.

Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, patria do skupiny nervových bunkových adhézných molekúl. Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, sú vybrané zo skupiny molekúl patriacich do imunoglobulínovej rodiny, obzvlášť tých členov, ktorí sprostredkovávajú nervovú bunkovú adhéziu nezávislú na Ca^{2+} . Do tejto skupiny patria L1, N-CAM a glykoproteín asociovaný s myelínom. Iné bunkové adhézne molekuly, ktoré môžu tiež ovplyvňovať nervový rast v CNS sú laminín, fibronektín, N-cadherín, BSP-2 (myši N-CAM), D-2, 224-1A6-A1, L1-CAM, NILE, Nr-CAM, TAG-1 (axonín), Ng-CAM a F3/F11.

Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, patria do novej rodiny tu uvádzanej ako rodina L1 nervových rekogničných molekúl. Táto rodina zahŕňa L1, NgCAM, neurofascín, neuroglian z *Drosophily*, L1.1 a L1.2 zo zebričky a iné molekuly. Táto skupina látok obsahuje domény podobné imunoglobulínu a opakovanie podobné fibronektínu, ktoré sú charakteristické u L1 a v tejto súvislosti vykazujú pozoruhodnú kolinearitu, vysoký stupeň N-glykozidicky spojených karbohydrátov, ktoré zahŕňajú karbohydrátovú štruktúru HNK-1, a vykazujú vzor proteínových fragmentov obsahujúcich hlavný pruh 185 kD a menšie pruhy 165 a 125 kD.

Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, tiež

zahŕňajú fragmenty bunkových adhézných molekúl a ich napodobeniny, ktoré modulujú rast neuritov v CNS. Tieto látky zahŕňajú zvlášť molekuly, ktoré obsahujú štruktúrne motívy charakteristické pre extracelulárny matrix, najmä opakovania podobné fibronektínu typu III a doménam podobným imunoglobulínu. Tieto štruktúrne motívy zahŕňajú predovšetkým tie, ktoré sú štruktúrne podobné opakovaniam 1 až 2 u fibronektínu typu III a doménam podobným imunoglobulínu I až II, III až IV a V až VI.

Predložený vynález sa týka spôsobov podporujúcich a zosilňujúcich nervovú regeneráciu in vivo a príslušných genetických konštrukcií, ako sú plazmidy, vektory, transgény, apod., a tiež farmaceutických prostriedkov, ktoré môžu byť použité na zvládnutie podstaty týchto spôsobov. Látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, môžu byť pripravené najmä ako vektory alebo plazmidy a vnesené do nervových buniek centrálnej nervovej sústavy, teda tam, kde je regenerácia potrebná, napr. technikami génovej terapie tak, aby došlo k podpore požadovaného nervového rastu. Iná stratégia má za cieľ formuláciu jednej alebo viacerých látok v prostriedku, ktorý môže byť podobne priamo dopravený na miesto CNS, ako je parenterálne podanie. Podanie takéhoto prostriedku môže skôr slúžiť za účelom inhibície než podpory nervového rastu vplyvom homofilickej väzby. Tento efekt môže byť potrebný v zvláštnych prípadoch, kde sa môže objaviť alebo sa už objavuje nežiadúci alebo nekontrolovateľný rast, čoho sa rozšírene týka tento vynález.

V zhode s tým schopnosť látok podieľať sa na homofilickej väzbe spôsobuje schopnosť antagonistov k týmto látkam, vrátane protilátok, pôsobiť ako aktivátory a tým participovať na podpore nervového rastu a regenerácii. Tento vynález sa tak rozšírene týka aj prípravy vhodných konštrukcií a prípravkov obsahujúcich protilátky k týmto látkam za účelom terapeutického použitia. Protilátky k L1 môžu tiež, napr., napomáhať sčasti ku skúškam vedúcim k objavu týchto látok alebo k identifikácii ďalších látok,

ktoré môžu mať aktivitu a využitie ako v diagnostike, tak aj v terapii, v zhode s predloženým vynálezom. Hlavne, ako je opísané nižšie s odkazom na izoláciu a charakterizáciu CHL1, čo je analóg L1, protilátky ako polyklonálne protilátky môžu byť použité na identifikáciu ďalších členov rodiny L1 CAM molekúl. Predložený vynález sa teda rozšírenie týka aj takýchto členov CAM, ktoré sú izolované použitím týchto protilátok. Tento vynález tiež zahŕňa diagnostické aplikácie, kde je napríklad potrebné určiť potenciál pre nervový rast, alebo pre aktuálny vývoj tohoto rastu v CNS pomocou detekcie a merania prítomnosti, množstva a aktivity jednej alebo viacerých látok, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu. Podobne, ako je opísané nižšie, tento vynález sa týka skúšok, vrátane skúšok vedúcich k objavu týchto látok, ktoré aktivujú látky, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu. Napr., nejaké látky môžu byť testované na moduláciu pomocou skúšky obsahujúcej látku, ktorá je predmetom predloženého vynálezu, alebo bunkovú líniu alebo kultúru vyvinutú v spojení s ňou.

Krátko opísané, predložený vynález tiež zahŕňa transgénne myšie línie exprimujúce nervovú adhéziu molekulu v diferencovaných astrocytoch a gliových bunkách a v bunkách a v tkanivách z nich odvodených. Toto sa týka obzvlášť nervovej adhéznej molekuly L1. Astrogliálna expresia L1 zosilňuje rast neuritov v tkanive centrálnej nervovej sústavy odvodennej z týchto transgénnych myší.

Tiež, ako je opísané, tento vynález zahŕňa spôsoby vedúce k zosilneniu rastu neurónov CNS, k zlepšeniu pamäti a ku zvýšeniu synaptickej výkonnosti, ako je to merané pomocou stabilizácie dlhodobej potenciácie a inými podobne užitočnými metódami. Zahrnuté sú tiež spôsoby testovania látok a iné manipulácie, ktoré upravujú pôsobenie tejto nervovej adhéznej molekuly.

V zhode s tým je hlavnou podstatou tohoto vynálezu poskytnúť transgénny organizmus cicavca, ktorého gliové bunky exprimujú exogénne nervové adhézne molekuly.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť bunkovú kultúru obsahujúcu gliové bunky transgénneho organizmu cicavca.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť systém bunkovej kultúry obsahujúci poškodené alebo nepoškodené optické neuróny alebo iné časti nervového systému transgénneho organizmu cicavca.

Ešte ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako posilniť nervový rast neurónov CNS, ktorý zahŕňa pestovanie týchto neurónov na systéme kultúry gliových buniek.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob ako posilniť nervový rast neurónov CNS, ktorý zahŕňa pestovanie týchto neurónov na optických neurónoch alebo iných častiach nervového systému umiestnenom v systéme bunkovej kultúry.

Ešte ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako posilniť rast neurónov CNS, ktorý zahŕňa sekréciu nervovej adhézneho molekuly implantovanou bunkou.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť pamäť, čo zahŕňa aplikáciu množstva buniek optického nervu alebo iných častí nervového systému umiestnených v systéme bunkovej kultúry do mozgu cicavca za účelom zlepšenia pamäti.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť pamäť, zahŕňajúce dopravenie vektoru, ktorý umožňuje expresiu nervovej adhézneho molekuly v gliových bunkách, ku gliovým bunkám mozgu cicavca, ktorý má potrebu takéhoto zlepšenia pamäti.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť pamäť, čo zahŕňa sekréciu nervovej adhézneho molekuly implantovanou bunkou.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť synaptickú účinnosť v CNS cicavca, ktorý má túto potrebu, zahŕňajúci podávanie množstva buniek systému gliovej bunkovej kultúry do mozgu cicavca.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť synaptickú výkonnosť v CNS cicavca, ktorý má túto potrebu, zahŕňajúci podávanie množstva buniek optického nervu alebo iných častí nervového systému umiestnených v systéme bunkovej kultúry do mozgu cicavca.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť synaptickú účinnosť v CNS cicavca, ktorý má túto potrebu, čo zahŕňa dopravenie vektoru, ktorý umožňuje expresiu nervovej adhézneho molekuly v gliových bunkách, do gliových buniek mozgu cicavca.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob, ako zlepšiť synaptickú výkonnosť, čo zahŕňa sekréciu nervovej adhézneho molekuly implantovanou bunkou.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob testovania schopnosti látky alebo inej entity modulovať aktivitu nervovej adhézneho molekuly, čo zahŕňa pridanie neurónov CNS do systému gliovej bunkovej kultúry; pridanie testovanej látky do systému bunkovej kultúry; meranie neuronálneho rastu neurónov CNS; korelovanie rozdielu v úrovni neuronálneho rastu buniek v prítomnosti tejto látky voči kontrolnej kultúre, do ktorej nebola pridaná žiadna látka.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť spôsob testovania schopnosti látky alebo inej entity modulovať aktivitu nervovej adhézneho molekuly, čo zahŕňa pridanie neurónov CNS do optického nervu alebo iných častí nervového systému bunkovej kultúry; pridanie testovanej látky do systému bunkovej kultúry merania neuronálneho rastu neurónov CNS; korelovanie rozdielu v úrovni neuronálneho rastu buniek v prítomnosti tejto látky voči kontrolnej kultúre, do ktorej nebola pridaná žiadna látka.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť testovací systém na skúšanie látok na ich schopnosť modulovať produkciu nervovej adhézneho molekuly, čo zahŕňa systém gliovej bunkovej kultúry a neurónov CNS pridaných do tohoto systému.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť testovací systém na skúšanie schopnosti látok modulovať produkciu nervovej adhéznej molekuly, čo zahŕňa pestovanie systému gliovej bunkovej kultúry zaočkovanej týmito látkami; pridanie neurónov CNS do systému bunkovej kultúry; a sledovanie neuronálneho rastu za účelom stanovenia vplyvu látky.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť testovací systém na skúšanie schopnosti látok modulovať produkciu nervovej adhéznej molekuly, čo zahŕňa pestovanie optického nervu alebo iných častí nervového systému umiestneného v systéme bunkovej kultúry zaočkovanej týmito látkami; pridanie neurónov CNS do systému bunkovej kultúry; a sledovanie neuronálneho rastu za účelom stanovenia vplyvu látky.

Ďalšou podstatou tohoto vynálezu je poskytnúť testovací systém na skúšanie schopnosti látok modulovať produkciu nervovej adhéznej molekuly, čo zahŕňa zaočkovanie kultúry neurónov CNS týmito látkami; pridanie rozpustnej nervovej adhéznej molekuly; a sledovanie neuronálneho rastu za účelom stanovenia vplyvu látky.

Iné podstaty a výhody sa stanú zjavnými odborníkom v odbore z prehľadu následného podrobného opisu uvedeného s odkazom na obrázky.

Prehľad obrázkov na výkrese

Obr.1 ukazuje mapu chimérického transgénu GFAP-L1. Myšia cDNA L1 dlhá 4,05 kb bola vnesená do exónu 1 upraveného génu GFAB pomocou linkerov NotI. V tejto konštrukcii je pred cDNA L1 miesto zostrihu neskorého génu SV40 (V) a za cDNA L1 je polyadenylačné signálové miesto (pA) SV40. Umiestnenie kodónu ATG od L1 a polyadenylačný signál sú znázornené. Exóny sú znázornené ako obdĺžniky.

Obr.2 ukazuje analýzu Northern blot RNA z mozgu pochádzajúcu z rôznych transgénnych línií. 10 µg celkovej RNA z celého dospelého mozgu bolo nanosených do každej dráhy a bolo próbovaných myšou cDNA L1. Doba expozície bola 3 dni. Dráhy 1 až 3, mozgy od rôznych transgénnych mláďat (dráha 1: línia 3426; dráha 2: línia 3427; dráha 3: línia 3418; dráha 4: mozog z netransgénnej kontroly). Je vidieť, že hladina transgénnej mRNA L1 (šípka) je rôzna pri troch transgénnych líniách, pričom najvyššia je pri líni 3426, stredná pri líni 3427 a najnižšia pri líni 3418. Pozícia rRNA 28S a 18S je ukázaná na pravom okraji.

Obr.3 ukazuje umiestnenie mRNA L1 v dospelých nepoškodených (A, C a E) a poškodených (15 dní po poškodení, B a D) optických nervoch z netransgénnej (A, B a E) a transgénnej myši (C a D) z línie 3426 metódou hybridizácie in situ. U zvierat divokého typu je mRNA L1 detekovateľná len v neuronálnych bunkách sietnice, ale nie v gliových bunkách optického nervu (A a B). U transgénnych zvierat sú viditeľné bunky obsahujúce transkripty L1 v optickom nerve (C a D). Hustota buniek pozitívnych na L1 je najvyššia v nemyelínovej bližšej časti nervu. Hustota buniek pozitívnych na L1 v nerve je mierne zvýšená po poškodení (porovnajte C a D). Rozmiestnenie buniek exprimujúcich L1 (C a D) je v optickom nerve podobné ako u buniek

exprimujúcich GFAB (E). Meradlo u E je 100 μ m (pre A až E).

Obr.4 ukazuje dvojité imuno fluorescenčné mikroskopické lokalizácie L1 (A a B) a GFAP (C) nepoškodených (A a C) a poškodených (28 dní po poškodení, B) optických nervov z dospelých transgénnych zvierat (lína 3426, A a B) a zvierat divokého typu (C). Imunoreaktivita L1 v optických nervoch transgénnych zvierat je podstatne zvýšená po poškodení (porovnaj A a B). Vzor imunoreaktivity L1 pri poškodených transgénnych nervoch je podobný vzoru imunofarbenia GFAP v nepoškodených nervoch divokého typu. Gandliónové axóny nemyelinovaných sietnicových buniek pozitívnych na L1 sú prítomné v nepoškodenom nerve divokého typu (A). Meradlo u C je 50 μ m (pre A až C).

Obr.5 ukazuje dvojité imuno fluorescenčné mikroskopické lokalizácie L1 (A a D) a GFAP (B a E) v pestovaných astrocytoch z transgénnych zvierat línie 3426 (A, B a C) a zvierat divokého typu (D, E a F). Je vidieť, že len bunky z transgénnych zvierat exprimujú L1, a astrocyty zo zvierat divokého typu sú negatívne na L1. Meradlo u F je 30 μ m (pre A až F).

Obr.6 ukazuje (A) analýzu Western blot poškodených (15 dní po poškodení) a nepoškodených optických nervov z transgénnych zvierat a zvierat divokého typu. 25 μ g celkového proteínu poškodených (dráhy 1, 3 a 5) alebo nepoškodených nervov (dráhy 2, 4 a 6) bolo nanosených a detekovaných pomocou polyklonálnych protilátok afinitne purifikovaných proti L1. Proteínové extrakty boli pripravené z myšej transgénnej línie 3426 (dráhy 1 a 2), 3427 (dráhy 3 a 4) a zo zvierat divokého typu (dráhy 5 a 6). Je vidieť zvýšenie v expresii L1 u transgénnych zvierat v porovnaní s netransgénymi kontrolami. Po poškodení optického nervu sa zvýšenie množstva L1 objavilo u transgénnych zvierat, a naopak množstvo L1 u zvierat

divokého typu kleslo. Molekulové hmotnosti (v kD) sú vyznačené na ľavom okraji.

Obr.7 ukazuje príklady rastu neuritov z myších cerebelárnych neurónov pestovaných na kryostatových sekciách optických nervov divokého typu (A a B) a transgénnych (C a D) zvierat (línia 3426). A a C predstavujú nepoškodené optické nervy, B a D reprezentujú poškodené optické nervy. Meradlo u D je 50 μm (pre A až D).

Obr.8 ukazuje a porovnáva dĺžky neuritov cerebelárnych neurónov udržiavaných na kryostatových sekciách nepoškodených (c) a poškodených (l) optických nervoch (28 dní po poškodení) zo zvierat divokého typu (WT) a transgénnych zvierat (línia 3426, 3427 a 3418). Je vidieť, že dĺžka neuritov na sekciách z transgénnych zvierat je väčšia než na sekciách zo zvierat divokého typu. Neurity transgénnych línii sú vždy dlhšie na poškodených než na nepoškodených nervoch. Na druhej strane dĺžky neuritov na nepoškodených alebo poškodených nervoch zvierat divokého typu nevykazujú významný rozdiel. Je vidieť, že dĺžka neuritov koreluje pozitívne s hladinou expresie L1 pri rôznych transgénnych líniiach (viď tiež údaje z analýzy Western blot). Stredná hodnota $\pm$ štandardná odchýlka priemeru od jedného reprezentatívneho pokusu (z 12) je znázornená.

Obr.9 je graf znázorňujúci dĺžky neuritov cerebelárnych neurónov udržiavaných na kryostatových sekciách nepoškodených (c) a poškodených (l) optických nervov (28 dní po poškodení) zo zvierat divokého typu (WT) a transgénnych zvierat bez preinkubácie a po preinkubácii sekcií s afinitne purifikovanými polyklonálnymi protilátkami proti L1 (anti L1) a proti myším pečenovým membránam (anti pečeň). Neuritové dĺžky na neurónoch bez preinkubácie s akýmikoľvek protilátkami boli vzaté, ako 100% a neuritové dĺžky na sekciách tých istých neurónov získaných po pôsobení

protilátky boli vyjadrené v pomere k tejto hodnote. Významné zníženie (60%) dĺžky neuritov pôsobením protilátok proti L1 bolo zistené na kryostatových sekciách z transgénnych zvierat. Čísla hore predstavujú celkový počet neurónov meraných pre každú hodnotu. Stredné hodnoty $\pm$ štandardná odchýlka sú z najmenej štyroch nezávislých experimentov vykonaných vo dvojici.

Obr.10 ukazuje a porovnáva neuritové dĺžky myších cerebelárnych (A) a kuracích DRG (B) neurónov na povrchu astrocytov pripravených zo zvierat divokého typu (WT) a transgénnych zvierat (lína 3426) v neprítomnosti protilátok a po preinkubácii sekcií s afinitne purifikovanými polyklonálnymi protilátkami proti L1 (anti L1) a proti myším pečňovým membránam (anti pečň). Neuritové dĺžky na astrocytoch bez preinkubácie s akýmikoľvek protilátkami boli vzaté ako 100% a neuritové dĺžky na povrchu astrocytov získaných po pôsobení protilátky boli vyjadrené v pomere k tejto hodnote. Významné zníženie (približne 40%) dĺžky neuritov je vidieť len na transgénnych astrocytoch po preinkubácii povrchov s protilátkami proti L1. Stredná hodnota $\pm$ štandardná odchýlka sú vzaté z najmenej 100 neurónov z dvoch nezávislých experimentov vykonaných v štvorici. * uvádza stredné hodnoty, ktoré sa podstatne líšili ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test) z kontroly (astrocyty divokého typu alebo transgénne bez pôsobenia protilátok).

Obr.11 demonštruje obnovený rast axónov in vivo v optickom nerve (0 až 2000 μm). 6 až 8 týždňov staré transgénne myši GFAP L1 a myši divokého typu boli poranené a po 14 dňoch sledované na biotínový ester značený fluoresceínom za účelom označenia gangliónových axónov anterostupňovým značením. Každý bod reprezentuje jedno zviera.

Obr.12 ukazuje obnovený rast axónov in vivo v optickom nerve (0 až 800 μm). 6 až 8 týždňov staré transgénne myši GFAP L1 a myši divokého typu boli poranené a po 14 dňoch sledované na biotínový ester značený fluoresceínom za účelom označenia gangliónových axónov anterostupňovým značením. Každý bod reprezentuje jedno zviera.

Obr.13 ukazuje vplyv injekovania kuracích protilátok proti L1 do IMHV na vyhýbacom teste (strata pamäti) v jednoskúškovom pasívnom vyhýbacom cvičení. Každý bod reprezentuje skupinu vtákov, ktoré dostali injekcie protilátok proti L1 (anti L1) (uzavreté kruhy) alebo fyziologického roztoku (otvorené štvorce) v čase vzhľadom na uvedené cvičenie. Všetky zvieratá boli testované 24 hodín po cvičení (*, $p < 0,05$ medzi fyziologickým roztokom a skupinou protilátok, ksi^2).

Obr.14 porovnáva dva grafy ukazujúce vplyv injekcií Ig I až IV a fragmentov FN v čase -30 min. a +5,5 hod. na udržanie pamäte pri pasívnom vyhýbacom cvičení. Všetky zvieratá boli testované 24 hodín po cvičení. Počet zvierat v každej skupine je znázornený na histogramoch (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$).

Obr.15 porovnáva sériu grafov ukazujúcich vplyv protilátok proti L1 (anti L1) na LTP v pyramídálnych neurónoch v oblasti CA1 krysích hypokampálnych rezov.

a) Priemerné ($n=4$) EPSP zaznamenané pred a 50 min. po (šípka) TBS v kontrolnom mieste, ktoré nebolo injektované protilátkou.

b) Priemerné ($n=4$) EPSP zaznamenané pred a 50 min. po TBS (šípka) za prítomnosti králičích polyklonálnych protilátok proti L1 (Rathjen et al. (1984)).

c) Časový sled EPSP počiatočného sklonu pred a po TBS za prítomnosti protilátok proti L1 (frakcia IgG, koncentrácia 6,2 mg/ml) alebo polyklonálnych protilátok

imunoglobulínovým doménam I až IV rekombinantne exprimovaným v bunkách CHO (Hynes (1992) Cell 369:11-25) (antisérum obsahujúce približne 1 mg/ml špecifických protilátok) a nasledujúcich kontrôl:

- (1) Kontrola LTP (žiadne protilátky),
- (2) za prítomnosti frakcie IgG polyklonálnych protilátok proti myším pečňovým membránam (3,5 mg/ml), ktoré silne reagujú s krysími hypokampálnymi rezmi (Lindner et al. (1983) Nature 305:427-430),
- (3) v prítomnosti králičieho neimúnneho séra a
- (4) za prítomnosti protilátok proti L1 bez indukcie LTP s TBS (6,2 mg/ml; viď tiež e,f). Výsledky sú vyjadrené ako stredné hodnoty $\pm$ S.E.M z percent počiatočného sklonu EPSP zo základnej hodnoty zaznamenananej počas 20 min. pred TBS (n=5) z rezu z najmenej 3 zvierat; hodnoty LTP za prítomnosti protilátok proti L1 sa líšia od kontrol LTP v $p < 0,001$ pre protilátky proti L1 a v $p < 0,01$ pre protilátky proti imunoglobulínovým doménam I až IV.

d) Koncentračná závislosť poklesu v LTP pôsobením frakcie IgG polyklonálnych protilátok proti L1 (koncentrácia 6,2 mg/ml); 2 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,06 mg/ml; $p < 0,0001$. Ako kontrola sú uvedené výsledky z polyklonálnych protilátok proti membránam pečene (3,5 mg/ml).

e) Priemerné (n=4) EPSP zaznamenananej pred a 60 min. po (šípka) podanie polyklonálnych protilátok oproti L1 bez prítomnosti TBS. f) Priemerné (n=4) intracelulárne excitačné postsynaptické prúdy (EPSP) zaznamenané pred a 30 min. po (šípka) podanie polyklonálnych protilátok proti L1 bez prítomnosti TBS.

Obr.16 demonštruje vplyv imunoglobulínových domén I až IV, polyklonálnych protilátok proti NCAM a oligomanosidových glykopeptidov na LTP.

a) časový sled počiatočného sklonu EPSP pred a po TBS za prítomnosti imunoglobulínových domén I až IV (216 μ g/ml; 3,2 mM; v 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $p < 0,01$)

a fibronektínových (FN) homológnych opakovaní I až V (225 µg/ml; 3,8 mM; v 20 mM Tris/HCl pH 7,6) od L1 v porovnaní s kontrolnou LTP (20 mM Tris/HCl pH 7,6).

b) časový sled počiatočného sklonu EPSP pred a po TBS za prítomnosti protilátok proti NCAM (frakcia IgG, 3,9 mg/ml), antiséra proti axonínu-1, a nasledujúce kontroly:

- (1) neimúnne králičie sérum,
- (2) frakcia IgG neimúnneho králičieho séra (3,0 mg/ml)
- a (3) za prítomnosti protilátok proti NCAM (3,9 mg/ml, $p < 0,06$) bez indukcie LTP s TBS. c) časový sled počiatočného EPSP pred a po TBS za prítomnosti oligomannozidových glykopeptidov, kontrolných glykopeptidov odvodených z azialofetuínu (približne 100 µM) a bez prítomnosti glykopeptidov. Výsledky sú vyjadrené ako stredné hodnoty $\pm$ S.E.M z percent počiatočného sklonu EPSP zo základnej hodnoty zaznamenatej počas 20 min. pred TBS (n=5 alebo 6) z rezov z najmenej 3 zvierat.

Obr.17 graficky ukazuje vplyv protilátok proti L1 a oligomannozidových karbohydrátov na predtým stanovenú LTP a na synaptickú transmisu sprostredkovanú receptormi NMDA.

a) časový sled počiatočného sklonu EPSP pred a po TBS za prítomnosti protilátok proti L1 aplikovaných ako počas pokusu (6,2 mg/ml), tak aj po 10 min. od TBS (6,2 mg/ml).

b) časový sled počiatočného EPSP pred a po TBS za prítomnosti oligomannozidových karbohydrátov aplikovaných ako počas pokusu (100 µM), tak aj po 20 min. od TBS (100 µM).

c) Priemerný (n=4) EPSP receptora NMDA zaznamenaný za prítomnosti CNQX (30 µM) pred a po 30 min. (šípka) aplikácii protilátok proti L1. d) Priemerný (n=4) EPSP receptora NMDA zaznamenaný za prítomnosti CNQX (10 µM) pred a po 60 min. (šípka) aplikácii oligomannozidových karbohydrátov. Výsledky v a) a b) sú vyjadrené ako stredné hodnoty $\pm$ S.E.M z percent počiatočného sklonu EPSP zo základnej hodnoty zaznamenatej

počas 20 min. pred TBS (n=5 z rezov z najmenej 3 zvierat).

Obr.18 ukazuje nukleotidovú sekvenciu 4,43 kb dlhého inzertu cDNA v klone pX#2 a odvodenú aminokyselinovú sekvenciu myši CHL1. Najdlhší otvorený čítací rámec (bp 296 až bp 3922) obsahuje 1209 aminokyselín a je zakončený terminačným kodónom TGA. Dve hydrofóbne oblasti predstavujú signálny peptid (aminokyseliny 1 až 24) a transmembránovú oblasť (1082 až 1104) sú podtrhnuté. Dve šípky ukazujú 5' a 3' konce klonu 311 izolovaného z knižnice lambda gt11. Potenciálne miesta pre glykozidáciu na asparagíne (Hubbart a Ivatt, 1981) sú označené pod aminokyselinovou sekvenciou plnými znakmi diamantu. Imunoglobulínové domény sú číslované rímskymi číslovkami od I do VI pod konzervovaným tryptofánom. Charakteristické cysteíny sú označené krúžkom. Opakovania podobné FN sú číslované F1 až F5 a charakteristické tryptofány (chýbajúce v F1, F2: W 732, F3: W 830, F4: W 936, F5: W1053) a tyrozíny/fenylalaníny (F1: Y 682, F2: Y 781, F3: F 888, F4: Y989, chýba u F5) sú zarámované. Zátvorka zvýrazňuje sekvencie RGD a DGEA (aminokyselinové zvyšky 185 až 187 a 555 až 558). Netranslatované sekvencie sú označené číslami kurzívou. Sekvenčné údaje sú dostupné z EMBL/Genebank/DDBJ pod číslom X94310.

Obr.19 ukazuje doménovú štruktúru, kódujúcu oblasť bakteriálne exprimovaného proteínového fragmentu a graf hydrofobicity myši CHL1.

(a) diagram znázorňuje štruktúralne rysy odvodené z primárnej sekvencie CHL1. Čísla uvádzajú aminokyselinovú sekvenciu od miesta počiatku translácie. Imunoglobulínové domény I až IV sú označené polovičnými krúžkami (čísla aminokyselín uvádzajú cysteíny tvoriace disulfidové mostíky). Opakovania podobné FN 1 až 5 sú symbolizované orámovaním (čísla aminokyselín uvádzajú hranice domény). Potenciálne miesta pre N-glykosidáciu sú označené plnými

krúžkami. Signálny peptid a transmembránová oblasť je vyznačená zubatým orámovaním.

(b) Podčiarknutie vyznačuje pozíciu cDNA kódujúca rekombinantný proteín produkovaný v *E. coli*.

(c) Graf hydrofobicity (Kyte a Doolittle, 1982) odvodennej aminokyselinovej sekvencie ukazuje charakteristické rysy integrálneho membránového proteínu s putatívnou hidrofóbnou signálnou sekvenciou a transmembránovou doménou (*). Pozitívne hodnoty označujú hydrofobicitu. Číslovanie v súradniciach uvádza pozíciu aminokyseliny.

Obr.20 ukazuje porovnanie intracelulárnych domén molekúl rodiny L1. Sekvencia intracelulárnych domén začínajúcich prvým aminokyselinovým zvyškom po putatívnych transmembránových oblastiach sú porovnané pre myši CHL1, myši L1, kurací Nr-CAM, kurací Ng-CAM, kurací neurofascín, *Drosophila neuroglia* a L1.2 zo zebričky. Čísla uvádzajú pozície aminokyselín u CHL1 a šedé orámovanie vyznačuje medzery vykonané do sekvencie CHL1. Totožné aminokyseliny, ktoré sú vo väčšine sekvencií, sú vyznačené čiernou farbou. Tri zátvorky (I, II a III) vyznačujú vysoko konzervované úseky.

Obr.21 je analýza Northern blot mRNA CHL1 a L1 z rôznych tkanív myši a krysy.

(a) Poly (A) RNA (2µg) z mozgu bez cerebella (dráhy 1 až 5), miechy (dráhy 3, 7) a dorzálnych koreňových ganglií (dráhy 4, 8) a celkovej RNA (10µg) z cerebella (dráhy 2, 8) z deväť dní starej myši hybridizované s ribopróbami CHL1 (dráhy 1 až 4) alebo L1 (dráhy 5 až 8). Poly (A) RNA (1 µg) z ľadvín (dráha 9), slinivky (dráha 10), pečene (dráha 11), týmusu (dráha 12) a poly (A) RNA (0.5 µg) z čriev (dráha 13) a pľúc (dráha 14) z deväť dní starej myši boli hybridizované s ribopróbou CHL1.

(b) Celková RNA (20 µg) PC12 buniek indukovaných

(dráha 1) a neindukovaných (dráha 2) s NGF, buniek COS-1 (dráha 3) a celková RNA (30 µg) z cerebella deväť (dráha 4) a šesť (dráha 5) dní starých krýs boli hybridizované s ribopróbou CHL1. Značky RNA sú uvedené na ľavom okraji.

Obr.22 demonštruje špecifičnosť polyklonálnych protilátok proti CHL1 a expresiu CHL1 v rôznych tkanivách.

(a) Analýza Northern blot mozgu z imunopurifikovaného s L1 (dráha 1 (2 µg)), N-CAM (dráha 2 (2 µg)), MAG (dráha 3 (2 µg)) a proteínového fragmentu purifikovaného rekombinantnou aniónovou výmennou chromatografiou (dráha 4 (0,1 µg)) pomocou protilátok proti CHL1.

(b) Analýza Northern blot rozpustných (S) a nerozpustných (M) frakcií detergentových lyzátov hrubých membrán z mozgu (dráha 1), pečene (dráha 2), pľúc (dráha 3), ľadvín (dráha 4) a čriev (dráha 5) deväť dní starých myší. Čísla naľavo (b) uvádzajú molekulové hmotnosti imunoreaktívnych prúžkov CHL1 z mozgu (dráha 1) a pečene (dráha 2). Štandardy molekulových hmotností sú uvedené na ľavom a pravom okraji.

Obr.23 ukazuje detekciu CHL1 na tranzientne transfekovaných bunkách COS-1. Povrchové kultúry COS-1 buniek transfekovaných CHL1 (a) a netransfekovaných (c) boli imunofarbené polyklonálnymi protilátkami proti CHL1. (b,d) zodpovedajúce mikrofotografie fázového kontrastu pre (a,c). Čiarka v d = 30 pre a až d.

Obr.24 ukazuje lokalizáciu mRNA CHL1 a L1 v sekciách myšej sietnice, optického nervu a cerebelárneho kortexu pomocou hybridizačnej analýzy in situ. V sietnici 7 dní starej starej myši je mRNA L1 detekovateľná v gangliónových bunkách lokalizovaných v gangliónovej bunkovej vrstve (1 v a) a v amakrinových a horizontálnych bunkách lokalizovaných vo vnútornej pečeňovej vrstve (2.v 1). Iné bunkové typy v sietnici alebo gliových bunkách v optickom

nerve neobsahujú detekovateľné hladiny transkriptov L1 (a). mRNA CHL1 je po týždni detekovateľná v gangliónových bunkách a v niekoľkých bunkách lokalizovaných na vnútornom okraji vo vnútornej vrstve pečene (b). Gliové bunky lokalizované v bližších (t.j. blízko sietnice) oblastiach optického nervu sú silne značené próbou z antisense cRNA CHL1, naopak gliové bunky lokalizované vo vzdialenejších oblastiach sú viditeľné až po týždni (b). V cerebelárnom kortexe dva dni starých myší sú transkripty L1 detekovateľné vo hviezdicových a košíčkových bunkách v molekulárnej vrstve (mol) a v Golgiho a granulových bunkách v internej granulovej vrstve (iGl:d). Transkripty L1 sú rozmiestnené v podobnom vzore, s jedinou výnimkou, že akékoľvek značenie je ťažko viditeľné v tenkých častiach molekulárnej vrstvy (b). Sekcie hybridizované próbou sense cRNA CHL1 nie sú označené (pre 7 dní starú sietnicu a optický nerv, pozri c).

Obr.25 ilustruje imunofluorescenčnú mikroskopickú lokalizáciu CHL1 v kultúrach astrocytov. Dvojité imuno značenie pestovaných myších astrocytov bolo vykonané s polyklonálnymi protilátkami proti CHL1 (a,d) a s polyklonálnymi protilátkami proti GFAB (b,e), (c,f) sú zodpovedajúce mikrofotografie fázového kontrastu pre (a,b) a (d,e). Čiarka v c a f = 20 μ m pre a až c a d až f.

Obr.26 je analýza Western blot deglykozilovanej CHL1 rozpustných (S) a nerozpustných (M) frakcií detergentových lyzátov hrubých membrán z mozgu sedem dní starých myší boli inkubované s N-glykozidázou F (N), O-glykozidázou (O), obidvoma enzýmami (N+O) alebo bez enzýmu (-) a zlúčené s protilátkami proti CHL1 vo Western blote. Štandardy molekulovej hmotnosti sú uvedené v kD na pravom okraji. Molekulové hmotnosti glykozilovaných a deglykozilovaných proteínových komponentov CHL1 sú uvedené v kD v rámečku nižšie.

Obr.27 ukazuje prítomnosť karbohydrátu MNK-1 v imunoprecipitátoch CHL1 z mozgového tkaniva. CHL1 bola imunoprecipitovaná z detergentových lyzátov z celého mozgového tkaniva z deväť dní starého myšieho mozgu pomocou protilátok proti CHL1. Mozgové lyzáty (dráha 1) a imunoprecipitáty (dráhy 2,3) boli rozdelené na SDS-PAGE, blotované a inkubované s monoklonálnou protilátkou 312 proti epitopu HNK-1 (dráhy 1,2) alebo protilátkami proti CHL1 (dráha 3). Štandardy molekulových hmotností sú uvedené v kD na pravom okraji.

Obr.28: Rast neuritov hipokampálnych neurónov v spoločnej kultúre s transfektantmi L929.

Hipokampálne neuróny odvodené od krýs embryonálneho dňa 18 boli pestované v subkonfluentnej monovrstve transfektantov L929 alebo rodičovských buniek L929. Po 11 až 12 hod. spoločnej kultivácie boli bunky fixované a označené monoklonálnou protilátkou 412 (rozpoznávajúci epitop karbohydrátu HNK++) alebo polyklonálnou protilátkou proti NCAM. Pre meranie dĺžky celého neuritu bol určený len najdlhší neurit na každej vetvi kvôli veľmi rozvetvenému charakteru neurónov v tejto kultúre.

(A) Rast neuritov je podporovaný CHL1 a inhibovaný protilátkami. Neuróny boli pestované s transfektantmi CHL1 (CHL1) alebo bunkami L929 (L929) s (+AB) alebo bez polyklonálnych protilátok proti rekombinantnej CHL1 (500 µg/ml purifikovaného IgG, pridaného 45 min. po naplátovaní) a na transfektantoch L1. Priemerná celková dĺžka neuritov z 4 až 5 nezávislých experimentov je uvedená. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(B) Rôzne línie CHL1 podporujú rast neuritov lepšie než L1. Neuróny boli pestované na dvoch rôznych transfektantoch CHL1 (lína CHL1 1, línia CHL1 2) s mierne rôznymi hladinami expresie, na rodičovských L929 (L929) a na transfektantoch L1 (L1). Celková dĺžka neuritov je podaná ako percento buniek L929 z kontroly (ctr). Odchýlky sú štandardné chyby

priemeru.

(C) Podpora dĺžky neuritov ovplyvňuje dĺžky všetkých tried neuritov. Graf kumulatívnej frekvenčnej distribúcie celkovej dĺžky neuritov hipokampálnych neurónov pestovaných spoločne s transfektantmi CHL1 (línie CHL1 1 a 2) a s rodičovskými bunkami L929 (L929) s (+AB) alebo bez pôsobenia protilátok je podaný v (A). Percento neurónov s neuritmi dlhšími alebo rovnako dlhými ako daná dĺžka x (vertikálna os) boli vyznačené ako funkcia dĺžky neuritov x (horizontálna os). Hodnoty pochádzajú z jedného reprezentatívneho experimentu.

Obr.29: Rast neuritov malých cereberálnych neurónov v spoločnej kultúre s transfektantmi L929.

Cerebelárne neuróny odvodené z 6 až 7 dní starých myší boli pestované 20 hod. na transfektantoch CHL1 (CHL1), CHL1 transfekovaných neexprimujúcich bunkách L929 (slepá vzorka), rodičovských bunkách L929 (L929) a na transfektantoch L1 (L1). Farbenie látok bolo vykonané, ako už bolo opísané na obr.7.

(A) CHL1 podporuje rast neuritov malých cerebelárnych neurónov. Je uvedená priemerná celková dĺžka neuritov z troch experimentov. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(B) CHL1 podporuje tiež rast neuritov malých cerebelárnych neurónov lepšie než L1. Celková dĺžka neuritov je podaná ako percento buniek L929 z kontroly (ctr). Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(C) Zvýšenie rastu neuritov cerebelárnych neurónov vplyvom CHL1 ovplyvňuje všetky triedy neuritov. Graf kumulatívnej frekvenčnej distribúcie celkovej dĺžky neuritov percenta neurónov s neuritmi dlhšími alebo rovnako dlhými ako daná dĺžka x (vertikálna os) boli vyznačené ako funkcia dĺžky neuritov x (horizontálna os). Hodnoty pochádzajú z jedného reprezentatívneho experimentu.

Obr.30: Rast neuritov hipokampálnych neurónov po

působení rozpustnej CHL1.

Hipokampálne neuróny boli pestované na miskách potiahnutých poly-L-lyzínom 12 hod. s prídáním supernatantov (40 µg/ml celkového proteínu) hrubých membránových preparácií transfektantov CHL1 (CHL1), rodičovských buniek L929 (L929) alebo transfektantov L1 (L1). Farbenie a meranie dĺžky neuritov bolo vykonané, ako už bolo opísané (obr.7).

(A) Rozpustná CHL1 z transfektantov L929 podporuje rast najlepšie. Absolútna dĺžka najdlhšieho neuritu a celková dĺžka neuritov sú uvedené. Hodnoty sú priemerom z troch experimentov. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(B) Rozpustná CHL1 podporuje mierne zvýšenie počtu neuritov. Celková dĺžka neuritov v percentách neuritovej dĺžky hipokampálnych neurónov po pôsobení transfektantov odvodených z rodičovských buniek L929 (ctr) je uvedená. Hodnoty sú priemerom z troch experimentov. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(C) Rozpustná CHL1 tiež ovplyvňuje rast neuritov všetkých tried neuritov. Grafy kumulatívnej frekvenčnej distribúcie celkovej dĺžky neuritov z jedného reprezentatívneho experimentu sú uvedené.

Obr.31: Kvantitatívna agregáčná analýza a stabilita proteínov CHL1 a L1 v transfektantoch L929.

(A) Kvantitatívna analýza agregácie bunkových transfektantov S2. Za účelom detekovania agregácie transfekovanej bunky CHL1 (CHL1) (ctr) a L1 (L1) boli pestované (v hustotách približne 3×10^6 buniek/ml) 18 hod. v médiu s (+ind) alebo bez (-ind) indukcie transgénovej expresie pomocou CuSO_4 . Počet častíc bol spočítaný na hemacytometre na začiatku a na konci inkubácie. Percento agregácie bolo vypočítané pomocou indexu $(1-N/N_0) \times 100$. N18 s N_0 predstavujú počet častíc na konci alebo na začiatku inkubačnej periódy. Hodnoty sú priemerom zo štyroch nezávislých experimentov. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

(B) Kinetika agregácie transfektantov L929. Transfekované CHL1 (CHL1), transfekované CHL1 neexprimujúce L929 (slepá vzorka), rodičovské L929 (L929) a transfekované L1 (L1) bunky boli odmyté z tkanivovej kultúry pôsobením roztoku trypsín-EDTA s nízkou koncentráciou, premyté a inkubované v 37°C v polystyrénových skúmavkách. Časť každej vzorky bola odobraná každých 30 min. Počet častíc bol spočítaný na hemacytometre. Výsledky sú vyjadrené, ako je to opísané v (A). Hodnoty sú priemerom z troch nezávislých experimentov. Odchýlky sú štandardné chyby priemeru.

Spôsob uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález sa týka použitia určitých látok tu označovaných ako "neurálne rastové modulátory CNS" (CNGM) a zvlášť triedy neurálnych bunkových adhézných molekúl tak, ako sú tu definované a ich schopnosti podporovať rast neuritov v centrálnej nervovej sústave (CNS). Všeobecne sú neuróny vyvinutej centrálnej nervovej sústavy považované za neschopné obnoveného rastu, čo je spôsobené inhibítorovými molekulárnymi mechanizmami prítomnými na gliových bunkách. Látky a spôsoby predloženého vynálezu môžu byť použité na prekonanie tejto inhibície a na podporu rastu neuritov v CNS.

Látky podľa tohoto vynálezu zahŕňajú a môžu byť selektované z akejkoľvek bunkovej adhéznej molekuly, ktorá je schopná modulovania a podporovania rastu neuritov v CNS a zvlášť potom molekúl patriacich do imunoglobulínovej rodiny. Molekuly sú vyberané predovšetkým z členov imunoglobulínovej rodiny, ktorí sprostredkovávajú neuronálnu bunkovú adhéziu nezávislú na Ca^{2+} , vrátane L1, N-CAM a glykoproteínu asociovaného s myelínom. Vynález taktiež zahŕňa fragmenty týchto molekúl, analógy a príbuzné molekuly, ktoré majú aktivitu podporujúce neurity. Zvlášť výhodné štrukturálne motívy pre tieto fragmenty a analógy

zahŕňajú domény podobné k homológnyĹm opakovaniam k fibronektínu typu III (zvlášť opakovania 1 a 2) a imunoglobulínovĹm doménam (zvlášť doménam I-II, III-IV a V-VI). Pretože látky podľa tohoto vynálezu a najmä členovia rodiny L1 a CAM vykazujú homofilickú väzbu, ako tieto látky, tak aj ich antagonisti a zvlášť protilátky k nim, môžu slúžiť ako aktivátory s ohľadom na receptory pre tieto látky, a môžu tak byť využité ako na diagnostické, tak aj na terapeutické aplikácie rovnakým spôsobom a na ten istý účel ako pôvodné látky. L1 pôsobí ako receptor a protilátka proti nej môže byť využitá ako aktivátor k rastu neuritov, ako je to opísané nižšie, a na nervovú regeneráciu, najmä v CNS. Táto schopnosť je ďalej demonštrovaná možnosťou protilátok proti L1 slúžiť spôsobom, ako identifikovať ďalších členov rodiny nervových rekogničných molekúl L1 a CAM, ktoré tu slúžia ako látky, a vynález sa tak rozširuje na molekuly, ktoré sú identifikované, izolované a charakterizované pomocou týchto protilátok. Z týchto dôvodov je trieda látok, identifikovaná ako modulátory nervového rastu v CNS, považovaná za zahŕňajúcu aj protilátky proti molekulám rodiny CAM, ako je L1 a jej analógy, ako je CHL1, opísané nižšie.

Predložený vynález sa týka v jednom aspekte ektoptickej expresie neurálnych rastových modulátorov CNS (CNGM) alebo neurálnych bunkových adhézných molekúl na diferencovaných astrocytoch in vivo. Bolo zistené, že tieto molekuly zosilňujú rast neuritov na jednovrstvových kultúrach astrocytov a kryostatových sekciách nepoškodených a poškodených dospelých myších optických nervov, a tiež in vivo, v experimentoch s deformáciou optického nervu u transgénnych zvierat. Zvýšená schopnosť rastu neuritov je úmerná hladine ektoptickej expresie CNGM. Toto je demonštrované porovnávaním odlišných transgénnych línii podľa tohoto vynálezu, ktoré exprimujú rôzne bazálne hladiny CNGM kódovaných transgénom, a koreláciami následnej zvýšenej expresie CNGM po porušení optického nervu.

Malo by byť uznané, že aj keď optické nervy, ako porušené, tak aj neporušené, sú vhodné na použitie podľa predloženého vynálezu, môžu byť podobne použitá akákoľvek časť nervovej sústavy, vrátane častí mozgu a miechy.

Rast neuritov je závislý na hladinách exprese CNGM v astrocytoch, čo demonštruje špecifický efekt spôsobený CNGM v podpore rastu neuritov v transgénnych zvieratách. Inhibícia rastu neuritov polyklonálnymi protilátkami proti CNGM, ale nie protilátkami proti myším membránam pečene, ďalej podporuje túto špecifickosť, zvlášť, pretože obidve protilátky reagujú dobre s bunkovými povrchmi neurónov a astrocytov transgénnych zvierat.

Vo výhodnom vyhotovení je CNGM molekula L1. Biologické efekty L1 môžu byť inhibované protilátkami proti L1, čo ukazuje, že L1 je homofilicky aktívna v konfigurácii trans v bunkovom povrchu transgénnych astrocytov. Ďalej druhovo špecifické protilátky proti L1, ktoré nereagujú s kuracími dorzálnymi koreňovými gangliónovými neurónmi, inhibujú neuritový rast v tomto type neuronálnej bunky na transgénnych astrocytoch. Tieto zistenia jednoznačne identifikujú L1 ako aktívnu molekulu pôsobiacu trans a ukazujú, že ektopická expresia L1 gliovými bunkami, ktorým normálne chýba expresia L1, zosilňuje rast neuritov in vitro.

Zosilnenie rastu neuritov na gliových bunkách sprostredkované transgénom, ktoré normálne neexprimujú L1 in vivo, ukazuje, že gliové bunky dospelaj centrálnej nervovej sústavy cicavca môžu byť viac prispôbené na neuritový rast. Strata molekúl, ktoré podporujú rast neuritov cez gliové bunky (Smith et al. (1986) J. Comp. Neurol. 251:23-43; Smith et al. (1990) Dev. Biol. 138:377-390) sa preto ukazuje byť kompenzovaná expresiou rekogničnej molekuly, ktorá je normálne veľmi exprimovaná v gliových bunkách v dospelaj periférálnej nervovej sústave cicavca (Niecke et al. (1985); Bixby et al. (1988) J. Cell. Biol. 107:353-362; Seilheimer et al. (1988) J. Cell. Biol.

107:341-351).

Fenotyp dospelých astrocytov z predložených transgénnych línií môže byť modifikovaný smerom k schopnosti obnoviť expresiu L1 Schwannovými bunkami po spôsobení poškodenia. Zvýšenie expresie L1 Schwannovými bunkami je pravdepodobne sprostredkované neurotropínmi aktivovanými po poškodení autokrinnými mechanizmami (Seilheimer et al. (1987) EMBO J. 6:1611-1616). Podobne môže byť expresia L1 astrocytmi v kultúre aktivovaná TGF-beta a NGF (Saad et al. (1991)). Vytvorením myši s transgénom GFAB-L1 je neschopnosť zrelých astrocytov odpovedať na nervové poranenie prekonaná aktiváciou molekuly L1. Expresia L1 môže byť zvlášť výhodná pre rast neuritov v myelinovaných dráhach centrálnej nervovej sústavy, ktoré normálne obsahujú niekoľko molekúl, ktoré inhibujú rast neuritov (Schachner et al., Perspectives in Developm. Neurobiol. in Press; Schwab et al. (1995) Ann. Rev. Neurosci. 16:565-595).

Predložený vynález demonštruje, že inhibičné pôsobenie astrogliálnych a oligodendrogliaálnych buniek môže byť prekonané, prínajmenšom sčasti, rast neuritov je umožnený podporujúcimi vlastnosťami látok tu definovanými a zvlášť ako je ilustrované aktivitou ektopicky exprimovanej L1. Expresia L1 v astrocytoch sa dá tiež kompenzovať inhibičnými efektami vykonávanými oligodendrocytmi. Permisívne a nepermisívne molekulárne mechanizmy preto nemusia byť lokalizované na tom istom type bunky, aby sa objavil rast neuritov. Namiesto toho môžu byť tieto molekulárne mechanizmy zdieľané medzi rôznymi typmi buniek. Bunková a molekulárna manipulácia L1 a iných molekúl podporujúcich rast neuritov môže preto umožniť zosilnenie regeneratívnej kapacity dospeljej centrálnej nervovej sústavy po poranení alebo chorobe.

Ako bolo ukázané vyššie, predložený vynález sa týka podpory neurálneho rastu v CNS, vrátane takého rastu, ktorý je potrebný pre regeneráciu štruktúr, k strate ktorých došlo vplyvom poranenia alebo choroby, rovnako ako tých štruktúr

a tkanív vykazujúcich nekompletnú alebo nehotovú formáciu. Látky podľa tohoto vynálezu tiež vykazujú neuroprotektívny alebo nervovo ochranný efekt, ako je to ilustrované nižšie, a napr., môžu byť podávané za účelom inhibovania neurálnej degenerácie alebo straty rôznej povahy.

Vynález sa tiež týka konštrukcií a prostriedkov obsahujúcich alebo dopravujúcich látky podľa tohoto vynálezu, buď podporovaním expresie istých látok prostredníctvom génovej terapie a podobne, alebo exogénnym podávaním týchto látok, kde je to vhodné alebo potrebné, vo forme farmaceutických prostriedkov za účelom liečenia poranených alebo chorých štruktúr CNS. V tomto spojení je uvažované, že isté látky sú schopné vykonávať rast podporujúci efekt, keď sú takto podávané, aj keď je známe, že členovia uvedenej skupiny, ako je L1 a N-CAM, sa viažu homofilicky a môžu tak byť viac účinné, keď sú podávané pomocou expresie. Vynález sa týka obidvoch typov ciest a protokolov, kde je to možné.

Malo by byť tiež uvedené, že sa predložený vynález týka použitia sekrétujúcich buniek CNGM za účelom modulácie nervového rastu, regenerácie a prežívania nervov v CNS. Určité rozpustné CNGM a jej fragmenty a príbuzné molekuly sú tiež predmetom vynálezu.

Nasledujúce pojmy budú definované nižšie.

Pojem "látka", "nervový rastový modulátor CNS", "CNGM", "nervová rekogničná molekula", "rekogničný faktor", "rekogničný faktorový proteín", "nervová adhézna molekula" a akékoľvek varianty, ktoré tu nie sú zvlášť uvedené, môžu byť použité zameniteľne a ako také použité v predloženej žiadosti a nárokoch, ktoré sa týkajú proteínového materiálu vrátane jednoduchých alebo komplexných proteínov a týkajú sa tiež tých proteínov, ktoré majú aminokyselinovú sekvenciu predtým opísanú a profil aktivít uvedený tu a v nárokoch. Tieto pojmy tiež zahŕňajú aktívne fragmenty týchto proteínov, príbuzné molekuly a analógy, vrátane malých molekúl, ktoré sa chovajú podobne ako uvedené látky.

V zhode s tým sú proteíny vykazujúce rovnakú alebo pozmenenú aktivitu podobne mienené. Za tieto modifikácie môžu byť považované cielené mutagenézy alebo môžu byť náhodné, rovnako ako tie, ktoré sú získané vplyvom mutácií v hostiteľoch, ktorí ich produkujú. Pojmy "nervový rastový modulátor CNS", "CNGM", "nervová rekogničná molekula", "rekogničný faktor", "rekogničný faktorový proteín", "nervová adhézna molekula" sú tiež uvádzané, že zahŕňajú proteíny tu citované rovnako ako podstatné homológy a alelické variácie.

Aminokyselinové zvyšky tu opísané sú uvádzané v izomérovej forme "L". Avšak zvyšky v izomérovej forme "D" môžu byť zamenené za akýkoľvek zvyšok v izomérovej forme "L" pokiaľ je polypeptidom udržiavaná funkčná vlastnosť väzby imunoglobulínu. NH₂ uvádza voľnú aminoskupinu prítomnú na konci polypeptidu. COOH uvádza voľnú karboxylovú skupinu prítomnú na konci polypeptidu. Podľa štandardnej polypeptidovej nomenklatury, J. Biol. Chem. 243:3552-59 (1969) sú uvedené skratky aminokyselín v nasledujúcej tabuľke:

TABUĽKA SKRATIEK AMINOKYSELÍN

<u>SYMBOL</u>		<u>AMINOKYSELINA</u>
Jedno písmeno	Tri písmená	
Y	Tyr	tyrozín
G	Gly	glycín
F	Phe	fenylalanín
M	Met	metionín
A	Ala	alanín
S	Ser	serín
I	Ile	izoleucín
L	Leu	leucín
T	Thr	treonín
V	Val	valín
P	Pro	prolín
K	Lys	lyzín
H	His	histidín
Q	Gln	glutamín
E	Glu	kys. glutámová
W	Trp	tryptofán
R	Arg	arginín
D	Asp	kys. asparágová
N	Asn	asparagín
C	Cys	cysteín

Malo by byť poznamenané, že všetky sekvencie aminokyselinových zvyškov sú tu vo forme, ktorých ľavá a pravá orientácia je konvenčný smer od konca amino ku koncu karboxy. Ďalej by malo byť poznamenané, že pomlčka na začiatku alebo na konci sekvencie aminokyselinových zvyškov uvádza peptidovú väzbu na ďalšiu sekvenciu alebo jeden a viac aminokyselinových zvyškov. Horeuvedená tabuľka je uvedená kvôli prevodu trojpísmenového zápisu na jednopísmenový, pretože sa tu môžu tieto zápisy striedať.

"Replikon" je akýkoľvek genetický element (napr.

plazmid, chromozóm, vírus), ktorý funguje ako autonómna jednotka replikácie DNA in vivo; t.j. je schopná replikácie pod vlastnou kontrolou.

"Vektor" je replikon, ako je plazmid, fág alebo kozmid, ku ktorému môže byť pripojený iný segment DNA za účelom vyhotovenia replikácie pripojeného segmentu.

"Molekula DNA" označuje polymérovú formu deoxyribonukleotidov (adenín, guanín, tymín a cytozín) v jej jednovláknovej forme alebo vo forme dvojvláknovej skrutkovice. Tento pojem označuje len primárnu a sekundárnu štruktúru molekuly a neobmedzuje ju na akékoľvek zvláštne terciárne formy. Tento pojem zahŕňa dvojvláknovú DNA nachádzajúcu sa, inter alia, v lineárnych molekulách DNA (napr. reštrikčné fragmenty), vírusoch, plazmidoch a chromozónoch. Pri opisovaní štruktúry špeciálnych dvojvláknových molekúl DNA môžu byť sekvencie opísané podľa normálnej konvencie tak, že uvádzajú len sekvenciu v smere od 5' k 3' pozdĺž netranskribovaného vlákna DNA (t.j. vlákna, ktoré má sekvenciu homológnu k mRNA).

"Počiatok replikácie" označuje tie sekvencie DNA, ktoré sa zúčastňujú na syntéze DNA.

"Kódujúca sekvencia" DNA je dvojvláknová sekvencia DNA, ktorá je transkribovaná a translatovaná do polypeptidu in vivo, kde je umiestnená pod kontrolu vhodnej regulačnej sekvencie. Hranice kódujúce sekvencie sú určené iniciačným kodónom na 5' konci amino a translačným terminačným kodónom na 3' konci karboxy. Kódujúca sekvencia môže zahŕňať, ale nie obmedzená na, prokaryontové sekvencie, cDNA z eukaryontovej mRNA, genómové sekvencie DNA z eukaryontovej (napr. cicavčej) DNA a tiež syntetické sekvencie DNA. Polyadenylačný signál a transkripčné terminačné sekvencie budú zvyčajne umiestnené na 3' konci vzhľadom na kódujúcu sekvenciu.

Transkripčné a translačné kontrolné sekvencie sú regulačné sekvencie DNA, ako promotory, zosilňovače, polyadenylačné signály, terminátory a podobne, ktoré slúžia

na expresiu kódujúcej sekvencie v hostiteľskej bunke.

"Promotorová sekvencia" je regulačná oblasť DNA schopná väzby s RNA polymerázou v bunke a zahájenia transkripcie smerom k 3' koncu kódujúcej sekvencie. Za účelom definovania predloženého vynálezu je promotorová sekvencia obmedzená na svojom 3' konci transkripčným iniciačným miestom a presahuje smerom k 5' koncu tak, že zahŕňa minimálny počet báz alebo elementov nutných na zahájenie transkripcie na úrovni detekovateľnej na pozadí. Vnútri promotorovej sekvencie sa bude nachádzať transkripčné iniciačné miesto (vhodne definované mapovaním pomocou nukleázy S1), rovnako ako proteínové väzbové domény (konsesné sekvencie) zodpovedné za väzbu RNA polymerázy. Eukaryontové promotory budú často, ale nie vždy, obsahovať úseky "TATA" a "CAT". Prokaryontové promotory obsahujú Shine-Dalgarnové sekvencie spoločne s konsesnými sekvenciami -10 a -35.

"Expresná kontrolná sekvencia" je sekvencia DNA, ktorá kontroluje a reguluje transkripciu a transláciu inej sekvencie DNA. Kódujúca sekvencia je "pod kontrolou" transkripčných a translačných kontrolných sekvencií v bunke, kde RNA polymeráza prepisuje kódujúcu sekvenciu do mRNA, ktorá je potom preložená do proteínu kódovaného kódujúcou sekvenciou.

Pojem "oligonukleotid", ako je tu používaný uvádzajúc próby, je definovaný ako molekula zložená z jedného alebo viacerých ribonukleotidov, s výhodou viac než troch. Jeho presná veľkosť bude záležať na mnohých faktoroch, ktoré naopak záležia na konečnej funkcii a použití oligonukleotidu.

Pojem "primér", ako je tu používaný, označuje oligonukleotid, ktorý sa buď vyskytuje prirodzene v purifikovanom reštrikčnom digeste alebo je vyrobený synteticky, ktorý je schopný pôsobiť ako miesto zahájenia syntézy, keď je umiestnený do podmienok, v ktorých je syntéza indukovaná a to predĺžením priméru, t.j.

v prítomnosti nukleotidov a indukujúcej látky ako DNA polymerázy a vo vhodnej teplote a pH. Primér je buď jednovláknový alebo dvojvláknový a musí byť dostatočne dlhý na zahájenie syntézy potrebného produktu v prítomnosti indukujúcej látky. Presná dĺžka priméru bude záležať na mnohých faktoroch, vrátane teploty, zdroja priméru a použitého spôsobu. Napríklad v diagnostických aplikáciách obsahuje oligonukleotidový primér typicky 15-25 alebo viac aj menej nukleotidov, v závislosti na komplexnosti cieľovej sekvencie.

Priméry tu selektované sú "v podstate" komplementárne k rôznym vláknam cieľovej sekvencie DNA. To znamená, že priméry musia byť dostatočne komplementárne, aby hybridizovali s príslušnými vláknami. Preto sekvencie priméru nemusia zodpovedať presnej sekvencii predlohy. Napríklad, nekomplementárny nukleotidový fragment je pripojený k 5' koncu priméru s tým, že zvyšok sekvencie priméru je komplementárny ku vláknku. Naopak, nekomplementárna báza alebo ďalšia sekvencia sú vsunuté do "medzier" do vnútra priméru, za predpokladu, že sekvencia priméru má dostatočnú komplementaritu so sekvenciou vlákna, aby hybridizovala a tým utvorila templát pre syntézu predĺženého produktu.

Ako je použité tu, pojmy "reštrikčné endonukleázy" a "reštrikčné enzýmy" sa týkajú bakteriálnych enzýmov, ktoré štiepia dvojvláknovú DNA v mieste alebo blízko miesta špecifickej nukleotidovej sekvencie.

Bunka je "transformovaná" exogénna alebo heterológová DNA, kde je takáto DNA vnesená do vnútra bunky. Transformujúca DNA je alebo nie je integrovaná (kovalentne spojená) do chromozomálnej DNA tvoriacej genóm bunky. Napríklad u prokaryontov, kvasiniek a buniek cicavcov je transformujúca DNA udržiavaná na epizómových elementoch ako sú plazmidy. S ohľadom na eukaryontové bunky je stabilne transformovaná bunka taká, v ktorej bola transformujúca DNA integrovaná do chromozómu tak, že je dedená dcérskymi

bunkami počas replikácie chromozómu. Táto stabilita je demonštrovaná schopnosťou eukaryontovej bunky vytvoriť bunkové línie alebo klony obsahujúce populáciu dcérskych buniek, ktoré obsahujú transformujúcu DNA. "Klon" je populácia buniek odvodených z jedinej bunky alebo spoločného predka mitózou. "Bunková línia" je klon primárnej bunky, ktorý je schopný stabilného rastu in vitro mnoho generácií.

Dve sekvencie DNA sú "v podstate homológne", keď sa zhoduje najmenej 75% (výhodne najmenej 80% a najvýhodnejšie najmenej 90 alebo 95%) nukleotidov v definovanej dĺžke sekvencií DNA. Sekvencie, ktoré sú v podstate homológne, sú identifikované porovnaním sekvencií dostupných v sekvenčných databankách pomocou štandardného softvéru alebo v hybridizačných experimentoch typu Southern za, napr. stringentných podmienok, ako je to definované pre príslušný systém. Definovanie vhodných hybridizačných podmienok je odbornou vecou, viď napr. Maniatis et al. supra; DNA cloning, Vols. I a II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

"Heterológová" oblasť konštrukcie DNA je identifikovaný segment DNA vnútri dlhej molekuly DNA, ktorý sa nenachádza v spojení s ďalšou molekulou v prírode. Keď heterológová oblasť kóduje gén cicavca, tento gén bude zvyčajne ohraničený DNA, ktorá neohraničuje genómovú DNA cicavca v genóme východzieho organizmu. Iný príklad heterológovej kódujúcej sekvencie je konštrukcia, kde kódujúca sekvencia samotná sa nenachádza v prírode (napr. cDNA, kde genómová kódujúca sekvencia obsahuje intróny, alebo syntetické sekvencie, ktoré majú kodóny iné než u prirodzeného génu). Alelické variácie alebo prirodzene sa vyskytujúce mutačné udalosti nie sú príčinou vzniku heterológových oblastí DNA, ako je tu definované.

"Protilátka" je akýkoľvek imunoglobulín, vrátane protilátok a fragmentov z nej pochádzajúcich, ktorý viaže špecifický epitop. Pojem zahŕňa polyklonálne, monoklonálne a chimerické protilátky, posledne menované sú opísané

detailne v U.S. Patent No. 4,816,397 a 4,816,567.

"Spoločné protilátkové miesto" je taká štruktúrna časť molekuly protilátky obsiahnutá v ťažkom a ľahkom reťazci variabilných a hypervariabilných oblastí, ktorá špecificky viaže antigén.

Pojem "molekula protilátky" vo svojich rôznych gramatických formách, ako je to tu použité, sa týka ako intaktnej imunoglobulínovej molekuly, tak imunologicky aktívnej časti imunoglobulínovej molekuly.

Príkladné molekuly protilátky sú pôvodné imunoglobulínové molekuly, skutočné sú pôvodné imunoglobulínové molekuly a tie ich časti známe v odbore ako Fab, Fab', F(ab') a F(v), ktoré sú uprednostnené pre použitie v terapeutických spôsoboch tu opísaných.

Časti protilátok Fab a F(ab') sú pripravované proteolytickou reakciou papaínu a pepsínu na skutočné pôvodné imunoglobulínové molekuly spôsobmi, ktoré sú dobre známe. Viď napr. U. S. Patent No. 4,342,566, Theofilopolous et. al. Časti protilátok Fab' sú dobre známe a sú produkované z častí F(ab') následnou redukciou merkaptetoetanolom disulfidových väzieb dva ťažké reťazce a následnou alkyláciou výsledného bielkovinového merkaptánu činidlom akým je iódoacetamid. Uprednostnené sú intaktné molekuly protilátok.

Pojem "monoklonálna protilátka" vo svojich rôznych gramatických formách sa vzťahuje na protilátku, ktorá má len jeden druh väzbového miesta, ktoré imunogénne reaguje s príslušným antigénom. Monoklonálna protilátka tak typicky vykazuje jedinú väzbovú afinitu pre antigén, s ktorým imúnne reaguje. Monoklonálna protilátka tak obsahuje molekulu, ktorá má pluralitu vzájomných miest, každé imunošpecifické na iný antigén; napr. dvojito špecifickú (chimérnu) monoklonálnu protilátku.

Pojem "farmaceuticky prijateľný" sa týka molekulárnych entít a prostriedkov, ktoré sú fyziologicky tolerantné a nespôsobujú alergické alebo podobné reakcie, ako sú

žalúdočná nevoľnosť, závrat a podobne, keď sú podávané človeku.

Pojem "terapeuticky účinné množstvo" tu znamená množstvo dostatočné na zabránenie a s výhodou na zníženie najmenej o 30 percent a ešte výhodnejšie o 50 percent a najvýhodnejšie o 90 percent klinicky významnej zmeny vo fáze aktivity S cieľovej bunkovej masy alebo iného patologického stavu, ako napr. zvýšeného krvného tlaku, horúčky alebo množstva bielych krviniek.

Sekvencia DNA je "operatívne spojená" k expresnej kontrolnej sekvencii, keď expresná kontrolná sekvencia riadi a reguluje transkripciu a transláciu tej sekvencie DNA. Pojem "operatívne spojená" zahŕňa sekvenciu, ktorá má vhodný počiatočný signál (napr. ATG) na jej začiatku, ktorá slúži na expresiu a udržiavanie správneho čítacieho rámca, ktorý umožňuje expresiu sekvencie DNA pod riadením expresnej kontrolnej sekvencie a produkciu požadovaného produktu kódovaného touto sekvenciou DNA. V prípade, že gén, ktorý je požadovaný kvôli vneseniu do rekombinantnej molekuly DNA, neobsahuje vhodný počiatočný signál, je taký počiatočný signál dodatočne vnesený na začiatok tohoto génu.

Pojem "štandardné hybridizačné podmienky" sa týka koncentrácie soli a teplotných podmienok, ktoré sa v podstate rovnajú 5xSSC a 65°C pre hybridizáciu a premývanie.

V jednom aspekte sa predložený vynález týka transgénnych zvierat, ktoré exprimujú CNGM alebo neurálnu rozpoznávaciu molekulu, zvlášť L1, a to výhodne v astrocytoch. Tieto zvieratá majú zvýšenú schopnosť nervového rastu v centrálnej nervovej sústave.

Vynález tiež zahŕňa skúšku na testovanie potenciálnych prostriedkov, ktoré sú účinné pri modulácii nervového rastu cieľových buniek cicavcov prerušením alebo potenciáciou nervovej rozpoznávacej aktivity CNGM. Ako "nervová rozpoznávacia aktivita" alebo "nervová adhézna aktivita" je mienený akýkoľvek biologický efekt, ktorý je výsledkom väzby

CNGM na inú molekulu, vrátane intracelulárnych efektov na druhých prenášačov. V jednom prípade je testovaný prostriedok podávaný do bunkovej vzorky s ligandom, ktorý aktivuje nervový rastový modulátor CNS, alebo transgénemu zvieraťu exprimujúcemu nervový rastový modulátor CNS, to všetko za účelom stanovenia vplyvu modulátoru na väzbovú aktivitu modulátoru na akejkkoľvek chemickej vzorke alebo testovanom prostriedku porovnávaním s kontrolou. Určujúce charakteristiky najmenej jedného z predložených nervových rastových modulátorov CNS, zvlášť L1, je ich účasť na zmenách v ustálených hladinách intracelulárnych prenášačov, zahŕňajúcich Ca^{2+} , pH a cyklické nukleotidy, rovnako ako zmeny v aktivitách proteín kináz, ako sú proteín kináza c, pp60^{c-src}, kazeín kináza typu II a iná kináza, ktorá fosforyluje L1.

Systém skúšky je adaptovaný na identifikáciu látok alebo iných entít, ktoré sú schopné viazať sa na CNGM alebo proteíny v cytoplazme alebo v jadre a tým sú schopné inhibovať alebo potencovať transkripčnú aktivitu. Také skúšky sú užitočné pri vývoji látok, ktoré sú špecifické na danú bunkovú aktivitu, ako je nervový rast alebo zvýšenie synaptickej pôsobivosti alebo ktoré potencujú takú aktivitu v čase alebo hladine aktivity. Také látky sú používané napríklad na modulovanie nervového rastu pri zranení alebo na liečbu iných patológií, napríklad na liečbu neurodegeneratívnych chorôb, akými sú Parkinsonova choroba, ALS, Huntingtonova choroba a Alzheimerova choroba.

V ešte ďalšom vyhotovení sa vynález týka agonistov a antagonistov aktivity nervového rastového modulátoru CNS. Zvlášť látka alebo molekula, ktorá inhibuje schopnosť neurónov rozpoznávať CNGM ako L1 je používaná na zamedzenie nervového rastu tam, kde je taký rast kontraindikatívny, a ako je opísané vyššie, farmaceutický prípravok obsahujúci takú látku je podávaný priamo do cieľového miesta. V inom vyhotovení je agonistom peptid, ktorý má sekvenciu časti domény L1, zvlášť tie domény medzi fibronektínovými

opakovaniami 2 a 3 alebo je agonistom protilátka proti tejto oblasti. Obidve tieto molekuly sú potenciálne použité tam, kde má daný CNGM ako L1 schopnosť homolytickej väzby (t.j. jedna molekula L1 viaže inú molekulu L1 a preto obidve protilátky proti L1 a proti fragmentom L1 sú schopné väzby na L1).

Jedno z diagnostických využití predloženého vynálezu sa týka použitia prítomných CNGM v skúškach na testovanie inhibítorov proteín kinázy. Pretože molekuly CNGM sú v aktívnom stave fosforylované, sú tiež defosforylované špecifickými fosfatázami. Blokovanie špecifickej kinázy alebo fosfatázy je preto cesta k farmakologickému pôsobeniu, ktoré moduluje aktivitu týchto nervových rozpoznávacích proteínov.

Predložený vynález sa podobne týka vývoja protilátok proti CNGM vrátane prirodzene vyvolaných a rekombinantne pripravených protilátok. Protilátky sú napríklad použité na testovanie expresných knižníc za účelom získania génov, ktoré kódujú CNGM. Také protilátky zahŕňajú polyklonálne a monoklonálne protilátky pripravené známymi genetickými technikami, rovnako ako zahŕňajú dvojito špecifické (chimérne) protilátky a tiež protilátky obsahujúce iné vlastnosti prispôsobujúce ich pre ďalšie diagnostické použitie spojené s ich schopnosťou modulovať nervový rast.

Protilátky proti nervovým rastovým modulátorom CNS sú zvlášť selektované a zahrnuté do rozsahu predloženého vynálezu pre ich zvláštnu schopnosť väzby proteínu. Aktivita nervových rastových modulátorov alebo špecifických polypeptidov je sledovaná priamo pomocou uvedených testovacích skrz použitie vhodne značeného množstva nervového rastového modulátoru alebo protilátky alebo ich analógu.

CNGM, ich analógy a akékoľvek inhibítory alebo protilátky, ktoré sú vyvolané, sú schopné použitia v spojení s rôznymi diagnostickými technikami, vrátane imunoskúšky ako je rádioimunoskúška, s použitím, napríklad, protilátky proti

CNGM, ktorá bola označená rádioaktívnou adíciou, redukciou bórohydridom sodným alebo rádiojodináciou.

Kontrolné množstvo inhibítorov alebo protilátok v imunoskúške je vnesené do kontrolnej vzorky. Po tom, čo má značený materiál alebo jeho väzbový partner možnosť reagovať s miestami vnútri vzorky, je výsledné množstvo zmerané známymi technikami, ktoré sú rôzne podľa povahy pripojenej značky. Protilátky proti CNGM sú použité v prípade protokolu.

V prípade, keď sú použité rádioaktívne značky v podobe izotopov ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I a ^{186}Re , sú použité súčasné meracie techniky. V prípade, keď je značkou enzým, je detekcia vykonaná akoukoľvek zo súčasne používaných kolorimetrických, spektrofotometrických, fluórospektrofotometrických, ampérometrických a gazometrických techník, ktoré sú v odbore známe.

Predložený vynález sa týka skúšky, ktorá je vykonaná vo forme testovacej súpravy pre kvantitatívnu analýzu na prítomnosť nervových rastových modulátorov alebo na identifikáciu látok alebo iných činidiel, ktoré napodobňujú alebo blokujú ich aktivitu. Systém testovacej súpravy obsahuje značený komponent pripravený jednou z rádioaktívnych alebo enzýmových techník tu opísaných, zahŕňa pripojenie značky na nervové rastové modulátory ich agonistami alebo inhibítormi, a obsahuje ďalšie imunochemické činidlá, najmenej jedným z nich je voľný alebo imobilizovaný ligand schopný väzby s označeným komponentom alebo jeho väzbovým partnerom a určením príslušného.

V ďalšom vyhotovení sa predložený vynález týka určitých terapeutických spôsobov, ktoré sú založené na aktivite nervových rastových modulátorov CNS, ich podjednotiek alebo ich aktívnych fragmentov, alebo na činidlách a iných látkach, ktoré tú istú aktivitu. Prvý terapeutický spôsob je spojený s podporou nervového rastu v CNS, ktorý je spôsobený prítomnosťou a aktivitou CNGM, ich aktívnych fragmentov,

analógov a príbuzných látok, a ktorý zahŕňa podávanie látky schopnej modulovania produkcie alebo aktivity CNGM, v množstve účinnom na dosiahnutie podpory vývinu CNS, obnoveného rastu alebo rehabilitácie u pacienta. Naopak iné látky alebo iní neutralizujúci väzboví partneri CNGM sú podávané za účelom inhibície alebo zabránenia nežiadúceho nervového rastu. Tiež modulácia pôsobenia špecifických kináz a fosfatáz, ktoré sa zúčastňujú fosforylácie a defosforylácie CNGM, sa týka tohoto spôsobu a umožňuje terapie založené na aktivácii CNGM.

Terapeutický spôsob, ktorý je tu všeobecne opísaný, zahŕňa spôsob liečby rôznych chorôb a iných bunkových disfunkcií a porúch podávaním farmaceutických prostriedkov, ktoré obsahujú účinné inhibítory alebo aktivátory nervového rastového modulátoru CNS alebo jeho podjednotiek alebo iných rovnako účinných látok vyvinutých napríklad pomocou skúšky na testovanie látok, ktorá je pripravená a používaná v zhode s ďalším aspektom predloženého vynálezu. Napríklad látky alebo ich väzboví partneri k nervovým rastovým modulátorom CNS a proteínom sú podávané, aby inhibovali alebo potencovali naviazanie a aktivitu druhého prenášača.

Ako je uvedené vyššie, vynález sa týka objavu celej rodiny molekúl L1 CAM a zvlášť analógu k L1 známeho ako CHL1. CHL1 obsahuje terminálnu signálnu sekvenciu na konci N, šesť imunoglobulínových domén, fibronektínu podobné opakovania, transmembránovú doménu a intracelulárnu doménu na konci C, ktorá je dlhá približne 100 aminokyselín. CHL1 je najviac podobná vo svojej extracelulárnej doméne na kuráciu Ng-CAM (40% aminokyselinovej identity), potom na myšiu L1, kurací neurofascín, kurací Nr-CAM, drozofilí neuroglián a L1.1 zebričky (37 až 28% aminokyselinovej identity), na myšiu F3, krysiu TAG-1 a králičiu BIG-1 (približne 27% aminokyselinovej identity). Podobnosť s inými členmi rodiny Ig (napr. N-CAM, DCC, HLAR, rse) je 16 až 11%. Intracelulárna doména sa najviac podobá na myšiu a kuráciu Nr-CAM, na myši a krysi neurofascín 1 (približne

50% aminokyselinovej identity), potom na kurací neurofascín Ng-CAM, drozofilí neuroglián a L1.1 a L1.2 zebričky (približne 40% aminokyselinovej identity). Okrem celkovej vysokej homológie a zachovanej modulárnej štruktúry medzi predtým uvedenými členmi rodiny L1 (myšia/ľudská L1/krysia NILE; kuracia/Ng-CAM; kuracia/myšia Nr-CAM; drozofilí neuroglián; L1.1 a L1.2 zebričky; kurací/myši neuroglián/kryší ADGP). Charakteristické vlastnosti L1 boli určené s ohľadom na počet aminokyselín medzi konzervovaných aminokyselinových zvyškov, ktoré definujú vzdialenosti vnútri a medzi dvoma príbahlými doménami podobnými Ig a opakovaniami podobnými FN. Tieto vykazujú kolinearitu v šiestich doménach podobných Ig a príbahlých štyroch opakovaníach podobných FN, ktorá je značne konzervovaná medzi L1 a molekulami obsahujúcimi tieto moduly (pomenovaná súbor rodiny L1) a zahŕňa formy so spojením GPI podskupiny F3 (myšia F3/kuracia F11/ľudská CNTN1; krysia BIG-1/myšia PANG; krysia TAG-1/myšia TAX-1/kurací axonín-1). Molekula rakoviny konečníku (DCC) predtým uvedená ako molekula podobná N-CAM prináleží do súboru rodiny L1. Inými štruktúrnymi znakmi CHL1 zdieľanými medzi členmi rodiny L1 sú vysoký stupeň N-glykozidicky naviazaných karbohydrátov (približne 20% ich molekulovej hmotnosti), obsahuje karbohydrátovú štruktúru HMK-1 a vzorku proteínových fragmentov obsahujúcu hlavný pruh 185 kD a menšie fragmenty 100 a 125 kD. Rovnako ako pre ostatných členov rodiny L1 je prevažná expresia L1 pozorovaná v nervovom systéme v neskorších vývojových štádiách.

Nasledujúce príklady sú uvedené v poradí tak, aby plne ilustrovali výhodné vyhotovenie vynálezu. Nemali by byť žiadnym spôsobom upravené tak, aby neobmedzovali široký rozsah vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Transgén GFAP-L1 a vytvorenie transgéennej myši

Gliový fibrilárny kyslý proteín (GFAP, Eng et al. (1971) Brain Res. 28:351-354) je prednostne exprimovaný astrocytmi v neskorších štádiách vývoja myšej centrálnej nervovej sústavy (Landry et al. (1990) J. Neurosci. Res. 25:194-203). Preto boli regulačné sekvencie génu GFAP použité, aby riadili expresiu nervovej bunkovej adhézne molekuly L1 v zreľých astrocytoch transgénnych myší. Transgén GFAP-L1 (Obr.1) kóduje len nervovú bunkovú adhéznú molekulu L1, pretože kodón ATG génu GFAP bol mutovaný a kódujúca sekvencia L1 je nasledovaná na 3' konci translačným signálom pre zastavenie a polyadenylačným signálom (Toggas et al. (1994) Nature 367:188-193). Táto konštrukcia bola použitá na vytvorenie troch rôznych línii transgénnych myší, označených 3418, 3426 a 3427.

Myšia cDNA L1 (Moos et al. (1988) Nature 334:701-703) bola vnesená do exónu 1 myšieho génu pre gliový fibrilárny kyslý proteín (GFAP), ktorý bol modifikovaný, ako je uvedené (Toggas et al. (1994) Nature 367:188-193). Myšia cDNA L1 dlhá 4,05 kb obsahujúca celú kódujúcu sekvenciu proteínu a 250 netranslatovaných nukleotidov na 3' konci bola spojená s modifikovaným transgénom GFAP-L1.

Transgén GFAP-L1 dlhý 14,5 kb bol vyštiepený z modifikovaného klonovacieho vektora digesciou s Scí I, potom bola vykonaná elektroforéza a elektroeluácia z agarózového gélu. Purifikovaná DNA bola nariedená na konečnú koncentráciu 2 µg/ml v T₅E_{0,1} (5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA). Približne 2 pl nariedené DNA boli mikroinjekované do samčieho jadra oplodnených vajíčok odobraných od samičiek CB6F1 (s veľkou ovuláciou), ktoré boli spárené so samcami C57/B1/6J. Vajíčka, ktoré prežili

mikromanipuláciu, boli prenesené do vajcovodu umelo oplodnenej samičky podľa opísaných spôsobov bola (Hogan et al. (1986) Manipulating Mouse Embryo, Cold Spring Harbour Laboratory, New York).

Príklad 2

Analýza Southern blot

Myši boli analyzované na integráciu transgénu do myšieho genómu pomocou analýzy Southern blot genómovej DNA izolovanej z biopsií chvostu (Southern (1975) J. Mol. Biol. 98:503-517). Transgénne zakladateľské myši boli párené a mláďatá boli testované rovnakým spôsobom kvôli vytvoreniu transgénnych línií. Vzorky DNA s hmotnosťou 10 µg boli štiepené enzýmami Bam, HI, Eco RI a Xba I a potom boli podrobené elektroforetickej separácii na agarózovom géli s koncentráciou 0,7% a DNA bola prenesená na membránu Hybond N+ (Amersham) v alkalickom prostredí. Fragment Eco RI dlhý 3,3 kb z cDNA L1 alebo fragment Hind III dlhý 330 pb z neskoršieho zostrihu SV40 a z polyadenylačného miesta purifikovaného z plazmidu A1,5 (Maxwell et al. (1989) Biotechniques 7:276-280) bol označený náhodným primérováním s ³²Pí-alfa-CTP (Boehringer Mannheim) za účelom použitia ako próby. Prehybridizácia bola vykonaná pri 65°C jednu hodinu v 5x SSPE, 5x Denhardtov roztok, 0,5% (w/v) SDS a 0,1 mg/ml sonifikovanej nehomológovej DNA. Hybridizácia bola vykonaná cez noc. Konečné podmienky premývania pre všetky Southernové bloty boli 0,1x SSPE a 0,1% SDS (w/v) pri 65°C.

Príklad 3

Analýza Northern blot

Anestetizované dospelé myši (12 týždňov staré) boli utratené smrteľnou dávkou chlórálhydrátu a odobrané mozgy

boli okamžite zmrazené v tekutom dusíku. Celková bunková RNA bola izolovaná rozdrvením tkaniva v tekutom dusíku. Štvormolárny guanídium tiocyanát bol pridaný k rozdrvenému tkanivu. Izolácia celkovej RNA bola vykonaná ako je opísané (Chomczynski et al. (1987) Anal. Biochem. 162:156-159; Pagliusi et al. (1989) AMOG. J. Neurosci. Res. 22:113-119). Výťažky RNA boli odhadnuté z absorbancie pri 360 nm. 10 µg RNA bolo frakcionovaných na 1% agarózových a formamidových géloch kvôli analýze Northern blot (Thomas (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:201-205).

Náhodne primérovane próby cDNA L1 boli použité na súčasnú detekciu endogénnej mRNA L1 s dĺžkou 6 kb (Tacke et al. (1987) Neurosci. Lett. 82:89-94) a tiež z transgénu odvodenej mRNA L1 s dĺžkou 4,2 kb. Denzitometrická analýza Northern blotov bola vykonaná na skenovacích obrázkoch (Arcus scanner, Agfa-Gavaert) z originálnych filmov pomocou programu Image (NIH, Research Services Branch, NIMH).

Analýza Northern blot celkovej RNA z celých mozgov transgénnych zvierat odhalila transkripty odhadovanej veľkosti (4,2 kb) pre mRNA odvodenú z transgénu (Obr.2). Tieto transkripty sú jasne odlišné od endogénnej mRNA L1, ktorá je dlhá 6 kb a pochádza z postmitotických neurónov. Denzitometrická analýza odhalila, že hladiny mRNA L1 odvodenej z transgénu boli 34%, 13% a 8% v líniiach 3426, 3427 a 3418, ako to bolo porovnané s hladinami endogénnej mRNA L1 (100%).

Príklad 4

Zvieratá

Pre kultúry na kryostatických rezoch a experimenty v imunocytochémií a hybridizácii in situ boli kontrolné zvieratá brané zo zásoby rovnako starých normálnych myší C57b1/6J alebo iných netransgénnych potomkov. Pre izoláciu malých cereberálnych neurónov a pre prípravu kultúr

astrocytov boli používané šesť dní staré netransgénne mláďatá ICR. Neuróny dorzálného koreňového gangliónu (DRG) boli pripravené z osem dní starých kuracích embryí.

Príklad 5

Hybridizácia in situ

Kvôli overeniu, že astrocyty transgénnych zvierat exprimovali L1 in vivo boli analyzované optické nervy pomocou hybridizácie in situ. Bol vybraný optický nerv, pretože obsahuje len gliové bunky a neobsahuje neuronálne bunkové telieska. Astrocytom in vivo normálne chýba expresia L1 vo všetkých vývojových štádiách (nepublikované údaje).

Kvôli detekcii mRNA L1 v kryostatických rezoch čerstvo zmrazených mozgových rezov boli vytvorené dioxigenínom označené cRNA pomocou transkripcie in vitro (Dörries et al. (1993) Histochemistry 99:251-262). Sekvencia kódujúca extracelulárnu časť L1 (Moos et al. (1988)) bola subklonovaná do vektora pBluescript KS+ (Stratagene). Próby cRNA v zmysle a proti zmyslu čítania boli vytvorené prepisom inzertu L1 po linearizácii výsledného plazmidu s Xho I a/alebo Xba I pomocou promotorov T7 a T3. Kvôli vytvoreniu prób cRNA GFAP bol subklonovaný fragment cDNA GFAP (Lewis et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2743-2745; láskavo poskytnutý Dr. N. J. Cowanom) dlhý 1,2 kb a kódujúci koniec N proteínu do vektora pBluescript KS+. Próby cRNA v zmysle a proti zmyslu čítania boli vytvorené prepisom výsledného plazmidu, linearizáciou s Eco RI a Xho I z promotorov T3 a T7. Kvôli zlepšeniu prenikania do tkaniva boli próby cRNA v zmysle a proti zmyslu čítania zrovnané za podmienok alkalickéj hydrolýzy, aby sa získala priemerná dĺžka fragmentov približne 300 nukleotidov. Hybridizácia in situ na rezoch optických nervov pripravených z dospelých zvierat (12 dní starých) bola vykonaná ako je opísané (Dörries et al. (1993); Bartsch et al., J. Neurosci.,

v tlačí).

V netransgénnych kontrolách boli transkripty detekované len v nervových bunkách sietnice, ale nie v optickom nerve, ani pred (Obr.3A) ani po poškodení (Obr.3B). Naopak, mRNA L1 boli exprimované gliovými bunkami optických nervov z transgénnych myší (Obr.3C). Bunky pozitívne na mRNA L1 boli detekovateľné ako vo vzdialených myelinovaných, tak aj v bližších nemyelinovaných častiach nervu. Intenzita hybridizačného signálu bola vyššia v nemyelinovanej bližšej časti v porovnaní s myelinovanou vzdialenejšou časťou nervu.

Podobné rozmiestnenie pozitívnych buniek a podobné rozdiely v intenzite značenia medzi nemyelinovanými a myelinovanými oblasťami boli pozorované pomocou próby cRNA GFAP (porovnajzte Obr.3C a E). Počet buniek pozitívnych na mRNA L1 v optickom nerve transgénnych zvierat však bol vždy významne menší než počet buniek pozitívnych na GFAP, pravdepodobne kvôli nižšej citlivosti próby cRNA L1. Detekovateľné hladiny mRNA L1 sú alternatívne dosiahnuté v astrocytoch s vysokou hladinou expresie GFAP. Taký prahový efekt môže byť spôsobený navrhnutím transgénu GFAP-L1, ktorý obsahuje len 2 kb zo sekvencie GFAP v smere 5' konca. Štúdie in vitro dokazujú, že oblasť medzi 2 a 6 kb v protismere k miestu počiatku transkripcie obsahuje sekvenčné elementy posilňujúce expresiu GFAP riadených spojených génov v bunkách C6 (Sarid (1991) J. Neurosci. 28:217-228). Nakoniec, modifikácia exónu 1 génu GFAP vrátane vnesenia veľkej cDNA L1 môže znížiť stabilitu chimérovej mRNA v porovnaní s mRNA GFAP a meniť efekty spôsobené regulačnými sekvenciami GFAP umiestnenými v oboch smeroch v modifikovanej oblasti.

Po poškodení optického nervu bola pozorovaná zvýšená expresia L1 v transgénnych (Obr.3D), ale nie v netransgénnych (Obr.3B) optických nervoch. Počet buniek, ktoré exprimovali L1 a intenzita hybridizačného signálu L1 boli podobné u rôznych zvierat rovnakej transgéennej línie, ale líšil sa medzi rôznymi transgénnymi líniami. V zhode

s výsledkami získanými pomocou analýzy Northern blot (viď vyššie) boli bunky pozitívne na mRNA L1 najpočetnejšie v línii 3426, potom v línii 3427 a najmenej početné v línii 3418. Táto rozdielnosť v hladine expresie transgénu u rôznych línii môže byť odvodená z mnohých faktorov, zvlášť vplyvom okolitých oblastí hostiteľského chromatinu, ktoré ohraničujú rôzne transgénne integračné miesta (Proudfoot (1986) Nature 322:562-565; Reik et al. (1987) Nature 328:248-251; Sapienze et al. (1987) Nature 328:248-254).

Príklad 6

Protilátky

Výroba polyklonálnych králičích protilátok proti myšej L1 a purifikácia na imunoafinitnej kolóne na L1 (Rathjen et al. (1984); Martini et al. (1988) a polyklonálnych protilátok proti myšej pečenej membráne (Lindner et al. (1983); Pollerberg et al. (1985) boli opísané. Myšia polyklonálna protilátka proti GFAP bola kúpená (Boehringer Mannheim).

Kvôli analýze Western blot boli polyklonálne a monoklonálne protilátky zviditeľnené pomocou peroxidázy z reďkovky konjugovanej s kozími protimyšiami a/alebo králičími protilátkami (Dianova, Hamburg, Nemecko). Kvôli imunochémii boli primárne protilátky detekované pomocou konjugovaných kozích protimyších a králičích protilátok značených fluoresceínom, izotiocyanátom alebo tetrametylrodamid izotiocyanátom (Dianova). Digoxigenínom značené próby cRNA pre hybridizáciu in situ boli zviditeľnené pomocou s alkalickou fosfatázou konjugovaných fragmentov Fab k digoxigenínu (Boehringer Mannheim).

Príklad 7

Udržovanie neurónov na kryostatických rezoch

Pre analýzu, ak sú optické nervy z transgénnych zvierat viac vodivé do rastu neuritov, než optické nervy z divokého typu zvierat, boli cerebelárne neuróny udržiavané na kryostatických rezoch poškodených a nepoškodených optických nervov (Obr 7).

Optické nervy z 6 až 16 týždňov starých myší boli pripravené ako je opísané (Bartsch et al. (1989) J. Comp. Neurol. 284:451-462. Krátke, poškodené a nepoškodené optické nervy boli zakotvené a zmrazené v hormonálne definovanom médiu bez séra (Fischer (1986) Neurosci. Lett. 28:325-329) pomocou tekutého dusíku. Tkanivové rezy (14 μ m hrubé) boli pozdĺžne rozrezané na kryostate Frigocut 270 (Jung-Reichardt), upevnené do sterilného podložného sklíčka potiahnutého poly-L-lyzínom (Sigma, 0,001% vo vode) a vysušené 2 až 3 hodiny v sterilnom bloku. Potom bolo vykonané premytie rezov v médiu 5 min. Malé cereberálne neuróny purifikované cez gradient perkololu (Keilhauer et al. (1985) Nature 316:728-730) získané zo šiest dní starých myší ICR (6×10^4 buniek v 100 μ l média) boli nanesené na každé sklíčko. Bunky boli udržiavané v inkubátore pri 37°C vo zvlhčenej atmosfére 5% CO₂ a 95% vzduchu.

Rast neuritov bol tiež meraný za prítomnosti protilátok. Rezy boli predinkubované s polyklonálnymi protilátkami proti L1 alebo polyklonálnymi protilátkami proti myším pečňovým membránam (100 μ g/ml, intenzívne dialyzované a nariedené v médiu) po 1 hod. pri 37°C. Po odstránení protilátok boli rezy opatrne premyté médiom (5 krát, každé premytie 5 min. pri izbovej teplote) a potom boli pridané v Perkolovom gradiente purifikované malé cereberálne neuróny. Po dvoch dňoch boli kryostatové kultúry fixované v 4% paraformaldehyde v PBS počas doby 30 min. pri izbovej teplote a potom boli odmerané dĺžky neuritov. Aby sa vyhlo "okrajovým efektom" pri meraní, nevydnovali sa rezy,

ktoré boli umiestnené na vnútornej hrane obnášajúcej 20% zo sklíčka. Pomocou programu na semiautomatizovaný výpočet obrazovej analýzy (IBAS, Kontron, Zeiss) boli zmerané dĺžky všetkých neuritov, ktoré vyrástli na týchto rezoch a priemerná dĺžka neuritov vzhľadom na telo nervovej bunky bola vypočítaná. Pre každý experiment a optický nerv (poškodený alebo nepoškodený) bola priemerná dĺžka neuritov, ktoré rástli na nervoch transgénnych zvierat, braná vzhľadom na príslušné hodnoty kontrolných zvierat. Dvanásť nezávislých experimentov bolo vykonaných s poškodenými a nepoškodenými nervami pomocou najmenej dvoch transgénnych zvierat.

Pre transgénne zvieratá bolo pozorované predĺženie dĺžky neuritov na poškodených nervoch v porovnaní s nepoškodenými nervami. Na rozdiel od toho neboli dĺžky neuritov na poškodených a nepoškodených optických nervoch zvierat divokého typu významne odlišné (Obr.8). Neurity pestovaných neurónov na nepoškodených optických nervoch z transgénnych zvierat boli konzistentne dlhšie než neurity pestovaných neurónov na nepoškodených nervoch zo zvierat divokého typu. Maximálne zväčšenie dĺžky neuritov na 300% bolo pozorované, keď boli použité rezy z línie 3426. Podobne bola zväčšená dĺžka neuritov na poškodených nervoch transgénnych línií až na 400%, keď sa porovnali s poškodenými nervami zo zvierat divokého typu.

Aktivita podporujúca rast neuritov transgénnych optických nervov korelovala pozitívne s hladinou exprese L1 (Obr. 8). Nepoškodené optické nervy línie 3426, ktoré exprimujú najvyššiu hladinu proteínu L1, boli potentnejšie v predĺžení neuritovej dĺžky než línie 3427 a 3418, ktoré exprimovali nižšiu hladinu L1. Na poškodených optických nervoch línií 3426 a 3427 (28 dní po poškodení) bola dĺžka neuritov 4 krát väčšia než na poškodených optických nervoch zvierat divokého typu. Zistenie, že zväčšenie dĺžky neuritov v poškodených optických nervoch bolo podobné pre línie 3426 a 3427 (aj keď línia 3426 vykazuje 25% zvýšenie exprese

proteínu L1 po poškodení v porovnaní s líniou 3427) indikuje, že hladina proteínu L1 v línii 3427 už stačí na maximálnu indukciu rastu neuritov na malých cerebelárnych neurónoch.

Preinkubácia nepoškodených optických nervov zo zvierat divokého typu s polyklonálnymi protilátkami proti L1 alebo proti myším pečeneovým membránam významne neovplyvnila dĺžky neuritov (Obr. 9). Naopak, dĺžky neuritov boli redukované o viac než 50%, keď boli kryostatické rezy nepoškodených a poškodených optických nervov z transgéennej línie 3426 preinkubované s protilátkami proti L1 (Obr. 9). Protilátky proti pečeneovým membránam, ktoré silne viažu optické nervy a malé cerebelárne neuróny (údaje nie sú ukázané), nevykazujú podobné inhibičné efekty. Je zaujímavé, že preinkubácia poškodených optických nervov zo zvierat divokého typu s protilátkami proti L1 indukovala predĺženie dĺžky neuritov v porovnaní s poškodenými nervami zo zvierat divokého typu bez predchádzajúcej preinkubácie s protilátkami proti L1. Protilátky proti myším pečeneovým membránam nevykazujú významné zvýšenie za rovnakých podmienok, čo ukazuje, že prídanie bunkových povrchových reaktívnych protilátok nenaruší rast neuritov.

Príklad 8

Udržiavanie neurónov na jednovrstvových kultúrach astrocytov

Na prípravu jednovrstvových astrocytov boli vyčistené predné mozgy zo šesť dní starých myší od iného, než nervového tkaniva a boli disociované ako bolo opísané (Schnitzer et al. (1981) J. Neuroimmunol. 1:429-456; Fischer et al. (1982) Neurosci. Lett. 29:297-302; Keilhauer et al. (1985). Bunky boli udržiavané na poly-L-lyzínom potiahnutých (Sigma, 0,001% vo vode) tkanivových miskách v médiu BME (Gibco) obsahujúcich 10% konské sérum a 2 mM glutamín počas doby 14 až 21 dní. Kontaminujúce oligodendrocyty a neuróny

boli odstránené pretrepaním misiek pri každej výmene média a ďalším pestovaním buniek v intervaloch štyroch dní. Imunologické farbenie GFAP počas 14 dní udržiavania ukázalo, že viac než 90% buniek boli astrocyty. Po 14 dňoch v kultúre boli bunky skontaktované s trypsínom a udržiavané ako jedna vrstva päť dní na sklíčkach potiahnutých poly-L-lyzínom. Malé cerebelárne neuróny purifikované v gradiente Perkolu (Schnitzer et al. (1981)) zo šesť dní starých myší a dorzálne koreňové gangliónové neuróny (DRG) (Seilheimer et al. (1988) J. Cell. Biol. 107:341-351) z osem dní starých kuracích embryí boli potom pridané na jednu vrstvu astrocytov. Po 6 hodinách spoločnej kultúry pre cerebelárne a po 12 hodinách pre neuróny DRG boli bunky fixované 2% paraformaldehydrom v PBS a dĺžky neuritov boli analyzované, ako je opísané v Príklade 7.

Rast neuritov z myších malých cerebelárnych alebo kuracích dorzálnych koreňových gangliónových (DRG) neurónov bol tiež študovaný v jednovrstvových kultúrach astrocytov odvodených z transgénnych (lína 3426) alebo netransgénnych kontrol (Obr. 10, Tabuľka 1).

Tabuľka 1

Dĺžky neuritov cerebelárnych a dorzálnych koreňových gangliónových (DRG) neurónov udržiavaných na astrocytických jednovrstvách pripravených z myši divokého typu (WT) a transgéennej línie 3426.

	Cerebelárne neuróny	DRG neuróny
WT	65±34 mm	90±10 mm
WT + anti L1	72±30 mm	105±14 mm
WT + anti pečeň	57±24 mm	107±12 mm
3426	75±41 mm	137±10 mm
3426 + anti L1	45±25 mm	88± 8 mm
3426 + anti pečeň	58±31 mm	124±15 mm

Dĺžky neuritov na astrocytoch bez preinkubácie s akoukoľvek protilátkou alebo po pôsobení bez polyklonálnych protilátok proti L1 (anti L1) alebo protilátok proti myším pečeňovým membránam (anti pečeň) sú uvedené. Priemerné hodnoty ± štandardná odchýlka sú z najmenej 100 neurónov z dvoch nezávislých experimentov vykonaných dvakrát.

Dĺžka neuritov cerebelárnych neurónov alebo neurónov DRG na transgéenných astrocytoch bola približne o 15% až 50% dlhšia v porovnaní s dĺžkou neuritov u astrocytov divokého typu (Tabuľka 1). Protilátky proti pečeňovým membránam neovplyvnili dĺžku neuritov na astrocytických jednovrstvách zo zvierat divokého typu alebo z transgéenných zvierat (Obr. 10, Tabuľka 1). Preinkubácia astrocytických jednovrstiev s protilátkami proti L1 neovplyvnila významne dĺžku neuritov na bunkách zo zvierat divokého typu. Naopak, znížila dĺžku neuritov cerebelárnych neurónov a neurónov DRG pestovaných na bunkách z transgéenných zvierat približne o 40%. V tomto ohľade je pozoruhodné, že polyklonálne

protiľátky proti myšej L1 pouŹit  v tejto ťt dii nereagujú s neurónmi z kurčiat (Martini et al., 1994; údaje nie sú uvedenie). Na imunofluorescen nej analýze je vťak preuk zan , Źe tieto protiľátky sa viaŹu rovnako efektívne ako protiľátky proti L1 na astrocyty z transgénnych zvierat a na mal  cerebelárne myťie neuróny ( daje nie sú uvedenie).

Príklad 9

Imunofluorescencia a mikroskopia Aurion-GP immunogold

Imunologick  farbenie L1 a GFAP čerstvo zmrazených priečne a pozd Źne rezaných optických nervov alebo astrocytických jednovrstiev divokého typu a transgénnych zvierat boli vykonan  ako je op san  (Bartsch et al. (1989)). Pre dvojite značenie sme najprv inkubovali astrocyty ako Źiv  bunky s protiľátkami proti L1 (2 $\mu\text{g/ml}$ v 1% BSA v PBS) pri 4 C počas doby 30 min. Po permeabilizácii buniek pomocou 70% metanolu pri -20 C počas doby 10 min. boli bunky inkubovan  s protiľátkami proti GFAP počas doby 30 min pri 4 C.

Pre výpočet d Źky neuritov v experimentoch s kryostatovou kultúrou bolo pouŹit  zosilnen  farbenie Aurion immuno R-Gent striebro pod ľa pokynov výrobcu (Aurion, Immuno Gold Reagents & Accesories Custom labelling, Wageningen, Holandsko)) s malými modifikáciami. Kultúry boli fixovan  4% paraformaldehydov v PBS na 10 min. pri izbovej teplote, inkubovan  v 50 mM glycínu v PBS počas doby 10 min. a potom boli ponechan  15 min. v blokovacom pufri (BB, 0,5% BSA v PBS). Po troch premytiach v BB, kaŹd  premytie 5 min., boli bunky inkubovan  s protiľátkami proti L1 narieden mi do BB (2 $\mu\text{g/ml}$) počas 30 min. pri izbovej teplote. Potom boli kultúry premyt  3 krát v BB, kaŹd  premytie 5 min., boli pridan  sekundárne protiľátky narieden  1:20 v BB na 1 hod. pri izbovej teplote. Po troch premytiach v destilovanej vode boli kultúry fixovan  v 2%

glutaraldehyde v PBS na 10 min. pri izbovej teplote a boli znovu premyté 3 krát destilovanou vodou. Zmes zosilňovača a vývojky v pomere 1:1 bola potom pridaná pri izbovej teplote. Po objavení reakčného produktu boli sklička premyté 3 krát destilovanou vodou a uložené do glycerolu.

Imunoreaktivita na L1 v optických nervoch netransgénnych myší bola obmedzená na nemyelínované sietnicové gangliónové bunkové axóny (Bartsch et al. (1989)). V nepoškodených optických nervoch z transgénnych zvierat bola tiež nájdená slabá imunoreaktivita na L1 v spojení s bunkovými telieskami a procesmi v radiálne orientovaných bunkách (Obr. 4A). Intenzita tejto imunoreaktivity na L1 v transgénnych optických nervoch sa značne zosilnila po poškodení (Obr. 4B) a bola podobná v rozmiestnení ako imunoreaktivita na GFAP zistená v nepoškodených (Obr. 4B) alebo poškodených (neznázornené) nervoch divokého typu.

Expresia L1 bola ďalej analyzovaná v kultúrach astrocytov pripravených z predných mozgov šesť dní starých transgénnych zvierat. Žiadna imunoreaktivita na L1 nebola detekovaná na astrocytoch zo zvierat divokého typu (Obr. 5D). Naopak, bunky pozitívne na L1 boli prítomné v kultúrach z transgénnych zvierat (Obr. 5A). Ako je demonštrované pri dvojítom imunologickom farbení, tie isté bunky sa ukázali byť pozitívne na GFAP (Obr. 5B a E), čo ukazuje, že bunky exprimujúce L1 sú skutočne astrocyty. Pretože imunologické farbenie L1 bolo vykonané na živých bunkách, zdá sa pravdepodobné, že L1 je v transgénnych zvieratách tiež exponovaná na bunkovom povrchu astrocytov in vivo.

Príklad 10

Analýza Western blot

Kvôli ďalšiemu výpočtu množstva expresie L1 v transgénnych myšiach GFAP-L1 boli analyzované pomocou analýzy Western blot detergentové extrakty homogenátov nepoškodených a poškodených (15 dní po poškodení) optických nervov z myši divokého typu a transgénnych dospelých myší (Obr. 6).

Poškodené (15 dní po poškodení) a kontralaterálne nepoškodené optické nervy z 8 dní starých zvierat boli vyčistené od iných tkanív a potom boli zmrazené v tekutom dusíku. Dbalo sa, aby boli použité len myelinované distálne, a nie imunoreaktívne na L1 nemyelinované a čiastočne myelinované proximálne oblasti nervov. Nervy boli zmrazené a rozmrazené 10 krát pred sonikáciou v sonikátore Branson B15 pri 4°C počas doby 5 min. Tkanivá boli potom homogenizované v homogenizátore Dounce v homogenizačnom pufri (1% Triton X-100, 2 M močovina, 5 mM benzamidín, 0,1 mM jódoacetamid, 1 mM fenylmetánsulfonylfluorid, 5 mM Na-p-tozyl-L-lyzínchlóro-metyl ketón v PBS). Homogenáty boli vyčistené centrifugáciou pri 16000 g pri 4°C počas doby 15 min. Supernatanty boli ponechané s metanol/chloroformom, aby sa vyzrážali proteíny ako bolo opísané vo Wessel et al. (1984). Proteínová zložka bola stanovená v supernatante (Pierce). Po vykonaní SDS-PAGE na 7% plochých géloch pri redukčných podmienkach boli proteíny (25 µg) analyzované pomocou analýzy Western blot s polyklonálnymi protilátkami proti L1 (0,4 µg/ml). Sekundárne protilátky konjugované s peroxidázou z reďkovky (2 µg/ml) boli detekované pomocou blotovacej detekčnej súpravy ECL (Amersham). Denzitometrická analýza imunoblotov ukázala, že expresia L1 v nepoškodených optických nervoch transgénnych zvierat bola približne o 40% a 13% (línie 3426 a 3427) vyššie než v nepoškodených optických nervoch zvierat divokého typu. Expresia L1 v poškodených transgénnych nervoch bola o 310% a 200% (línia

3426 a 3427) vyššia než u poškodených nervoch zvierat divokého typu. Porovnanie medzi poškodenými a kontralaterálnymi nepoškodenými optickými nervami zo zvierat divokého typu odhalilo zníženú expresiu proteínu L1 o 40% na poškodenej strane. Naopak, množstvo proteínu L1 v poškodených nervoch línii 3427 a 3426 stúplo o približne 30% v porovnaní s nepoškodenými kontralaterálnymi stranami. Hladina exprese L1 v línii 3426 bola približne o 35% a 25% vyššia než v línii 3427 pre nepoškodené a poškodené optické nervy.

Príklad 11

Obnovený rast axónov v optickom nerve in vitro

6 až 8 týždňov staré transgénne myši GFAP-L1 a myši divokého typu boli utratené a po 14 dňoch boli sledované na fluoresceínom značený biotín ester za účelom označenia sietnicových gangliónových bunkových axónov postupným značením. Výsledky sú znázornené na Obr. 11 a 12. Každý bod predstavuje jedno zviera.

Príklad 12

Identifikácia hranice medzi homológnyimi opakovaniami 2 a 3 fibrínového typu III v nervovej bunkovej adhézne molekule L1 ako neuritový rast podporujúci a signál prenášajúci domény

Kvôli stanoveniu domén v nervovej bunkovej adhézne molekule L1 zodpovedných za rast neuritov boli vytvorené monoklonálne protilátky proti L1 a ich vplyv na rast neuritov malých cerebelárnych neurónov v kultúre bol sledovaný. Keď bolo 11 protilátok použitých ako substráty, len protilátka 557.B6, ktorá rozoznáva epitop reprezentovaný syntetickým peptidom obsahujúcim aminokyseliny 818 až 832 na

hranici medzi homológnyimi opakovaniami 2 a 3 fibrínového typu III, bola rovnako účinná ako L1 v podpore rastu neuritov, zvýšení hladiny intracelulárneho Ca^{2+} a stimulácii spotreby inositol fosfátov. Tieto zistenia dokazujú, že rast neuritov a zmeny v týchto druhých prenášačoch sú zhodné. Táto zhoda bola potvrdená schopnosťou antagonistov kanálov Ca^{2+} a toxínu čierneho kašľa inhibovať rast neuritov na L1 a protilátke 557.B6. Tieto pozorovania ukazujú na odlišné miesto na L1 viazané na bunkovom povrchu ako na prominentný signál prenášajúci doménu, cez ktorú prebiehajú rozpoznávacie deje na spustenie rastu neuritov, zvýšenie spotreby inozitol fosfátov a zvýšenie hladiny intracelulárneho Ca^{2+} .

Príklad 13

Imunoreaktivita L2/HNK-1 v reinervovanom periférnom nerve: prednostná expresia v motorových s axónom asociovaných Schwannových bunkách

Karbohydrátový epitop L2/HNK-1 (ďalej uvádzaný L2) je exprimovaný v dospelaj myši myelinovanými Schwannovými bunkami ventrálnych koreňov a svalových nervov, ale zriedka dorzálnych koreňov a/alebo kožných nervov. Pretože substrátovo potiahnuté glykolipidy L2 podporujú rast pestovaných motorových, ale nie zmyslových neurónov, L2 tak ovplyvňujú preferenčné reinervovanie svalových nervov skrz regeneráciu motorových axónov in vivo.

Vplyv regenerujúcich sa axónov na expresiu L2 spôsobenú reinervovanými Schwannovými bunkami bol preto analyzovaný vedením motorových a zmyslových axónov do svalových a kožných vetiev femorálnych nervov osem týždňov starých myší. Regenerujúce sa axóny z kožných vetiev neviedli k imunocytochemicky detekovateľnej expresii L2 vo svalových alebo kožných nervových vetvách. Axóny regenerujúce sa zo svalových vetiev viedli k slabej expresii L2 od niekoľkých

Schwannových buniek kožnej vetvy, ale vyvolali silnú expresiu L2 od mnohých Schwannových buniek svalovej vetvy. Myelínové Schwannove bunky predtým asociované s motorovými axónmi sa potom odlišovali od predchádzajúcich zmyslových s axónom asociovaných myelínových Schwannových buniek v ich schopnosti exprimovať L2, keď sú spojené s motorovými axónmi. Toto zvýšenie expresie L2 počas rozhodujúcich štádií reinervácie spôsobujú motorové axóny regenerujúce sa do vhodnej, svalovej dráhy s výhodou oproti tým, ktoré sa regenerujú do nevhodnej, zmyslovej dráhy.

Príklad 14

L1 v spevnení pamäti pri pasívnom vyhýbacom teste u kurčiat

Cvičenie jednodenných kurčiat pri jednej skúške na pasívnom vyhýbacom teste, pri ktorom sa kurčatá učia potláčať tendenciu dobať do malej lesklej guľôčky, ktorá je napustená horko chutiace metylántranilátom, má za následok časovo závislú bunkovú a molekulárnu kaskádu kulminujúcu až do pretvorenia presynaptických a postsynaptických elementov na dve diskrétné oblasti predného mozgu, stredný mediálny hyperstriatum ventrale (IMHV) a Lobus parolfactorius (LOP) (Rose (1991) Trends In Neurosciences 14:390-397). Kaskáda zahŕňa dve odlišné vlny glykoproteínovej syntézy, ako je to zrejmé zo zvýšenej inkorporácie fukózy, vyskytujúce sa ako v IMHV tak aj LPO v rôznych časoch po cvičení. Obidve vlny sú nutné pre dlhotrvajúce (t.j. 24 hodín a dlhšie) udržanie pamäti vo vyhýbacom teste, v ktorom je zrejmé oslabenie u kurčiat, ktoré by sa inak vyhli predchádzajúcej horkej guľôčke a dobali do suchej guľôčky v teste.

Za predpokladu úlohy L1 pri sprostredkovaní medzibunkového kontaktu bola predložená štúdia, ktorá mala stanoviť, či L1 patrí medzi glykoproteíny spájané s učením, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe vln syntézy glykoproteínov, a sú tak nutné pre tvorbu pamäti. Ak je tomu tak, protilátky

proti L1, ktoré sú podávané vo vhodnom čase vzhľadom na cvičenie, by mali zabrániť synaptickej prestavbe nutnej pre dlhotrvajúcu pamäť a preto by mali produkovať zoslabenie vykonávania cvičenia. Podobne, ak extracelulárne domény molekuly L1 majú nejaký význam v rekogničných a adhézných procesoch, ktoré sú potrebné pre synaptickú prestavbu a stabilizáciu, exogénne podávané fragmenty extracelulárnej domény, ktoré sa budú viazať homofilne na endogénne molekuly, budú narúšať tento proces.

Protilátky a fragmenty

Polyklonálne protilátky boli pripravené v králikoch imunizáciou s imunoafinitne purifikovanou L1 (Ng-CAM, 8D9) nasledovanou vykonaným imunizačným postupom (Rathjen et al. (1984)). L1 bola izolovaná z jednodenných kuracích mozgov pomocou monoklonálnej protilátkovej kolóny 8D9 (Lagenaur a Lemmon (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7753-7757) opäť podľa zavedeného postupu (Rathjen et al. (1984)). Protilátky boli izolované zo séra získaného po tretej imunizácii pomocou Proteín G Sefarózy (Pharmacia LKB) podľa pokynov výrobcu. Rekombinantne exprimované fúzované proteíny v *E. coli* reprezentujúce šesť imunoglobulínových (Ig-I-VI) a päť fibronektínových (FN1-5) opakovaní boli pripravené ako bolo opísané v Appel et al. (1993).

Sódium dodecylsulfátová elektroforéza v polyakrylovom géli (SDS-PAGE) a imunoblotty kuracích subcelulárnych frakcií 50 µl proteínu z mozgového homogenátu, z hrubých membrán, z rozpustných frakcií (Burchuladye et al. (1990) Brain Res. 535:131-138 a z postsynaptických nahromadení (Murakami et al. (1986) J. Neurochem. 46:340-348), všetko z jednodenných kuracích mozgov, bolo separovaných na SDS-PAGE za redukujúcich podmienok na 5 až 15% polyakrylovom gradientovom géli (Laemmli (1970) Nature 227:131-138, a potom bolo všetko prenesené na nitrocelulózu (Burnette (1981) Anal. Biochem. 112:195-203). Po inkubácii cez noc

s protilátkami proti L1 pri nariedení 1:1000 v Trisom pufrovanom roztoku, pH 7,2, obsahujúcim 5% sušené mlieko bez tuku, boli detekované imunoreaktívne pružky podľa predtým opísaného spôsobu (Scholey et al. (1993) *Neurosciences* 55:499-509).

Cvičebné a testovacie postupy

Jednodenné Rossove kurčatá obidvoch pohlaví, vyliahnuté v inkubátoroch, boli premiestnené v pároch do malých klietok a boli predbežne cvičené na ťobanie do malej (2,5 mm) chrómovej guľôčky namočenej do metylántranilátu, ako bolo opísané v Lossner a Rose (1983) *J. Neurosciences* 41:1357-1363. Vtáci, ktorí ťobali do horkej guľôčky, osvedčili stereotypnú zápornú odpoveď tým, že mohutne potriasali hlavou a vracali sa späť od guľôčky. 24 hodín po cvičení boli zvieratá testované na prítomnosť suchej chrómovej guľôčky zhodnej s tou predchádzajúcou. Zadržanie pasívneho učenia sa vyhýbať guľôčke bolo vidieť u zvierat, ktoré sa vyhýbali testovanej guľôčke. Pri každom opakovaní tohoto protokolu bolo cvičených a testovaných 24 až 36 kurčiat. Viac než 80% cvičených, neinjekovaných kurčiat sa normálne vyhýbalo guľôčke v teste za týchto podmienok, aj keď tu bolo niekedy zníženie vyhýbania sa u vtákov injektovaných kontrolným roztokom. Naopak, vtáci, ktorí sú cvičení na namočenú guľôčku do vody, často ťobali do suchej guľôčky a ich výsledok vyhýbania bol ledva nad 5 až 10%. Celý test a cvičenie bolo vykonávané rutinne experimentátorom, ktorý nevedel, ktoré zvieratá sú ktoré.

Injekcia

Protilátky L1 a fragmenty FN1-5 a Ig I-IV boli dializované cez noc proti 0,9% fyziologickému roztoku a koncentrácia bola upravená na 1 mg/ml pre L1 a 250 µg/ml pre fragmenty. Kurčatá dostali dvojstranné intrakraniálne injekcie do stredného mediálneho hyperstriata ventrale (IMHV) 10 µl protilátok L1 na jednu hemisféru; kontrolné

zvieratá dostali podobné injekcie fyziologického roztoku. Presné dopravenie do IMHV bolo vykonané pomocou špeciálne navrhnutého držiaku hlavy a zapúzdrenej Hamiltonovej striekačky (Davis et al. (1982) Pharm. Biochem. Behav. 17:893-896. Kurčatá, ktoré dostali zo striekačky ako fyziologický roztok tak aj protilátky pred cvičením alebo testom, nevykázali žiadnu významnú zmenu chovania a došli do guľôčky počas cvičenia podľa predpokladu. Veľký extracelulárny objem mozgu novo vyliahnutých kurčiat znamená, že injekovaná dávka je dobre tolerovaná. Predchádzajúce oznámenie ukázalo (Schley et al. (1993)), že po injekcii môže dôjsť k malej difúzii protilátok z injekovaného miesta. Presnosť umiestnenia injekcie bola rutinne monitorovaná vizuálnou kontrolou mozgov post mortem. Pri každom opakovaní experimentu bola vyhodnotená rovnako veľká skupina kurčiat, ktorá bola injekovaná buď fyziologickým roztokom a protilátkou alebo fragmentom. V experimente s L1 boli skupiny kurčiat injekované fyziologickým roztokom alebo protilátkou v jednom z ôsmich časových bodov vzhľadom na cvičenie; 2 hod. alebo 30 min. pred cvičením, alebo +1 hod., +3 hod., +4 hod., +5,5 hod., +8 hod., +12 hod. po cvičení. Na základe predchádzajúcich pozorovaní bolo predvídané, že akékoľvek efekty budú pozorované u vtákov ako po 30 min., tak aj po 5,5 hod. po cvičení, a počet opakovaní týchto časových bodov bol podľa toho väčší (N=17, 28, 17, 19, 18, 21, 19 a 18 zvlášť pre injekcie protilátky). Fragmenty FN1-5 a Ig I-IV L1 boli injekované buď po 30 min. alebo po 5,5 hod. a retenčný test bol vykonaný po 24 hod. Retencia v skupinách kurčiat s injekciami fyziologického roztoku a protilátok proti L1 alebo fragmentov L1 bola porovnaná štatisticky cez χ^2 . Výsledky sú znázornené na Obr. 13 a 14.

Príklad 15

Účasť L1 a NCAM na dlhotrvajúcu potenciáciu

Transverzné hypokampálne rezy (400 μm) z haloténom anestetizovaných samčích krýs kmeňa Wistar (180-220 g) boli pripravené podľa štandardných techník. Rezy boli udržiavané v malých komôrkach a spočiatku oživované 45 min. v hypermolárnej (320 mOsm/kg) umelej cerebrospinálnej tekutine (ACSF) pri izbovej teplote. Teplota kúpeľa bola potom zvýšená na 30°C a médium bolo vymenené na normotonické ACSF (307 mOsm/kg) obsahujúce (v mM): NaCl 124,0; KCl 2,5; Mg₂SO₄ 2,0; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,25; NaHCO₃ 26,0; glukóza 10; sacharóza 4; prebublávané 95% O₂/5% CO₂ (pH 7,4); množstvo perfúzie: 0,75 ml/min. Schafferové kolaterálne spojovacie vlákna boli stimulované stočenými platínovými a irídiovými drôtikmi (50 μm v priemere) umiestnenými v oblasti striatum radiatum v oblasti CA1. Stimulačný test pozostával z monofázových impulzov trvajúcich 100 μs každých 30 sekúnd a sila stimulácie bola upravená, aby sa získalo 30% maximálnej amplitúdy EPSP (maximálny EPSP bez posunutého populačného tréňa). Hodnoty EPSP boli zaznamenané z oblasti CA1 striatum radiatum pomocou dvoch sklenených mikropipiet (2M NaCl, 1 až 5 M Ω m) umiestnenej približne 300 μm od stimulačnej elektródy na každej strane.

Po stabilnom zázname počas doby najmenej 15 min. boli injektované protilátky a proteínové fragmenty do dendritického poľa CA1 v blízkosti (50 až 75 μm) jednej záznamovej elektródy (elektróda nastavená na 30%) pomocou modifikovaného mikroinjekčného systému (Nanolitrový injektor, WPI) kontinuálne dopravujúceho 5 nl každých 10 sekúnd až do konca experimentu pokiaľ nie je uvedené inak. Premytie protilátok s následnou indukciou LTP nebolo možné kvôli zrejým dôvodom, ale bolo overené, či sa LTP môže indukovať vnútri každého rezu záznamom z druhej elektródy, kde neboli protilátky aplikované. Aj keď

neprenikol hrot injekčnej mikropipety do rezu, bola niekedy pozorovaná malá redukcia v amplitúde EPSP, keď sa s injekciou začínalo. Tento objemový artefakt bol nezávislý na druhu injektovanej látky. Proteíny boli dialyzované proti 20 mM PBS pri pH 7,4 pokiaľ nie je uvedené inak a koncentrácie boli vzhľadom na koncentrácie v pipete.

20 min. po začiatku mikroinjektovania bola indukovaná LTP s vypuknutím stimulácie teta (TBS) pozostávajúcu z troch sledov po 4 sekundách; každý sled pozostával z desiatich vysokofrekvenčných nárazov 5 pulzov pri 100 Hz a nárazy boli oddelené 200 ms (Reichardt et al. (1991) Annu. Rev. Neurosci. 14:531-570). Trvanie stimulačných pulzov bolo zdvojnásobené počas TBS. Indukcii LTP mohlo byť úplne zabránené perfúziou 10 μ M D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoovou kyselinou (D-AP5; Tocris). Záznamy z celých buniek boli získané z neurónov CA1 pomocou "slepého" svorkového systému so svorkovým amplifikátorom EPC-9. Teplota kúpeľa bola 30°C. Svorkové elektródy boli vytiahnuté z 1,5 mm bórosilikovaného skla OD a mali rezistencie medzi 3 a 8 MOhm. Pipety neboli ani vyžíhané plameňom ani potiahnuté. Elektródy boli rutinne namočené do roztoku obsahujúceho (v mM): glukonát draselný 129; KCl 5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1; N-(1-hydroxyetyl)-piperazín-N'-(2-etánsulfónovú kyselinu) (HEPES) 5; 1,2-bis-(2-aminofenoxy)etán-N,N,N', N'-tetraoctovú kyselinu (BAPTA) 5; Na-ATP 10 a Na-GTP 0,3, s pH upraveným na 7,3 KOH. Sériová rezistencia nebola kompenzovaná. Odpovede boli spriemerované z troch až štyroch signálov. Boli vytlačené pre vizuálnu analýzu alebo uložené na disk pre neskoršiu analýzu. Štatistické vyhodnotenia boli vykonané pomocou analýzy variácií s plánovitými porovnávaniami a kontrastnou analýzou; čas bol uvažovaný ako závislá premenná s jednou úrovňou opakovaných meraní. Anti-L1 (Rathjen et al. (1984)), anti-Ig I-VI (Hynes et al. (1992)) a anti-pečeňové membránové protilátky (Linder et al. (1983)) boli vyrobené tak, ako bolo predtým opísané. Výsledky sú znázornené na Obr. 15.

Domény I-VI podobné Ig a homológne opakovania I-V typu FN III boli exprimované v baktériách a purifikované ako bolo opísané VI (Hynes et al. (1992)). Protilátky proti NCAM a axonínu-1 boli vyrobené, ako bolo opísané (Larson et al. (1986) Science 232:985-988; Bailey et al. (1992) Science 256:645-649). Produkcia oligomanozidových glykopeptidov z ribonukleázy B a kontrolných glykopeptidov z azialofetuínu bola opísaná (Larson et al. (1986)). Výsledky sú znázornené na Obr. 17.

Príklad 16

L1 má nervovo ochranný efekt

Bol vykonaný experiment na ďalšie vysvetlenie aktivity L1 v nervovom tkanive CNS. Alikvóty vzoriek myších mesencefalónových buniek boli natreté a pestované na štyroch separátnych miskách s médiami pripravenými, ako je uvedené nižšie: prvá kontrolná miska bola natretá len poly-L-lyzínom; druhá miska bola natretá poly-L-lyzínom a L1; tretia kontrolná miska bola natretá poly-L-lyzínom a laminínom; štvrtá miska bola natretá poly-L-lyzínom, laminínom a L1. Všetky misky dostali alikvótno množstvo buniek a boli inkubované za rovnakých podmienok. Po 7 dňoch boli všetky misky sfarbené na prítomnosť dopamínu a výsledok bol pozorovaný. Misky, ktoré boli natreté L1 vykazovali rast o 200% až 400% väčší než kontroly. Misky natreté laminínom vykazovali väčší rast neurítov, ale nie viac než u misiek s L1. Výsledky ukazujú, že L1 má veľký nervovo ochranný efekt, pretože životnosť buniek meraná na počet buniek, ktoré rástli, bola veľmi zvýšená proti kontrolám.

Príklad 17

Rozpustná forma L1 (L1-Fc) je funkčne aktívna a je silné činidlo v udržiavaní živých nervov

Rozpustná forma L1 bola vytvorená v bunkách COS ako rekombinantný spojený proteín L1-Fc postupom opísaným v Neuron 14:57-66, 1995. Rekombinantný proteín bol purifikovaný afinitnou chromatografiou s proteínom A a bol použitý ako substrát natretý na plastický materiál a/alebo ako rozpustná molekula pridaná do kultivačného média v 1 až 10 µg/ml. Rast neuritov a prežívanie mesencefalických neurónov odo dňa 17 krysích embryí bol skúšaný v kultúre po 7 dňoch udržiavania in vitro. Dopaminergické neuróny boli rozlíšené imunologickým farbením na dopamín-beta-hydrolázu (DBH) a boli spočítané pomocou morfometrického vybavenia IBAS. Kultúry s pridanou rozpustnou L1-Fc boli udržiavané na poly-DL-ornitíne (PORN) a substrátovo potiahnutej L1-Fc boli pridané na vrch predtým potiahnutých PORN (za podmienok opísaných v Appel et al., J. Neuroscience 13:4764-4775, 1993. NCAM-Fc bola použitá ako kontrola.

Tabuľka - Prežívanie a rast neuritov neurónov DBH- počas 7 dní in vitro

	počet neurónov-	dĺžka neuritov--
substrátovo natreté L1	129±20	179±40
rozpustná L1	98± 7	135±27
len PORN (kontrola)	14± 2	37± 9

Stredné hodnoty sú z aspoň troch nezávislých experimentov
± SEM

- Počty sú z jednotky pole

-- Dĺžky všetkých neuritov (celková dĺžka neuritov) na jeden neurón boli stanovené (v µm)

Rozpoznávanie medzi nervovými bunkami je dôležitá podmienka pre vývoj funkčnej nervovej sústavy. Rozpoznávacie molekuly sú exprimované na bunkovom povrchu, kde sprostredkovávajú interakcie medzi susediacimi bunkami, napr. sú to cadheríny, alebo interakcie medzi bunkovým povrchom a extracelulárnym matrixom, napr. sú to integríny (Takeichi, 1991; Ruoslahti, 1988; Hynes, 1992). Najdôležitejšiu rodinu rozpoznávacích molekúl zastupujú imunoglobulínu (Ig) podobné domény. Ig podobné domény reflektujú spoločného predka imunoglobulínov a bunkových adhézných molekúl, obidve molekuly sa zúčastňujú špecifických rozpoznávacích procesov (Edelman, 1970). V nervovej sústave obsahuje rodina Ig viac než 24 rôznych molekúl. Niektoré molekuly obsahujúce Ig podobné domény majú mnoho funkcií v extracelulárnej doméne: receptory pre cytokíny a neurotropíny majú vysoké afinitné funkcie rovnako ako rozpoznávacie vlastnosti (Tannahill et al., 1995; Pulido et al., 1992). Trojrozmerná štruktúra Ig podobných domén je podobná FN podobným opakovaniám (Main et al., 1992; Leathy et al., 1992), čo sú tiež štruktúrne motívy v niekoľkých molekulách extracelulárneho matrixu, ako je fibronektín, členovia tenascínovej rodiny a iné (Williams a Barclay, 1988; Baron et al., 1992; Erickson, 1993). Nervové rozpoznávacie molekuly rodiny Ig majú charakteristický časový, priestorový a bunkovo typový expresný profil (prehľadné články, viď Edelman, 1988; Schachner, 1991; Rathjen a Josseli, 1991; Rutiehauser, 1993). Rozpoznávajúce molekuly tejto rodiny sa funkčne prekrývajú v tom, že všetky podporujú adhéziu buniek a rast neuritov. Niektoré rozpoznávajúce molekuly sú silne homofilické, t.j. navzájom sa viažúce, a naopak iné sú predovšetkým heterofilické, t.j. viažu sa na nerovnakých partnerov, ktorými sú často iní členovia rodiny Ig alebo molekuly extracelulárneho matrixu (Brümmendorf a Rathjen, 1993, 1994). Súčasná znalosť funkčných vlastností individuálnych Ig podobných domén a FN podobných opakovaní nervových rozpoznávacích molekúl ukazuje

na rôzne a prekrývajúce sa funkčné vlastnosti pri rozpoznávaní, raste neuritov a odpudzovaní (Gennarini et al., 1991; Frel et al., 1992; Taylor et al., 1993; Appel et al., 1993, 1995; Pesheva et al., 1993; Feisenfeld et al., 1994; Hoim et al., 1995).

Medzi nervovými rozpoznávacími molekulami rodiny Ig, rodiny molekúl podobných nervovej rozpoznávacej molekule L1 sa ukazuje veľká podobnosť vo funkcii a štruktúre. Sú to silné promotory rastu neuritov a sú primerane exprimované počas neskoršieho vývoja, najviac v dobe prvého výskytu axogenézy. Sú prednostne exprimované v neurónoch, aj keď niektorí členovia rodiny L1 sa tiež vyskytujú v gliových bunkách, ktoré sami o sebe sú podporné pre neurity (Martini a Schachner, 1986; Bixby et al., 1988; Seilheimer a Schachner, 1988).

V experimentoch, ktoré nasledujú, je identifikovaný a charakterizovaný iný člen rodiny L1, ktorému je blízky homológ L1, a to je CHL1. CHL1 obsahuje šesť Ig podobných domén a FN podobných opakovaní, z ktorých štyri sú vysoko homológne k FN podobným opakovaniam iných členov rodiny L1. Neúplné FN podobné opakovaniam je umiestnené v oblasti ležiacej blízko membrány, čo je najviac variabilná oblasť medzi molekulami podobnými s L1. Iné vlastnosti CHL1 zdieľané s členmi rodiny L1 sú: expresia v neskorom vývoji štádiu v nervovej sústave a vysoká miera N-glykozidácie, vrátane expresie karbohydrátu HNK-1.

Príklad 18

Myši ICR a krysy Wistar boli používané na tkanivové preparácie

Protilátky

Polyklonálne protilátky vyvolané proti rekombinantne exprimovanej extracelulárnej časti CHL1 (aminokyseliny 499 až 1063 (Obr. 18 a 19)) a L1 (aminokyseliny 126 až 1981

(Appel et al., 1993)) boli vyvolané v králikoch, ako bolo opísané (Rathjen a Schachner, 1984). Za účelom vyvolania protilátok proti CHL1 bolo do králika injektované 200 µg purifikovaného peptidu a potom ešte 4 ďalšie injekcie po 100 µg v intervaloch troch týždňov. Protilátky proti L1 boli skoncentrované zo séra vyzrážaním amónium sulfátom (13,5 mg/ml). Monoklonálna kryšia protilátka 412 bola použitá na identifikáciu karbohydrátového epitopu HNK-1 (Kruse et al., 1984). Monoklonálne protilátky proti gliovému fibrilárnemu kyslému proteínu (GFAP) boli získané od Boehringera (Mannheim). Monoklonálne protilátky proti antigénu O1 boli opísané (Sommer a Schachner, 1981).

Purifikácia nervových adhézných molekúl

L1, N-CAG a MAG boli imunoafinitne purifikované z detergentových extraktov hrubých bunkových frakcií z dospelého myšieho mozgu pomocou kolón s monoklonálnymi protilátkami (Rathjen a Schachner, 1984; Falssner et al., 1985; Poltorak et al., 1987).

Knižnice cDNA a ich testovanie

Preparácia knižnice lambda gt11 odvodennej z poly(A)* RNA z mozgu z 8 dní starých myší a testovanie tejto knižnice imunoafinitne purifikovanými polyklonálnymi protilátkami proti L1 boli vykonané podľa (Tacke et al., 1987). Za účelom získania ďalších klonov cDNA bola vytvorená nová knižnica DNA: RNA bola purifikovaná z mozgov 6 až 14 dní starých myší spôsobom cez guanídium tiocyanát/kyslý fenol (Chomezynski a Sacchi, 1987). Poly(A)* RNA bola obohatená cez dve po sebe nasledujúce pasáže cez kolónu s oligo(dT) celulózou (Sambrook et al., 1989). 8 µg poly(A)* RNA bolo použité na syntézu oligo(dT) primérovanej dvojvláknovej cDNA pomocou súpravy na syntézu cDNA (Amersham). cDNA bola vybratá podľa veľkosti a bola ligovaná do plazmidu pXMD1 s adaptormi DraIII obsahujúcimi miesto SalI (Kluxen et al., 1992). Za účelom propagácie a amplifikácie knižnice bol použitý kmeň

E. coli TOP10 (Invitrogen, Holandsko). Pri testovaní boli alikvóty priamo nanesené na nylónové membrány (BIODYNE™ Pall) s hustotou 2×10^4 baktérií na filter (138 cm^2). Replikované filtre boli inkubované cez noc pri 37°C . Potom boli baktérie lyzované ($0,5\text{M NaOH}$; $1,5\text{M NaCl}$), filtre boli neutralizované (3M NaCl ; $0,5\text{M Tris-HCl}$ pH 8,0), premyté v $2 \times \text{SSC}$, vysušené a zapekané 2 hod. pri 80°C . Silonové membrány boli prehybridizované, potom hybridizované s fragmentom dlhým 1 kb (HincII/KpnI) z CHL1 (odvodené z knižnice lambda gt11), boli rádioaktívne označené náhodným primérováním (Boehringer Mannheim) podľa pokynov výrobcu, premyté za silne stringentných podmienok pri 42°C a potom exponované na film, ako bolo opísané (Sambrook et al., 1989). Šesť pozitívnych klonov bolo ďalej charakterizovaných reštrikčným mapovaním a sekvencovaním podľa štandardných protokolov (Sambrook et al., 1989). Jeden klon (pX#2), ktorý obsahoval inzert CHL1 dlhý 4,43 kb, bol ďalej charakterizovaný.

Sekvencovanie DNA a sekvenčná analýza

Nukleotidové sekvencie boli určené reťazovou terminačnou metódou dideoxy (Sanger et al., 1977) pomocou dvojvláknovej DNA ako predlohy pre T7 DNA polymerázu (Pharmacia) a syntetických oligonukleotidov ako primérov. Sekvencia cDNA boli zostavené a analyzované programom DNASTAR (DNASTAR, Inc., Londýn). Pokiaľ nie je uvedené inak, boli aminokyselinové sekvencie porovnané pomocou Jolun Heinovej metódy (Hein, 1990) (veľkosť medzier = 11, dĺžka medzier = 5, hodnota $K = 2$).

Porovnanie proteínových sekvencií

Kvôli výpočtu indexu podobnosti (%) na porovnanie vzdialeností medzi konzervovanými aminokyselinovými zvyškami bolo niekoľko rozdielnych proteínov obsahujúcich šesť Ig podobných domén a aspoň 4 FN podobné domény porovnané v konzervovaných aminokyselinových zvyškoch v Ig podobných

doménach (cysteíny, kde sú mostíky S-S) a v FN podobných opakovaníach (tryptofán a tyrozín/fenylalanín). Počet aminokyselinových zvyškov medzi týmito konzervovanými miestami bol určený. Tento počet je uvedený ako konzervovaná vzdialenosť. Priemerná hodnota vzdialenosti, t.j. konsekné vzdialenosti a štandardné odchýlky (SD) medzi členmi rodiny L1 bola vypočítaná. Hodnota SD bola zaokrúhlená na najbližšie vyššie celé číslo. Vzdialenosť pre každý proteín bola porovnaná s priemernou vzdialenosťou a považovaná za zhodnú, pokiaľ sa hodnota vzdialenosti rovnala priemernej hodnote $\pm$ SD (=konsenzná vzdialenosť). Počet zhôd až do 18 konsenzných vzdialeností bol vypočítaný pre každý individuálny proteín (index podobnosti = počet zhôd / 19 x 100). Napríklad: V proteíne CHL1 sa zhoduje 16 hodnôt vzdialenosti aj keď tri zo všetkých kritérií sa nezhodujú. To dáva index podobnosti 16 - 19 alebo 84% pre CHL1.

Príklad 19

Bunková kultúra a expresia CHL1 a L1 v bunkách COS-1

Inzert klonu pX#2 dlhý 4,43 kb bol ligovaný do pXMD1 štiepeného SalI (Kluxen et al., 1992; Kluxen a Lobbert, 1993). Subfragment EcoRI (plazmid polylinker)/PvuII pb 4048) myší cDNA L1 (Moos et al., 1988) bol ošetrený T4 DNA polymerázou a ligovaný do pXMD1.

Bunky COS-1 udržiavané v DMEM (0,1% glukóza) a doplnené 10% (v/v) fetálnym teľacím sérom pri 37°C vo zvlhčenej atmosfére s 5% CO₂. DEAE dextránom sprostredkovaná transfekcia DNA bola vykonaná, ako bolo opísané (Kluxen et al., 1992) s niektorými modifikáciami. Krátko, bunky boli stočené na hustotu 10000 buniek na cm². O jeden deň neskôr, po dvoch premytiach s DMEM (0,45% glukóza), bolo médium nahradené transfekčným roztokom zloženým z DMEM doplneným 10% (v/v) Nu-sérom (Becton Dickinson, Švajčiarsko), 0,4 mg/ml (w/v) DEAE-dextránom (Pharmacia), 50 μ M

chlóroquinónom a 1,25 μ d/ml DNA (w/v) (4 ml na miskú s priemerom 10 cm). Bunky boli inkubované 4 hod. pri 37°C a v 5% CO₂. Potom bolo médium odstránené a bunky boli inkubované 2 min. vo fosfonátovom pufri (pH 7,3, obsahujúcom 10% dimetylsulfoxid (v/v)). Po dvoch premytiach s DMEM (0,45% glukóza) bol pridaný DMEM doplnený 10% (v/v) fetálnym teľacím sérom a 20 μ g/ml gentamycínu a bunky boli inkubované v tomto médiu. O 24 hodín neskôr boli bunky oddelené od steny po inkubácii s 0,01% trypsínom a 0,0004% EDTA v Hanksovom rovnovážnom soľnom roztoku (HBSS) počas doby 5 min. a pri 37°C., boli znovu rozotreté kvôli imunochémii pri hustote 20000 buniek na cm² v 24 komôrkových miskách (falkon) obsahujúcich poly-L-lyzínom natreté sklenené otvory (11 mm v priemere) a boli inkubované ďalších 24 hodín. Pre analýzu Western blot boli bunky znovu rozotreté na misky s tkanivovou kultúrou a inkubované ďalších 48 hod.

Bunky PC12 boli udržiavané v DMEM doplneným 10% (v/v) fetálnym teľacím sérom a 5% (v/v) konským sérom na kolagénom potiahnutých miskách pre tkanivové kultúry. Pre indukciu buniek s nervovým rastovým hormónom (NGF) bolo médium odstránené z jednovrstvy pri 50% zhlukovaní a nahradené médiom so zníženým obsahom séra (5% konské sérum) doplneným 100 ng/ml 7s-NGF (Sigma, Švajčiarsko). Po dvoch dňoch inkubácie boli bunky oddelené od steny po inkubácii s 0,01% trypsínom a 0,04% EDTA, boli stočené a podrobené extrakcii RNA.

Primárne kultúry astrocytov boli pripravené podľa McCarthy a De Vellis (1980) s modifikáciami (Guénard et al., 1994) a použité na imunologické farbenie po jednom až dvoch dňoch in vitro. Primárne kultúry oligodendrocytov boli pripravené, ako bolo opísané v Laeng et al., (1994) a udržiavané in vitro počas doby 12 dní.

Príklad 20

Výroba protizmyslovej RNA

Inzert klonu pX#2 dlhý 4,43 kb bol ligovaný do pBS II SK štiepeného SalI (Stratagene) a potom sa vystrihol fragment ApaI (vektor)/AvrII (pb3330 (Obr. 18)) za účelom získania fragmentu cDNA CHL1 kódujúceho extracelulárnu časť proteínu (viď Obr. 18 a 19). Podobná konštrukcia pre L1 bola pripravená ligáciou fragmentu EcoNI (plazmid polylinker)/EcoRI (pb 3304) cDNA L1 (Moos et al., 1988) ošetrovaného T4 DNA polymerázou a ligovaného do pBS II SK-štiepeného SmaI. Plazmidy boli štiepené XbaI a použité na syntézu protizmyslovej RNA označenej ^{32}P pomocou T7 RNA polymerázy, ako bolo opísané (Melton et al., 1984).

Analýza Northern blot

Poly(A)⁺ mRNA bola pripravená z rôznych tkanív práve narodených a 9 dní starých myší pomocou súpravy Oligotex™ Direct mRNA (QIAGEN Inc., Düsseldorf, Nemecko) podľa pokynov výrobcu. Poly(A)⁺ mRNA a značka RNA (rebrík RNA, GIBCO/BRL) bola podrobená elektroforéze na 0,8% formamid/agarózovom géli a potom bola prenesená na membránu Hybond-N (Amersham) pomocou kapilárneho prenosu (Southern, 1975) v 20xSSC. Po väzbovom spojení pomocou UV (OV-Stratalinker® 1800, Stratagene, La Jolla, CA), bolo množstvo DNA prenesené a naviazané na membránu skontrolované farbením metylénovou modrou (Sambrook et al., 1989). Po prehybridizácii 2 hod. pri 65°C bola membrána hybridizovaná cez noc s CHL1 a L1 špecifickými ^{32}P označenými protizmyslovými próbami RNA v hybridizačnom pufri (5xSSC, 2,5x Denhartov roztok, 50 mM Na₂PO₄ (pH 6,5), 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 2 µg/ml DNA z lososieho mlieka, 50% formamid) pri 65°C. Filter bol potom 3 krát premytý pri 65°C v 0,1x SSC, 0,1% SDS počas doby 1 hod. a bol exponovaný na film.

Príklad 21

Expresia a purifikácia rekombinantného proteínu CHL1 v *E. coli*

cDNA-fragment CHL1 dlhý 1,7 kb (MscI; pb 1791 (ktorý pochádza z klonovacieho miesta vektoru a 5'konca klonu CHL1 odvodeného z lambda gt11) a BsmAI; pb 3494) kódujúci šiestou Ig podobnú doménu (Ig VI) a FN podobné opakovania 1, 4, 5 (viď Obr. 18 a 19b) bol subklonovaný do unikátneho reštrikčného miesta BamHI vektora pET (Studier a Moffatt, 1986). Správna sekvencia plazmidu bola potvrdená sekvencovaním. Kmeň *E. coli* BL21 (DE3) bol transformovaný týmto plazmidom. Expresia a purifikácia rekombinantného proteínu cez iónovo výmennú chromatografiu bola vykonaná podľa Appel et al. (1993). SDS-PAGE a farbenie Coomassie ukázalo hlavný prúžok s predpokladanou molekulovou hmotnosťou (70 kD), ktorý obsahoval aspoň 80% celkového proteínu (nie je ukázané).

Tkanivové frakcie

Detergentové lyzáty celého tkaniva boli pripravené homogenizáciou tkaniva v 40 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), 1% Triton X100 a boli udržiavané v 4°C počas 3 hodín za neustáleho miešania. Rozpustná frakcia bola oddelená od nerozpustného materiálu centrifugáciou pri 100 000 g.

Za účelom prípravy detergentových lyzátov membránových frakcií boli tkanivá homogenizované v 1 mM NaHCO₂ (pH 7,9, 0,2 mM MgCl₂, 1 mM spermidín, 5 µg/ml aprotonín, 10 µg/ml trypsínový inhibítor zo sójových bôbov, 1 mM PMSF a 0,5 mM jódoacetamid pri 4°C. Membránové a rozpustné frakcie boli potom oddelené a membránový sediment bol rozsuspendovaný v solubilizačnom roztoku (20 mM Tris-HCl (pH 7,9), 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Triton X100, 5 µg/ml aprotonín, 10 µg/ml trypsínový inhibítor zo sójových bôbov, 1 mM PMSF a 0,5 mM jódoacetamid).

Tranzientne transfekované bunky COS-1 boli dvakrát premyté s HBSS a inkubované v 1 mM EDTA v HBSS počas doby 10 minút pri 37°C. Bunky boli potom odstránené pomocou opálenej Pasteurovej pipety a stočené centrifugáciou pri 200 g 10 min. pri 4°C. Bunky boli lyzované v 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM jódoacetamid, 1 mM PMSF a 1% MP-40 a supernatant bol prečistený centrifugáciou (13000 g). Určenie proteínov bolo vykonané ako je opísané v Bradford (1976).

Analýza Western blot

Proteíny boli oddelené pomocou SDS-PAGE (Laemmli, 1970) na 8% alebo 10% plochých géloch za redukčných podmienok a prenesené na nitrocelulóзовé filtre (0,45 µm, BA 85; Schleicher & Schuell, Dassel, Nemecko) kvôli imunodetekcii podľa Faissner et al., (1985) pomocou antiséra CHL1 (nariedené 1:500, 1:10000 pre ECL), polyklonálne protilátky proti L1 (nariedené 1:1000, 1:15000 pre ECL), monoklonálne protilátky 412 (nariedené 1:1000, 1:10000 pre ECL) a alkalické s fosfatázou spojené sekundárne protikrysie a protikráličie IgG. Naviazané protilátky boli detekované buď zosilnenou chemiluminiscenciou (ECL) podľa pokynov výrobcu pomocou blotovacích detekčných činidiel (Amersham) a filmov alebo pomocou BCIP a NBT ako chromogénnych substrátov.

Príklad 22

Enzýmová spojovacia imunosorbentná skúška

Enzýmová spojovacia imunosorbentná skúška (ELISA) bola vykonaná ako bolo opísané v Husmann et al., (1992) s tou výnimkou, že proteíny boli natreté v koncentráciách 100 ng/ml. Antisérum CHL1 bolo použité v niekoľkých zriedeniach medzi 1:250 a 1:2x10⁶.

Deglykozilácia CHL1

Detergentové lyzáty homogenátu mozgového tkaniva (200 µl, s proteínovou koncentráciou 6 mg/ml) zo 7 dní starých myší boli oddelené na rozpustnú frakciu a nerozpustný materiál centrifugáciou (viď Tkanivové frakcie) a boli inkubované s 0,5 jednotkami N-glykozidázy F alebo 2,5 jednotkami O-glykozidázy alebo s obidvoma enzýmami v rovnakých koncentráciách podľa pokynov výrobcu (Boehringer Mannheim, Nemecko). Lyzáty boli rozdelené na 10% géloch SDS-PAGE. Proteíny boli prenesené na nitrocelulózu a boli inkubované s antisérom CHL1 (1:500 nariadené) vyvolaným proti rekombinantnému fragmentu proteínu CHL1 (viď Obr. 18).

Imunoprecipitácia

Rozpustná frakcia detergentových lyzátov homogenátu z mozgových tkanív (s proteínovou koncentráciou 300 mg/ml) z 9 dní starých myší (viď Tkanivové frakcie) bola inkubovaná s 10 µl antiséra CHL1 alebo s polyklonálnymi protilátkami proti L1 cez noc pri 5°C v 5 ml pufra (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) obsahujúcim 1% NP40 a 30 µl G-Sefarózy (Pharmacia/LKB). Po postupnom premytí v pufroch obsahujúcich 0,1% NP40, 0,05% SDS a potom 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) boli guľôčky Sefarózy povarené na 10 min. v 5x koncentrovanom nanášacom pufri (250 mM Tris-HCl (pH 6,6), 10% SDS, 50% glycerolu, 0,5% brómfenolová modrá, 25% B-merkaptóetanol) a supernatant bol rozdelený na 10% géloch SDS-PAGE. Proteíny boli prenesené na nitrocelulózu a detekované polyklonálnymi protilátkami proti L1, antisérom CHL1 alebo monoklonálnou protilátkou 412 pomocou analýzy Western blot.

Nepriama imunofluorescencia

Za účelom sfarbenia bunkového povrchu (Schnitzer a Schachner, 1981) boli bunky COS-1 transfekované CHL1 a slepo (len vektor) nanesené do komôrok a inkubované

30 min. pri izbovej teplote spoločne s primárnymi protilátkami (antisérum CHL1 (nariedené 1:100) alebo polyklonálnymi protilátkami proti L1 (nariedenými 1:200)) v DMEM obsahujúcom 10% fetálne teľacie sérum, 10 mM HEPES (pH 7,3) a 0,02% NaN₃ a potom so sekundárnymi protilátkami. Po imunologickom farbení boli bunky fixované 4% paraformaldehydom vo fosfátovom pufri (pH 7,3) a boli ponechané v Moviolu (Hoechst) obsahujúcom 2,5% jodid draselný. Pre dvojité imunofluorescenčné farbenie astrocytov a oligodendrocytov bola vykonaná inkubácia primárnych protilátok s povrchovými bunkovými antigénmi ako bolo opísané pre transfekované bunky COS-1. Potom bola vykonaná inkubácia buniek s primárnymi protilátkami proti medzibunkovému antigénu po permeabilizácii buniek metanolom pri -20°C.

Príklad 23

Hybridizácia in situ

Za účelom vytvorenia protizmyslových prób cRNA označených digoxigenínom s rovnakou veľkosťou z príslušných častí CHL1 a L1 boli použité rovnaké konštrukcie ako pre analýzu Northern blot. Zmyslové próby boli vytvorené z podobných konštrukcií s inzertami v opačnej orientácii. Všetky próby cRNA boli vytvorené pomocou T7 RNA polymerázy nasledované alkalickým pôsobením kvôli získaniu priemernej dĺžky fragmentov 250 nukleotidov. Hybridizácia in situ bola vykonaná ako bolo opísané (Bartsch et al., 1992; Dorries et al., 1994).

Výsledky a diskusia

Identifikácia cDNA CHL1

Testovanie expresnej knižnice lambda gt11 na klony cDNA kódujúce bunkovú adhéznú molekulu L1 cez polyklonálne protilátky vyvolané proti imunopurifikovanej L1 z mozgu

(Tacke et al., 1987) identifikovalo klon 311. Tento klon obsahoval neúplnú cDNA homológnu k L1 (34,1% podľa Lipman a Pearson (1985)) a otvorený čítací rámec dlhý 2112 párov báz (pb) kódujúci 704 aminokyselín vrátane cytoplazmovej časti. Kvôli izolácii klonov cDNA s úplnou dĺžkou bol použitý fragment DNA tohoto klonu na testovanie inej knižnice cDNA. Bolo izolovaných šesť nezávislých klonov. Dva klony obsahovali inzerty dlhé 4,2 a 4,4 kb, ktoré obsahovali úplnú kódujúcu oblasť blízkeho homológu L1 (CHL1). Klon obsahujúci insert dlhý 4,4 kb bol ďalej skúmaný.

DNA a odvodené aminokyselinové sekvencie a štruktúrne vlastnosti

Inzert, ktorý je dlhý 4,4 kb, kóduje 5'netransplantovanú oblasť dlhú 295 pb, otvorený čítací rámec dlhý 3627 pb a 3'netransplantovanú oblasť dlhú 518 pb (Obr. 18). Aj keď je na 3'konci úsek oligo(A), jasný konsezný polyadenylačný signál chýba. Sekvencia okolo štartovacieho kodónu ATG (pozícia 296, Obr. 18) nemá optimálnu konsenznú sekvenciu pre inicializáciu translácie (Kozak, 1987). Ale tento kodón ATG je vzatý ako štartovací kodón pre transláciu na základe dvoch dôkazov. Proti smeru translácie je predchádzaný terminačnými kodónmi vo všetkých troch čítacích rámcoch a po ňom nasleduje potenciálna signálna sekvencia s miestom štiepenia predpokladaným po zvyškoch 24 alebo 25 (hodnoty 8,65 a 6,40 podľa algoritmu von Heijne (1986)) (Obr. 18).

Translácia otvoreného čítacieho rámca dáva proteín s dĺžkou 1209 aminokyselín s vypočítanou molekulovou hmotnosťou 134,9 kD a profil charakteristický pre integrálny membránový glykoproteín. Pravdepodobná extracelulárna doména je zložená z 1081 aminokyselín s 18 potenciálnymi miestami pre N-glykozidáciu (Obr. 18 a 19a) a viac než 60 O-glykozilačných konsenzných miest (nie je ukázané) (Pisano et al., 1993), po nej nasleduje transmembránová doména dlhá 23 aminokyselín, ako je usudzované z hydropatickej analýzy

podľa Kyte a Doolittle (1982) (Obr. 19c). Táto doména je na svojom N-terminálnom konci ohraničená polárnym zvyškom a na svojom N-terminálnom konci ohraničená zásaditou aminokyselinou, čo súhlasí pre transférový signál terminázy (Obr. 18). Intracelulárna oblasť je zložená zo 105 aminokyselinových zvyškov.

Extracelulárna oblasť obsahuje dva hlavné motívy opakovaných domén, ktoré sú charakteristické pre rodinu L1: úsek dlhý 685 aminokyselín s homológiou k doménam podobným Ig a úsek dlhý 472 aminokyselín s homológiou k opakovaniam podobným FN (Obr. 1 a 2a). Všetkých šesť domén podobných Ig obsahuje charakteristický pár cysteínových zvyškov, ktoré sú umiestnené vo vzdialenostiach 47 až 54 aminokyselín od seba (Obr. 19). Konzervovaný prolín (s výnimkou šiestej domény podobnej Ig) na konci štruktúry beta B v spojení s úsekom typu C2 konzervovaných aminokyselín okolo druhého cysteínového zvyšku v každej doméne (DXGXYXCXAXN) porovnáva domény podobné Ig podľa sady C2 (Williams a Barclay, 1988). Medzi doménami podobnými Ig a transmembránovou oblasťou sú štyri domény, ktoré sú homológne k opakovaniam podobným FN vo fibronektíne (Kornblihtt et al., 1985). Každá z týchto domén, približne 100 aminokyselín, obsahuje veľmi konzervovaný tryptofán (s výnimkou prvého opakovania podobného FN) a tyrozínové/fenylalanínové zvyšky v N- a C-terminálnych oblastiach. Je zaujímavé, že piate opakovanie podobné FN je len polovičné na rozdiel od iných členov rodiny L1 (Obr. 18). Ak toto polovičné opakovanie podobné FN predstavuje jednu z niekoľkých alternatívnych zostrihových foriem, z ktorých jedna obsahuje úplnú doménu podobnú FN, môže sa určiť spôsobmi inými ako je analýza Northern blot. V tomto kontexte je dôležité, že nebol nájdený žiadny dôkaz pre alternatívny zostrih pomocou reštrikčnej analýzy šiestich nezávisle izolovaných klonov (nie je ukázané). Alternatívny zostrih tejto domény podobnej FN bol pozorovaný u CAM/BRAVO, kde boli izolované izoformy cDNA, ktorým chýba piate opakovanie podobné FN (Grumet et al., 1991; Kayyem

et al., 1992). Neprítomnosť piatej domény podobnej FN v kuracom neurofascíne (Volkmer et al., 1992) je najpravdepodobnejšie tiež spôsobená alternatívnym zostrihom, pretože jeho krysí homológ, ankyrín väzbový glykoproteín (ABGP) (Davis et al., 1993), obsahuje piatu doménu podobnú FN. Takže CHL1 vnáša nový štruktúrny rys do rodiny L1: len štyri a jedno polovičné opakovanie podobné FN je exprimované (Obr. 19).

Iným štruktúrnym rysom CHL1 je prítomnosť sekvencie RGD (aminokyseliny 185 až 187) v druhej doméne podobnej Ig (Obr. 18). Tento tripeptid bol pôvodne identifikovaný ako miesto bunkového prichytenia vnútri desiatej domény fibronektínu typu III (Pietschbacher a Rusolahti, 1984) a prispieva k väzbe na integrín (pre prehľad viď Rusolahti a Pietschbacher, 1987). Trojrozmerná štruktúrna analýza opakovaní podobných FN ukázala, že motív RGD je umiestnený medzi štruktúrami beta F a G (Main et al., 1992). Tento motív sa tiež nachádza u iných členov rodiny L1. Pri treťom opakovaní podobnom FN kuracej Ng-CAM (Burgoon et al., 1991) a druhových homológoch kuracieho neurofascínu a krysej ABGP sa nachádza sekvencia RGD na rovnakom mieste, t.j. medzi štruktúrami beta F a G. Motívy RGD sa tiež nachádzajú pri L1 (dva pri myšej L1 a krysej (NILE) a jeden pri ľudskej L1 (Moos et al., 1988; Hlavin a Lemmon, 1991; Prince et al., 1991). Všetky sekvencie RGD pri L1 sa nachádzajú v šiestej Ig podobnej doménam, ale v rôznom aminokyselinovom zložení ako RGD v FN podobných moduloch fibronektínu. Rovnako ako pri L1 je tripeptid u CHL1 umiestnený v štruktúre beta E druhej Ig podobnej domény. Nie je v súčasnosti známe, či sú sekvencie RGD u týchto proteínov funkčne aktívne. V tomto kontexte je zaujímavé, že predĺženie neuritov indukované molekulou TAG-1 (Furley et al., 1992), členom rodiny F3/F11 (Brümmendorf a Rathjen, 1993, 1994), ktorý obsahuje motív RGD v druhej FN podobnej doméne, závisí na B, integríne a L1 (Felsenfeld et al., 1994). Toto pozorovanie zvyšuje možnosť priamej fyzickej interakcie medzi druhým opakovaním podobným

FN a integrínom beta1.

CHL1 tiež obsahuje sekvenciu DGEA (aminokyseliny 555 až 558) v štruktúre beta C šiestej Ig podobnej domény (Obr. 18). Táto sekvencia sa nenachádza u ostatných členov rodiny L1. Sekvencia DGEA sa tiež zúčastňuje pri rozpoznávaní integrínu alfa2 beta1 a kolagénu typu I, ktorý obsahuje tento motív (Staatz et al., 1991).

Štruktúrna podobnosť CHL1 s inými rozpoznávacími molekulami rodiny Ig

Porovnanie aminokyselinovej sekvencie CHL1 s translatovanou génovou sekvenčnou databankou EMBL ukázalo, že CHL1 je z 87,2% identická k 109 aminokyselín dlhému úseku a z 79,6% identická k 93 aminokyselín dlhému úseku predtým identifikovanému v ľudskom mozgu (príjmové číslo HS2431 a HSXT02610 (Adams et al., 1992, 1993)). Takže sa ukazuje, že u človeka existuje veľmi konzervovaná molekula CHL1. Sekvencie myšej, ľudskej a krysej L1/NILE, kuracej Ng-CAM, kuracej Nr-CAM, L1.1 zebričky (Tongiorgi et al., 1995), kuracieho neurofascínu/krysej ABGP, Drozofilieho neurogliánu (Bieber et al., 1989), myšej F3/kuracej F1/ľudskej CNTN1 (Gennarini et al., 1989; Ranscht, 1988; Brümmendorf et al., 1989; Berglund a Ranscht, 1994), krysej TAG-1/kuracieho axonínu-1/ľudskej TAX-1 (Furley et al., 1990; Hasler et al., 1993; Tsiotra et al., 1993) a krysej BIG-1/myšej PANG (Yoshihara et al., 1994; Connely et al., 1994) nájdené v translatovanej génovej sekvenčnej databanke EMBL boli porovnané s CHL1. Porovnanie je znázornené v Tabuľke 1, ktorá je uvedená nižšie.

CHL1 je najpodobnejší na kuráciu Ng-CAM (37% aminokyselinovej identity v extracelulárnej doméne, Tabuľka 1) a na myšiu Nr-CAM (64% aminokyselinovej identity v extracelulárnej doméne, Tabuľka 2). Ale stupeň identity, zvlášť v extracelulárnej časti, nie je dostatočný pre úvahu, že tieto proteíny sú druhové homológy. Nedávno bol identifikovaný neúplný klon cDNA myšej Nr-CAM (Moscoso

a Sanes, 1995). Myší Nr-CAM je takmer identický (99%) s kuracím Nr-CAM (viď Tabuľka 2). Preto nie je CHL1 pravdepodobne homológom Nr-CAM u myší. CHL1 je štvrtým členom rodiny L1 u myší spoločne s L1, Nr-CAM, neurofascínom (Moscoso a Sanes, 1995) a spoločne s veľmi konzervovanými druhovými homológmi u človeka (Adams et al., 1992, 1993).

Keď uvažujeme podobnosť intracelulárnych sekvencií kuracej a myšej Nr-CAM a kuracieho a myšieho neurofascínu (99% a 87%, Tabuľka 2), je veľmi nepravdepodobné, že sú myšie L1 a kurací Ng-CAM druhové homológy, pretože vykazujú len 10% sekvenčnú identitu v intracelulárnej doméne (Tabuľka 2). Existencia Ng-CAM ako piateho člena rodiny L1 u myší s veľmi konzervovanou intracelulárnou doménou je skôr očakávaná. Je zaujímavé, že myšia L1 podporuje rast neurítov cez heterofilnú interakciu s kuracou Ng-CAM (Lemmon et al., 1989), čo implikuje, že členovia rodiny L1 môžu interagovať so sebou navzájom.

Okrem podobností v celkovej štruktúre členov rodiny L1 (Tabuľka 1 a Tabuľka 3) sú identifikované najviac konzervované oblasti v cytoplazmovej oblasti (Obr. 20). Nápadná homológia je evidentná pre členov rodiny L1 u všetkých druhov doteraz identifikovaných, ktoré obsahujú intracelulárnu doménu: L1, CHL1, Nr-CAM, Ng-CAM, neurofascín, neuroglián a L1.1 zebričky a tiež neúplné sekvencie L1.2 zebričky (Tongiorgi et al., 1995) a myšie Nr-CAM a neurofascín (Moscoso a Sanes, 1995) (Tabuľka 2). Vnútri tejto oblasti sú dva úseky takmer identické, jeden umiestnený blízko pri a čiastočne vnútri segmentu prechádzajúceho plazmatickou membránou a druhý na jeho C-terminálnom konci (I, III v Obr 20). Iný aminokyselinový úsek, ktorý je konzervovaný u L1, Nr-CAM, Ng-CAM, neurofascínu, L1.1 a L1.2, ale nie u CHL1 (Tabuľka 2), obsahuje motív RSLE (II v Obr. 3), ktorý pochádza z alternatívneho zostrihu a je exprimovaný len v neurónoch (Grumet et al., 1991; Miura et al., 1991; Volkmer et al., 1992). Pretože je intracelulárna oblasť najviac konzervovaná

medzi týmito proteínmi, všetci členovia rodiny L1 môžu používať tie isté signálne transdukčné cesty na aktiváciu predĺženia neuritov. Bolo demonštrované, že cytoplazmové domény u ABGP, L1 a Nr-CAM interagujú s ankyrínom prepájajúcim bunkovú rekogníciu s cytoskeletálnym lešením (Davis et al., 1993; Davis a Bennett, 1994).

Príklad 24

Identifikácia štruktúrnych požiadaviek v extracelulárnej doméne za účelom klasifikovania členov rodiny L1

Pre ďalšie štúdium všeobecných kritérií rodiny L1 sme skúmali umiestnenie veľmi konzervovaných aminokyselín v doménach podobných Ig (cysteínov, ktoré sa zúčastňujú mostíkov S-S) a opakovaní podobných FN (tryptofán, tyrozín/fenylalanín) pre niektorých členov rodiny Ig (Tabuľka 3). Molekuly obsahujúce šesť domén podobných Ig a aspoň štyri opakovania podobné FN (rodina L1 a nižšia rodina F3/F11 s kotvou GPI (Brümmendorf a Rathjen, 1993)) odhalili veľmi konštantný počet aminokyselín, ktoré oddeľujú tieto konzervované aminokyseliny. Do úvahy bolo zobraňovaných päť rôznych parametrov vzdialenosti:

- 1) počet aminokyselín oddeľujúcich konzervované cysteíny, ktoré tvoria cysteínové mostíky (S-S) v každej doméne podobnej Ig (Tabuľka 3, stĺpce Ig1, Ig2, Ig4, Ig5 a Ig6);

- 2) počet aminokyselín medzi druhým cysteínom v jednej doméne podobnej Ig a prvým cysteínom nasledujúcej domény podobnej Ig, ktorý odráža vzdialenosť medzi dvoma susediacimi doménami podobnými Ig (Tabuľka 3, stĺpce 1-2, 2-3, 3-4, 4-5 a 5-6);

- 3) počet aminokyselín medzi posledným konzervovaným cysteínom šiestej domény podobnej Ig a konzervovaným tryptofánom prvého opakovania podobného FN, ktorý odráža vzdialenosť medzi modulom domény podobnej Ig a modulom opakovania podobného FN (Tabuľka 3, stĺpce IgG-FN1);

4) počet aminokyselín medzi konzervovaným tryptofánom, tyrozínom/fenylalanínom každého jednotlivého opakovania podobného FN (Tabuľka 3, FN1, FN, FN3 a FN4);

5) počet aminokyselín medzi tyrozínom/fenylalanínom jedného opakovania podobného FN a tryptofánom nasledujúceho opakovania podobného FN, ktorý odráža vzdialenosť medzi dvoma susediacimi opakovaniami podobnými FN (Tabuľka 3, FN1-FN2, FN2-FN3, FN3-FN4).

Pre získanie vysoko stringentných podmienok pre porovnanie molekúl podobných L1 sme nezahŕňali do výpočtu priemerných vzdialeností a štandardných odchýlok niekoľko málo hodnôt, ktoré sa jasne odchyľovali od priemeru, najpravdepodobnejšie v dôsledku alternatívneho zostrihu (neuroglián: Ig2, 2-3; Nr-CAM a ABGP: Ig6-FN1; F3: Ig4, FN3; Ng-CAM: FN2, FN3 Tabuľka 3, označené *)). Aj keď počet aminokyselín medzi mostíkmi S-S pre prvú a šiestu doménu podobnú Ig (Ig1; štandardná odchýlka (SD) = 3; Ig6: SD = 4) a počet aminokyselín medzi konzervovaným tryptofánom, tyrozínom/fenylalanínom opakovaní podobných FN tri a štyri (FN3: SD = 4; FN4: SD = 5) sú mierne rozdielne, všetky ostatné parametre vzdialeností zostávajú pozoruhodne konštantné pre rôzne molekuly (FN1-FN2: SD = 0; FN2 a 2-3: SD = 2 (Tabuľka 3)). Na základe týchto kritérií sme vypočítali index podobnosti (viď Materiál a Metódy) pre niekoľko molekúl podobných Ig vo vzťahu k priemerným hodnotám v zozname Tabuľky 3. Pre L1, CHL1, Ng-CAM, Nr-CAM, ABGP, L1.1, TAG-1 a BIG-1 bol získaný index podobnosti 74 až 95% (Tabuľka 3). Pre drozofilí neuroglián bola určená mierne nižšia hodnota (66%), zrejme preto, že je tu evolučná vzdialenosť medzi stavovcami a hmyzom. F3 a jeho druhové homológy sú menej konzervované, zvlášť v ich doménach podobných Ig, ale stále vykazujú index podobnosti 63%. Avšak niektoré úseky konzervovaných aminokyselín, ktoré sú základom silne konzervovanej kolinearity (napr. FxVxAxNxxG(8x)TxxAxPxxxP na konci prvého opakovania podobného FN alebo NxxGxGPxS medzi poslednými dvoma

štruktúrami beta tretieho opakovania podobného FN (nie je ukázané), podporujú myšlienku, že F3 patrí do rodiny L1. Je zaujímavé, že počet aminokyselín medzi susednými doménami (domény podobné Ig alebo opakovania podobné FN) je dokonca viac konzervovaný medzi týmito molekulami, čo ukazuje, že vzdialenosť medzi jednotlivými doménami je dôležitým štruktúrnym rysom, t.j. rozhodujúcim pre funkciu nervových rozlišovacích molekúl (Tabuľka 3, stĺpce 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, FN1-FN2, FN2-FN3 a FN3-FN4). Táto vysoká konzervácia tohoto zoradenia (kolinearita) a vzdialeností je použitá na všeobecnejšie definovanie extracelulárnej domény členov rodiny L1. Na základe týchto práve definovaných kritérií obsahujú tieto extracelulárne domény modul šiestich domén podobných Ig na konci N, po ktorom nasledujú štyri opakovania podobné FN. Tento štruktúrny rys budeme nazývať kazetou rodiny L1.

Takže všetci členovia rodiny L1 zdieľajú charakteristické rysy kazety rodiny L1 a tiež veľmi konzervované aminokyseliny. Tieto výsledky navrhujú, že tieto molekuly odvodené od spoločnej predchádzajúcej molekuly, ktorá obsahovala kazetu rodiny L1, ktorá mohla rozšíriť svoj funkčný potenciál cez génovú duplikáciu pre účely najrôznejších bunkových interakcií v zložitejších nervových sústavách. Hlavná rodina L1 tak môže byť rozdelená na "klasických" členov rodiny L1 (L1, CHL1, Ng-CAM, Nr-CAM, neurofascín, neuroglián, L1.1), ktorí obsahujú variabilné šieste opakovanie podobné FN, transmembránovú doménu a veľmi konzervovanú intracelulárnu doménu, a na podskupinu F3/F11 (F3/F11/CNTN1, BIG-1/PANG a TAG-1/Axonín-1/TAX-1), ktorej spoločným rysom je spojenie s membránou skrz skupinu GPI a v ktorej nebolo zatiaľ identifikované žiadne variabilné piate opakovanie podobné FN. Extracelulárne domény obidvoch podskupín obsahujú kazetu rodiny L1.

Ostatní členovia veľkej rodiny Ig, napr. N-CAM (Cunningham et al., 1987; Barthels et al., 1987), MAG (Arquint et al., 1987; Lai et al., 1987; Salzor et al.,

1987), neuromuskulín (Kanla et al., 1993) a rse (Mark et al., 1994) alebo fibronektín (Kornblihtt et al., 1985), ktorí obsahujú domény podobné Ig a alebo opakovania podobné FN, vykazujú jasne odlišné parametre vzdialeností, čo ukazujú, že sú oveľa menej príbuzné medzi sebou a k členom rodiny L1 (Tabuľka 3). Je zaujímavé, že gén kódujúci ľudský príbuzný leukocytárny spoločný antigén (HLAR) (Streull et al., 1988) a produkt génu potláčajúceho nádory (DCC), ktorý je deletovaný u rakoviny konečníka (Fearson et al., 1990), sú blízko príbuzní k rodine L1 podľa parametrov vzdialenosti (index podobnosti 42% a 50%). Rozbor konzervovaných aminokyselín odhalil, že DCC je naozaj oveľa bližší k rodine L1 než k N-CAM, ako bolo skôr navrhnuté vo Fearson et al., (1990) a Pierceall et al., (1994), aj keď sa zdá, že stratili piatu a šiestu doménu podobnú Ig. Nedávne štúdie ukazujú, že DCC je exprimovaný prednostne v mozgu a že rast neuritov krysích buniek PC12 je stimulovaný na substráte fibroblastov transfekovaných DCC, ktoré exprimujú tento proteín na svojom povrchu (Pierceall et al., 1994). Aj keď HLAR tiež vykazuje tiež relatívne vysoký index podobnosti, jeho príbuznosť k rodine L1 nie je tak zrejma.

Príklad 25

Tkanivové rozšírenie mRNA CHL1 a proteínu

Pre určenie, či CHL1 zdieľa prednostnú expresiu v nervovej sústave spolu s inými členmi rodiny L1, sme analyzovali expresiu CHL1 v rôznych tkanivách na úrovni mRNA a proteínu. V analýze Northern blot hybridizovala ribopróba CHL1 so silným prúžkom mRNA s veľkosťou 8 kb (Obr. 21), ktorý je o dosť väčší než veľkosť mRNA detekovanej próbou L1 (6 kb) (Tacke et al., 1987). Menší a tenší prúžok mRNA (Obr. 21a, dráha 3) je najpravdepodobnejšie spôsobený hybridizáciou k ribozomálnej RNA. RNA dlhá 8 kb bola detekovaná v mozočku, mozgu bez mozočku a v mieche, ale nie v dorzálnom koreňovom gangliu (DRG) (Obr. 21a). Naopak,

ribopróba L1 ukázala silný signál s RNA z DRG (Obr. 21a). mRNA CHL1 bola tiež detekovaná v mozočku deväť dní starej krysy a v mieche šesť dní starej krysy, ale nie v kryších bunkách PC12 udržiavaných s a bez NFG alebo v bunkách COS-1 (Obr. 21b). Vo všetkých ostatných tkanivách, ktoré boli analyzované (detská žľaza, pľúca, pečeň, črevá, slinivka a ľadviny), nebol detekovaný žiadny signál (Obr. 21a). Na identifikáciu proteínu CHL1 boli vytvorené protilátky proti bakteriálne exprimovanému fragmentu. 1,7 kb dlhý fragment cDNA reprezentujúci časť šiestej domény podobnej Ig a štyri opakovania podobné FN (Obr. 18 a 19b), ale nie transmembránovú alebo intracelulárnu oblasť, bol naklonovaný do expresného vektora pET. Expresia výsledného proteínového fragmentu viedla k detekcii prúžku s veľkosťou 70 kD pomocou farbenia Coomassie modrou po SDS-PAGE, ktorý bol purifikovaný pomocou výmennej iónovej chromatografie. Analýza Western blot (Obr. 22a) a ELISA (nie je ukázané) preukázali, že antiséra z dvoch králikov reagovali s proteínovým fragmentom CHL1, ale nie s purifikovanými L1, N-CAM a MAG. Niektoré reakcie s bakteriálnymi proteínmi, ktoré putovali spoločne s peptidom CHL1 alebo s degradačnými produktami fragmentu CHL1, boli pozorované (Obr. 22a, dráha 4).

Pre ďalšie preskúmanie špecifickosti protilátok a určenie, či tieto protilátky rozpoznávajú na bunkovom povrchu exprimovanú CHL1, boli tranzientne transfekované bunky COS-1 preskúmané týmito protilátkami. Imunocytochémia odhalila povrchovú expresiu CHL1 na bunkách transfekovaných CHL1, ale nie na bunkách transfekovaných samotným vektorom (Obr. 23). Tieto výsledky tiež ukazujú, že signálna sekvencia je funkčná a že otvorený čítací rámec je správny.

Aj keď bol prvý klon cDNA CHL1 izolovaný z expresnej knižnice pomocou testovania s imunoafinitne purifikovanými protilátkami proti L1 z mozgu, reakcie rôznych preparátov protilátok proti rekombinantne exprimovaným doménam podobným Ig L1 s bunkami transfekovanými CHL1 neboli pozorované (nie

je ukázané). Tiež protilátky proti CHL1 vyvolané proti extracelulárnej časti tejto molekuly (Obr. 19) nereagovali s bunkami transfekovanými L1 (nie je ukázané). Je preto pravdepodobné, že polyklonálne protilátky proti L1 použité na testovanie expresnej knižnice boli reaktívne s intracelulárnou časťou CHL1 na konci C, ktorý je najviac homológny medzi CHL1 a L1.

Antiséra CHL1 boli použité na identifikáciu imunoreaktívnych proteínov v niekoľkých tkanivách (mozog, pečeň, pľúca, ľadviný a črevá z deväť dní starých myší, Obr. 23b). Hrubé membránové frakcie, rozpustné alebo nerozpustné v 0,5% Tritone X-100, boli analyzované pomocou analýzy Western blot. Polyklonálne protilátky proti L1 boli použité ako kontrola. Protilátky CHL1 rozpoznávajú tri rôzne prúžky 185, 165 a 125 kD v nerozpustných a rozpustných frakciách membrán z mozgu. Prúžok 185 kD bol detekovaný len slabo v rozpustnej frakcii a prúžok 125 kD bol menej zastúpený v nerozpustnej frakcii (Obr. 23b, dráhy 1 a 2), čo ukazuje, že prúžok 185 kD je pravdepodobne membránovo viazaná forma CHL1, naopak prúžky 185 kD a 165 kD sú pravdepodobne proteolytické štiepené fragmenty. Podobné rozloženie imunoreaktívnych prúžkov bolo pozorované po analýze Western blot buniek COS-1 transfekovaných CHL1 a celého mozgového tkaniva (nie je ukázané). Podobné rozloženie prúžkov bolo pozorované pre L1 (Faissner et al., 1985; Sadoul et al., 1988), Ng-CAM (Grumet et al., 1984) a Nr-CAM (Kayyem et al., 1992). Avšak dvojbazová konsečná sekvencia pre proteolytické štiepenie v tretej doméne podobné FN (L1: "SKR"; Ng-CAM: "SRR"; Nr-CAM: "SRR"; Nr-CAM: "SRRSKR") sa nenachádza u CHL1. Podobne, ako iní členovia rodiny L1, bolo u CHL1 zistené, že je exprimované len v neskorých štádiách vývoja. CHL1 nebola detekovateľná v mozgu pred embryonickým dňom 15 pomocou analýzy Western blot (nie je ukázané). Imunoreaktívny prúžok 50 kD bol detekovaný v detergentovej rozpustnej frakcii celého tkaniva pečene. Tento prúžok je najpravdepodobnejšie spôsobený

nejakou reaktivitou protilátok CHL1 s proteínom podobných CHL1, pretože žiadna mRNA, ktorá by zodpovedala CHL1, nebola vidieť v pečeni pri analýze Northern blot (Obr. 22a). Žiadna imunoreaktivita na CHL1 nebola detekovaná v iných tkanivách, ktoré boli skúšané (Obr. 23b).

Členovia rodiny L1 sú prednostne exprimovaní v neurónoch CNS. Preto sme sa zaujímali, či má tiež CHL1 tento profil expresie. Experimenty hybridizácie in situ boli vykonané za účelom identifikácie buniek syntetizujúcich L1 a CHL1 v sietnici, optickom nerve a v cerebelárnom kortexe mladých práve narodených myší. V sietnici 7 dní starých myší sú exprimované mRNA L1 (Obr. 24a) a CHL1 (Obr. 24b) gangliónovými bunkami. Transkripty L1 boli ďalej detekovateľné v amakrínových a horizontálnych bunkách umiestnených na vnútornej jadrovej vrstve (Obr. 24a). mRNA CHL1 bola naopak detekovateľná len príležitostne v niekoľko málo bunkách umiestnených na vnútornej hrane vnútornej jadrovej vrstvy (Obr. 24b). Gliové bunky v optickom nerve neobsahovali detekovateľné hladiny transkriptov L1 (Obr. 24a). Naopak, mRNA CHL1 bola silne exprimovaná v gliových bunkách umiestnených v bližších oblastiach optického nervu (Obr. 24b) a nízke hladiny expresie CHL1 boli viditeľné v gliových bunkách umiestnených vo vzdialenejších oblastiach tohoto nervu (Obr. 24b).

V cerebelárnom kortexe dva dni starých myší bola mRNA L1 detekovateľná vo hviezdicových a košíčkových bunkách umiestnených v molekulárnej vrstve a v Golgiho a granulových bunkách umiestnených vo vnútornej granulárnej vrstve (Obr. 24d). Tie isté bunkové typy boli označené, keď boli rezy hybridizované s protizmyslovou próbou cRNA CHL1 (Obr. 24e), s tou výnimkou, že transkripty CHL1 boli sotva detekovateľné v bunkách umiestnených vo vnútornej časti molekulárnej vrstvy (porovnajzte Obr. 24d a e). Ako negatívna kontrola boli rezy hybridizované s príslušnými zmyslovými próbami cRNA a nebolo pozorované žiadne označenie buniek (pre sietnicu a optický nerv, ktorý bol hybridizovaný so

zmyslovou próbou cRNA CHL1, viď Obr. 24c). Kvôli odpovedi na otázku, či gliové bunky exprimujú CHL1 in vitro, boli z predných mozgov práve narodených myší alebo krýs pripravené kultúry purifikovaných astrocytov alebo oligodendrocytov. Tie isté polyklonálne protilátky proti CHL1, ktoré špecificky detekovali CHL1 na bunkovom povrchu transfekovaných buniek COS-1, boli použité. Astrocyty a oligodendrocyty boli identifikované protilátkami proti GFAP alebo s protilátkami proti antigénu Ol. Kultúry astrocytov obsahovali niektoré bunky, ktoré boli označené dvojito polyklonálnymi protilátkami proti CHL1 (Obr. 25a, d) a monoklonálnymi protilátkami proti GFAP (Obr. 25b, e). Analýza kultúr oligodendrocytov však neodhalila žiadnu spoločnú lokalizáciu CHL1 a antigénu Ol, čo znamená, že zrelé oligodendrocyty neexprimujú in vitro detekovateľné hladiny CHL1. Kombinované pozorovania ukazujú, že CHL1 a L1 vykazujú prekrývajúce sa, ale tiež rôzne profily exprese. Najnápadnejšie je, že CHL1, ale nie L1, je exprimovaná v určitých gliových bunkách nervovej sústavy in vivo, čo naznačuje, že rôzni členovia rodiny L1 vykonávajú rôzne funkcie.

Analýza glykozilácie a detekcie karbohydrátu HNK-1 u glykoproteínu CHL1

Pretože pozorovaná molekulová hmotnosť CHL (185 kD) je podstatne väčšia než vypočítaná molekulová hmotnosť (134,9 kD), bol analyzovaný príspevok karbohydrátov k molekulovej hmotnosti a tiež typ karbohydrátovej modifikácie. Detergentové rozpustné a nerozpustné frakcie z hrubých mozgových membrán sedem dní starých myší boli podrobené enzýmovej deglykozilácii. Po pôsobení N-glykozidázy F (PNGázaF) bola molekulová hmotnosť všetkých imunoreaktívnych proteínov CHL1 (Obr. 26): prúžok 185 kD sa posunul na 150 kD, prúžok 165 kD na 135 kD a prúžok 125 kD na 110 kD. Výsledkom pôsobenia O-glykozidázy, enzýmu, ktorý štiepi na serín/treonín pripojené galaktozyl

beta(1-3)N-acetylgalaktozaminyl disacharidy (Glasgow et al., 1977), bola ľahko zvýšená pohyblivosť: prúžky 185 a 165 kD sa posunuli na 180 a 160 kD, ale prúžok 125 kD sa neposunul. Tieto pozorovania ukazujú, že väčšina karbohydrátovej molekulovej hmotnosti je spôsobená N-pripojenými karbohydrátmi. Pôsobenie obidvoch enzýmov spoločne (Obr. 26) viedlo k väčšiemu posunu než bolo vidieť u jednotlivých enzýmov, čo naznačuje, že nie všetky glykozilačné miesta, najskôr O-glykozilačné miesta, boli štiepené O-glykozidázou samotnou. Výsledky ukazujú, že CHL1 obsahujú približne 30% svojej molekulovej hmotnosti ako N-glykozidicky pripojené karbohydráty.

Niekoľko nervových bunkových adhézných molekúl nesie karbohydrát HNK-1, ako napr. L1 (Kruse et al., 1984), TAG-1 (Dodd et al., 1988), Nr-CAM (Grumet et al., 1991), F3 (Gennarini et al., 1989), N-CAM (Kruse et al., 1984), glykoproteín asociovaný s myelínom MAG (McGarry et al., 1983; Kruse et al., 1984), a Po (Bollenson a Schachner, 1987). Preto sme analyzovali, či nesie CHL1 karbohydrát HNK-1. CHL1 bola imunoprecipitovaná z detergentových lyzátov celého mozgového tkaniva z deväť dní starých myší protilátkami proti L1. Ako kontrola bola L1 podobne imunoprecipitovaná polyklonálnymi protilátkami z toho istého mozgového extraktu. Analýza Western blot s monoklonálnymi protilátkami 412 vyvolanými proti karbohydrátovému epitopu HNK-1 ukázala, že obidva imunoprecipitáty obsahovali prúžky, ktoré boli rozpoznané monoklonálnou protilátkou 412 v molekulových hmotnostiach očakávaných pre CHL1 (Obr. 27) alebo L1 (nie je ukázané). Pretože karbohydrát HNK-1 sa zúčastňuje bunkovej adhézie a viaže sa na laminín (Keilhauer et al., 1985; Künemund et al., 1988; Hall et al., 1993, 1995), môže CHL1, podobne ako ostatní členovia rodiny L1, interagovať s laminínom skrz karbohydrát HNK-1.

Záver

Vyššie opísané experimenty pridali CHL1 do rodiny L1 nervových rozpoznávacích molekúl, ktoré sa vyskytujú u takých rôznych druhov, ako sú človek, krysa, myš, sliepka, zebrička a Drozofila, a tak určujú filogeneticky konzervovanú rodinu molekúl, ktorej všetci členovia sú exprimovaní neskôr vo vývoji pri nástupe axogenézy v neurónoch a podmnožine neurónov. Skutočnosť, že existuje mnoho molekúl podobných L1, ukazuje požiadavka prírody na štruktúrne podobné, ale funkčne rôzne molekuly podporujúce rast neuritov, a ukazuje na evolúciu rodiny L1 ako na skupinu molekúl, ktorá môže určovať reguláciu vedenia axónov.

Aj keď bol vynález opísaný a ilustrovaný prostredníctvom odkazov na rôzne špecifické materiály, postupy a príklady, rozumie sa, že vynález nie je obmedzený na zvláštne kombinácie materiálu a postupov vybratých pre ten účel. Mnohé variácie takýchto detailov môžu byť zahrnuté, čo bude odborne vítané.

Nasleduje abecedný zoznam citácií uvedených v Príkladoch 18 až 25.

Tabuľka 1: Porovnanie podobností sekvencií extracelulárnych častí CHL1 a iných molekúl podobných L1 .1

	CHL1 (m)	L1 (m)	ngCAM (c)	NrCAM (c)	neurofascin (c)	L1.1 (z)	neuroglian (d)	F3 (m)	TAG -1	BIG-1 (r)
L1 (m)	37									
NgCAM (c)	39	37								
NrCAM (c)	33	43	35							
neurofascin(c)	36	36	47	33						
L1.1 (zf)	28	28	30	26	30					
neuroglian (d)	33	36	36	34	34	28				
F3 (m)	27	28	27	26	27	26	24			
TAG-1 (r)	27	27	26	25	25	25	24	51		
BIG-1 (r)	27	29	27	27	25	27	24	44	43	
DCC (h)	14	14	14	15	14	16	14	16	15	15
Ax1 (m)	11	12	11	12	12	11	11	13	12	11
HLAR (h)	15	15	13	14	13	14	11	13	14	14
NCAM (m)	16	15	17	16	15	16	15	15	15	15

Extracelulárne oblasti členov rodiny L1 boli porovnané každá oblasť s každou a tiež s inými bunkovými adhéznymi molekulami rodiny Ig. Hodnoty uvádzajú percento aminokyselinovej identity pre porovnanie podľa Hein (1990). Druhy sú uvedené v zátvorkách: c = kurča, d = Drozofila, h = človek, m = myš, r = krysa a zf = zebrička.

Tabuľka 2: Porovnanie podobností sekvencií extracelulárnych častí molekúl podobných L1

	CHL1(m)	L1(m,r,b)	NrCAM(m)	NrCAM(c)	NrCAM(c)	ABOP(r)	neurofascia(m)	neurofascia(c)	neuroglia(d)	L1.1(m)	L1.2(m)
L1 (m, r, b)	57										
NrCAM (m)	64	55									
NrCAM (c)	62	56	99								
NrCAM (c)	43	61	48	43							
ABOP (r)	59	54	64	64	38						
neurofascia (m)	62	56	64	65	43	100					
neurofascia (c)	54	58	58	60	40	87	16				
neuroglia (d)	39	34	41	40	34	40	43	37			
L1.1 (m)	43	61	46	45	50	45	48	47	36		
L1.2 (m)	36	54	39	38	37	37	40	39	22	44	
DCC (h)	14	12	15	13	18	12	13	12	11	12	9
fascia III (d)	21	17	20	18	19	16	20	17	15	17	15
MAO p72 (r)	8	10	11	11	10	10	10	11	11	10	8
NrCAM180 (m)	7	7	7	7	13	5	5	5	5	13	9
Pe (m)	11	6	12	13	6	15	15	15	28	7	3

Extracelulárne oblasti členov rodiny L1 (vrátane druhových homológov) boli porovnané každá oblasť s každou a tiež s inými bunkovými adhéznymi molekulami rodiny Ig. Hodnoty uvádzajú percento aminokyselinovej identity pre porovnanie podľa Hein (1990). Druhy sú uvedené v zátvorkách: c = kurča, d = Drozofila, h = človek, m = myš, r = krysa a zf = zebrička. Myšia, krysa a ľudská L1 sú identické. Myšia NrCAM a neurofascia sú neúplné sekvencie dlhé 91 a 86 aminokyselín.

Tabuľka 3 (pokračovanie)

CAMs	IgG-FN1	FN1	FN1-FN2	FN2	FN2-FN3	FN3	FN3-FN4	FN4	Similarity Index
L1	44	50	50	49	49	51	47	51	84%
CHL1	41	7	7	49	49	51	48	53	84%
NCAM	40	50	50	57*	49	77*	7	7	74%
NCAM	51*	50	50	50	49	51	48	52	95%
ADRP	56*	50	50	50	49	51	48	51	95%
L1.1	41	50	50	50	49	62	47	52	74%
neuroglias	40	50	50	52	51	53	7	54	68%
TAQ-1	41	53	50	53	49	51	48	7	74%
BIG-1	41	53	50	53	49	52	48	47	84%
F3	41	53	50	53	49	48*	48	47	63%
Average	41	51	50	51	49	56	48	51	
SD	1.2	1.4	0.0	1.7	0.6	3.8	0.5	2.6	
DCC		49	50	46	49	51	51	51	50%
HLAR		46	49	50	48	46	49	53	42%
nc		49	48	49					33%
NCAM		35	56	41					25%
MAO									11%
neuromuskulin									13%
fibronektin (III)		45	42	46	48	44	47	44	14%

Tabuľka ukazuje počet zvyškov medzi konzervovanými aminokyselinami vnútri domén podobných Ig (cysteiny zúčastnené v mostíkoch S-S: Ig1, Ig2, Ig3, Ig4, Ig5 a Ig6), opakovania podobné FN (tryptofán druhej štruktúry beta a tyrozín/fenylalanín šiestej štruktúry beta: FN1, FN2, FN3 a FN6) a medzi týmito doménami (1-2, 2-3, 3-4, 4-5 a 5-6; FN1-FN2, FN2-FN3 a FN3-FN4). Vzdialenosť medzi konzervovanými aminokyselinami druhého cysteínu v šiestej doméne podobnej Ig a prvým tryptofanom prvého opakovania podobného FN (Ig6-FN1) je vzdialenosť medzi doménami podobnými Ig a opakovaniami podobnými FN. Priemer a štandardná odchýlka (SD) jednotlivých vzdialeností pre molekuly podobné L1 sú uvedené, DCC, HLAR, rse, NCAM, MAG, neuromuskulín a fibronektín (III) sú uvedené ako kontrola. Index podobnosti je uvedený na pravom okraji. ? = žiadna konzervovaná aminokyselina, * = hodnota nepoužitá pre výpočet priemeru a SD.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantná molekula DNA na podporu rastu in vivo v centrálnej nervovej sústave cicavca obsahujúca látku vybranú zo skupiny skladajúcej sa z L1, N-CAM a glykoproteínu asociovaného s myelínom, látku odvodenú z molekúl, ktoré obsahujú štrukturálne motívy podobné homológny opakovaniam 1 až 2 vo fibronektíne typu III a doménam podobným imunoglobínu I až II, III až IV a V až VI, ktoré sú spojené s expresnou kontrolnou sekvenciou.
2. Vektor obsahujúci rekombinantnú molekulu DNA podľa nároku 1.
3. Transformovaný hostiteľ obsahujúci vektor podľa nároku 2.
4. Protilátka vyvolaná proti látke podľa nároku 1 až 3 obsahujúca polyklonálnu alebo monoklonálnu protilátku.
5. Bunková kultúra obsahujúca gliové bunky transgénnych cicavcov podľa jedného z nárokov 1 až 4.
6. Bunkový tkanivový systém podľa nároku 5 obsahujúci tkanivo z nervovej centrálnej sústavy bunky transgénnych cicavcov.
7. Transgénne cicavce podľa nároku 6 obsahujúce gliové bunky, ktoré exprimujú exogénnu nervovú adhéznou molekulu.
8. Transgénne cicavce podľa nároku 7, kde gliovými bunkami sú astrocyty.
9. Transgénne cicavce podľa nároku 7, kde nervovou adhéznou molekulou je L1.
10. Farmaceutický prostriedok na úpravu nervového rastu v centrálnej nervovej sústave cicavca podľa nárokov 1 až 6,

v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje terapeuticky účinné množstvo látky, protilátky a farmaceuticky prijateľných nosičov.

11. Spôsob testovania schopnosti látky alebo inej entity upravovať aktivitu nervovej adhéznej molekuly podľa nárokov 1 až 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje

a) pridávanie neurónov CNS do bunkového tkanivového systému podľa nároku 5;

b) pridávanie testovanej látky do bunkového tkanivového systému;

c) meranie nervového rastu neurónov CNS; a

d) korelovanie rozdielu v hladine nervového rastu buniek obsahujúcich túto látku vzhľadom na kontrolnú kultúru, do ktorej nebola žiadna taká látka pridaná.

12. Spôsob testovania schopnosti látky alebo inej entity upravovať aktivitu nervovej adhéznej molekuly podľa nárokov 1 až 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje

a) pridávanie neurónov CNS do bunkového tkanivového systému podľa nároku 6;

b) pridávanie testovanej látky do bunkového tkanivového systému;

c) meranie nervového rastu neurónov CNS; a

d) korelovanie rozdielu v hladine nervového rastu buniek obsahujúcich túto látku vzhľadom na kontrolnú kultúru, do ktorej nebola žiadna taká látka pridaná.

13. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervovou adhéznou molekulou je L1.

14. Spôsob podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervovou adhéznou molekulou je L1.

15. Skúškový systém na testovanie látok a iných činidiel na schopnosť upravovať produkciu nervovej adhéznej molekuly podľa nárokov 11 až 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje

a) pestovanie bunkového tkanivového systému podľa nároku 5 zaočkovaného látkou alebo činidlom;

b) pridávanie neurónov CNS do bunkového tkanivového systému kroku a); a

c) meranie nervového rastu za účelom určenia vplyvu látky na vyššie uvedené.

16. Skúškový systém na testovanie látok a iných činidiel na schopnosť upravovať produkciu nervovej adhézne molekuly podľa nárokov 11 až 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje

a) pestovanie bunkového tkanivového systému podľa nároku 6 zaočkovaného látkou alebo činidlom;

b) pridávanie neurónov CNS do bunkového tkanivového systému kroku a); a

c) meranie nervového rastu za účelom určenia vplyvu látky na vyššie uvedené.

17. Skúškový systém podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervová adhézna molekula je vybratá zo skupiny skladajúcej sa z laminínu, fibronektínu, N-cadherínu, BSP-2 (myší N-CAM), D-2, 224-1A6-A1, L1-CAM, NILE, Nr-CAM, TAG-1 (axonín-1), Ng-CAM a F3/F11.

18. Skúškový systém podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervovou adhéznou molekulou je L1.

19. Skúškový systém podľa nároku 16, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervová adhézna molekula je vybratá zo skupiny skladajúcej sa z laminínu, fibronektínu, N-cadherínu, BSP-2 (myší N-CAM), D-2, 224-1A6-A1, L1-CAM, NILE, Nr-CAM, TAG-1 (axonín-1), Ng-CAM a F3/F11.

20. Skúškový systém podľa nároku 16, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nervovou adhéznou molekulou je L1.

21. Použitie farmaceutického prostriedku podľa nároku 10 na

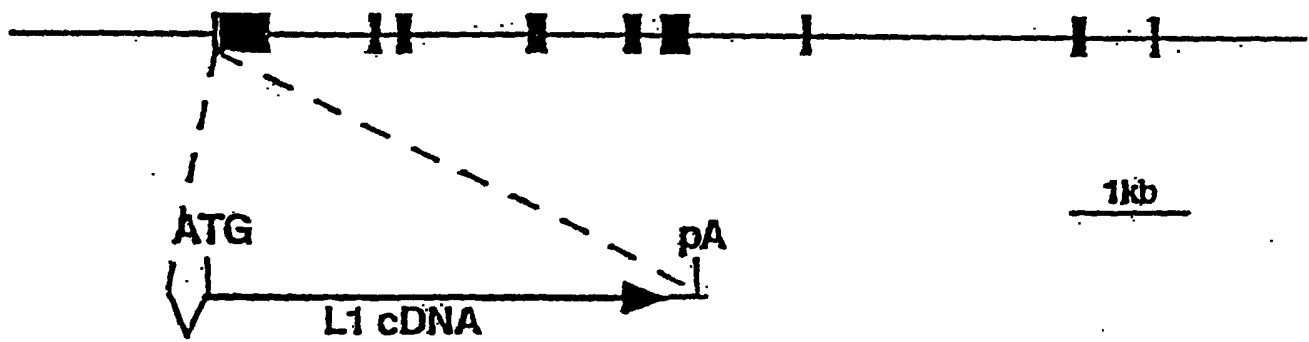
prípravu liečiva na zvýšenie synaptickej výkonnosti centrálnej nervovej sústavy, na posilňovanie nervového rastu neurónov, posilňovanie pamäte, na testovanie schopnosti látky alebo inej entity upravovať aktivitu nervovej adhéznejs molekuly.

.

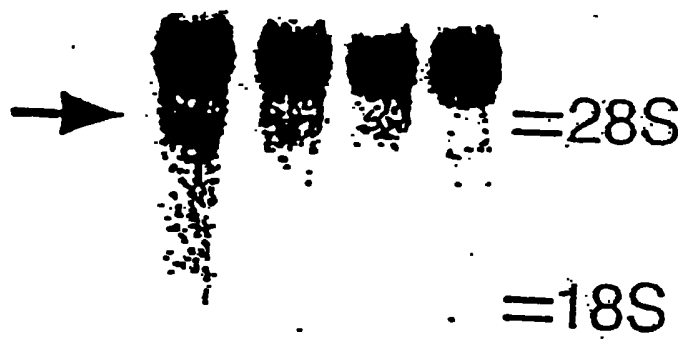
.

.

.

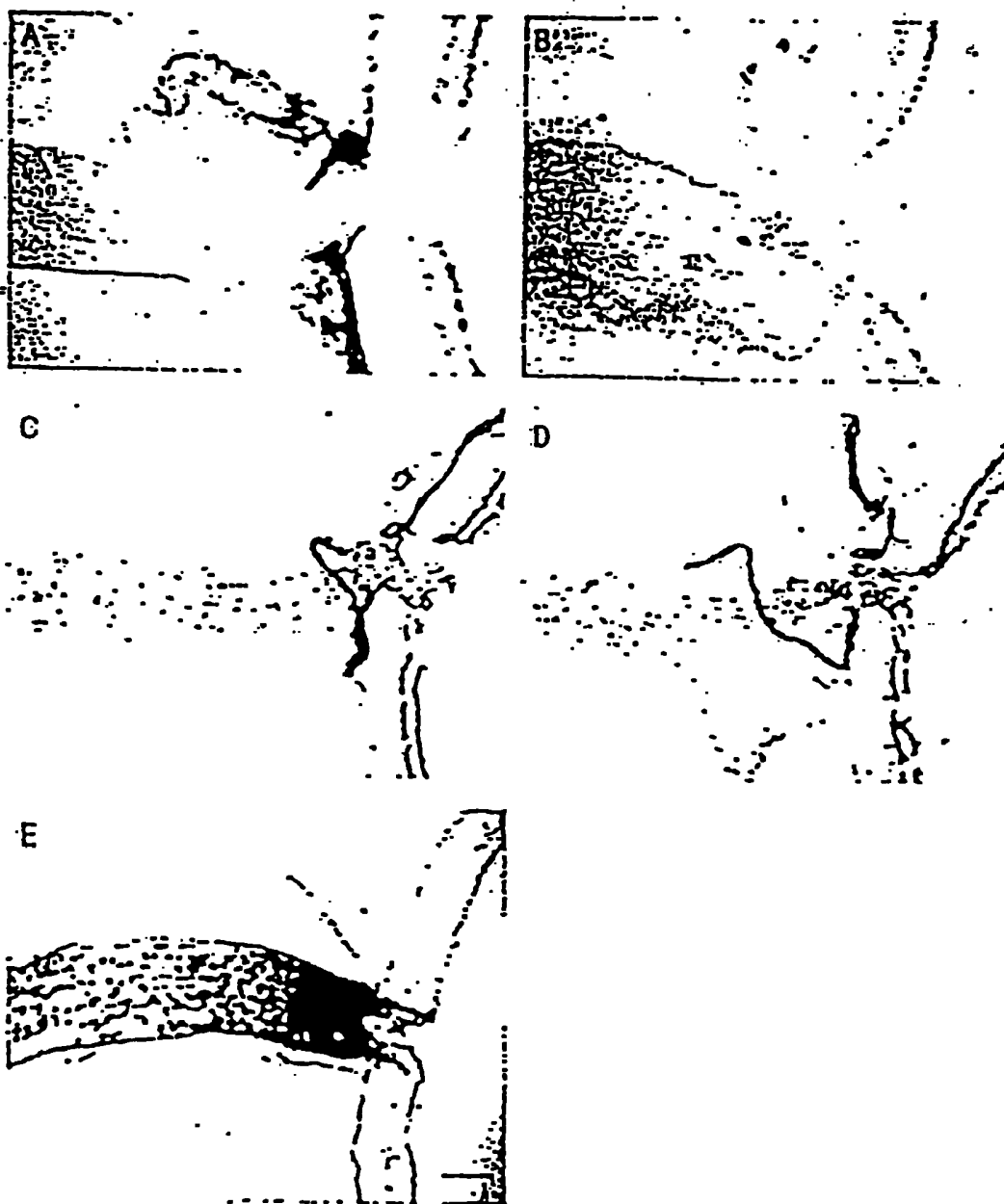


OBR.1

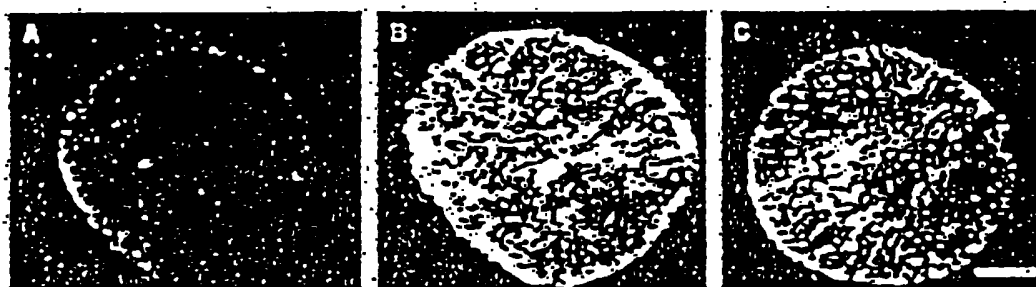


1 2 3 4

OBR.2



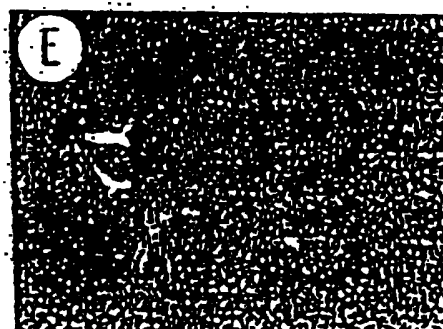
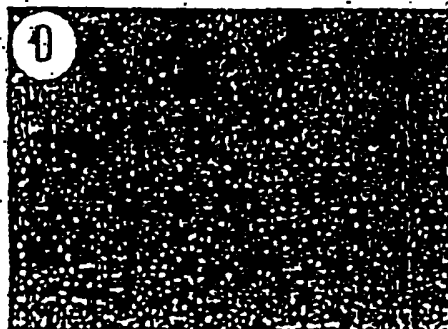
OBR.3



OBR.4

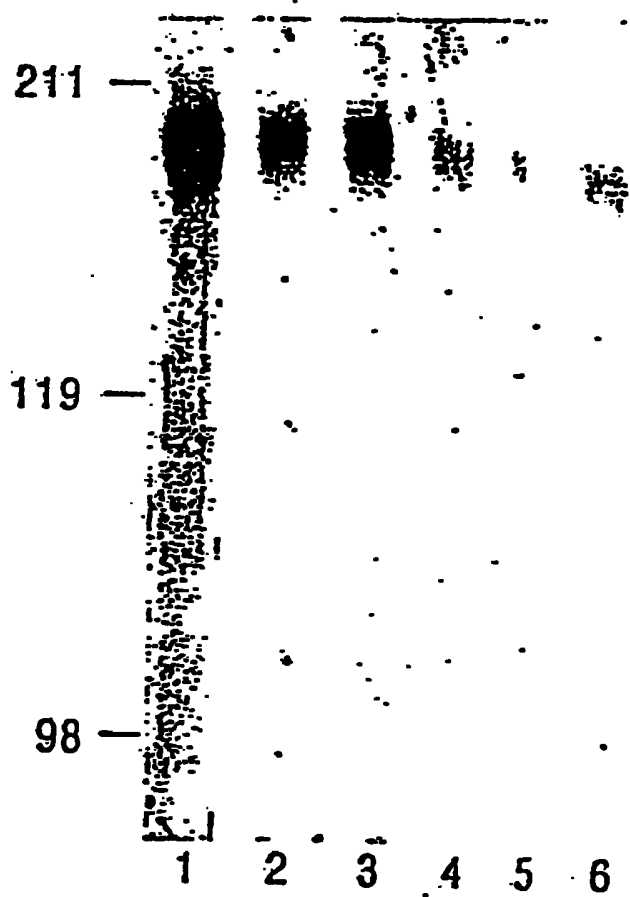


C

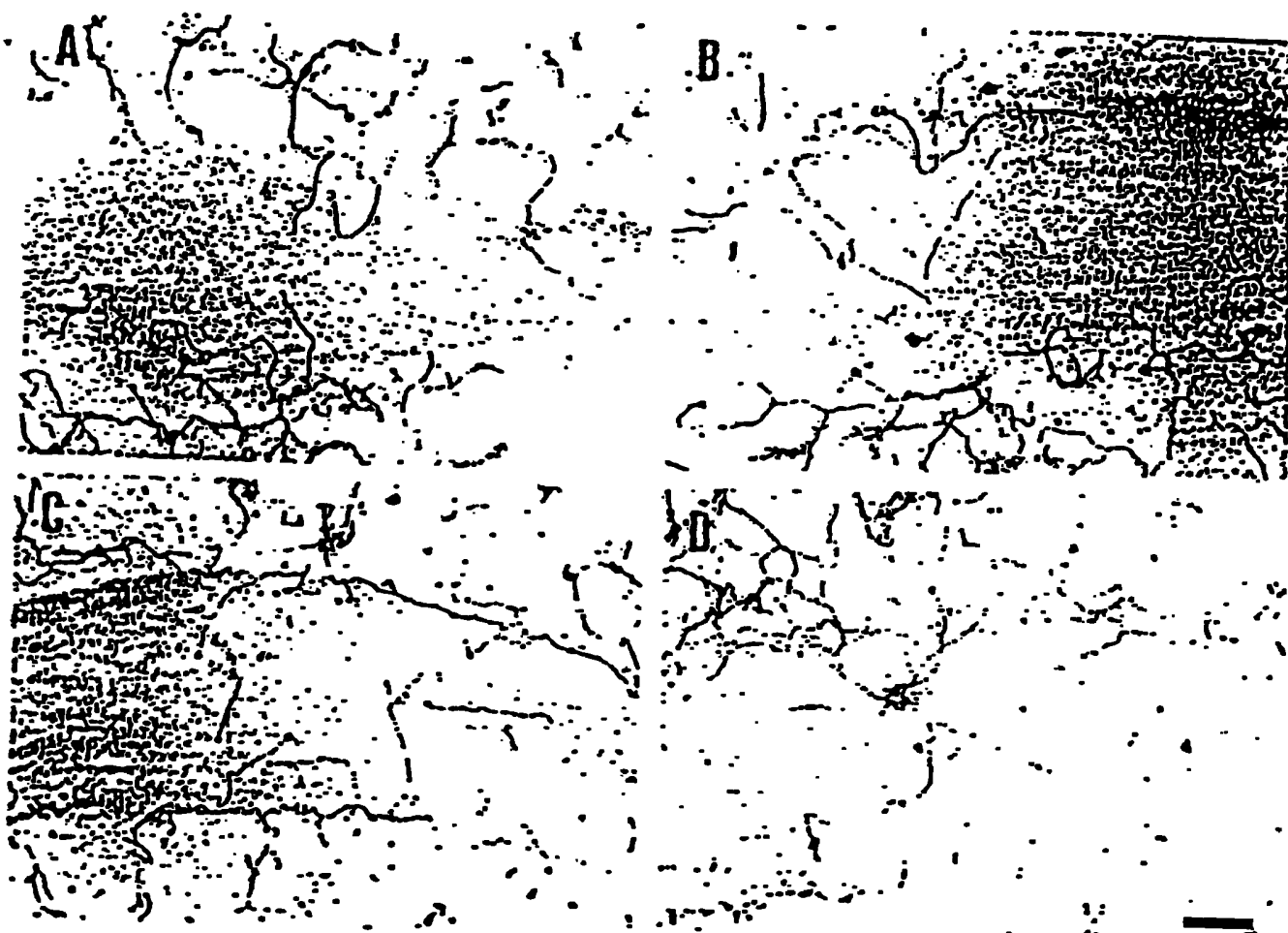


F

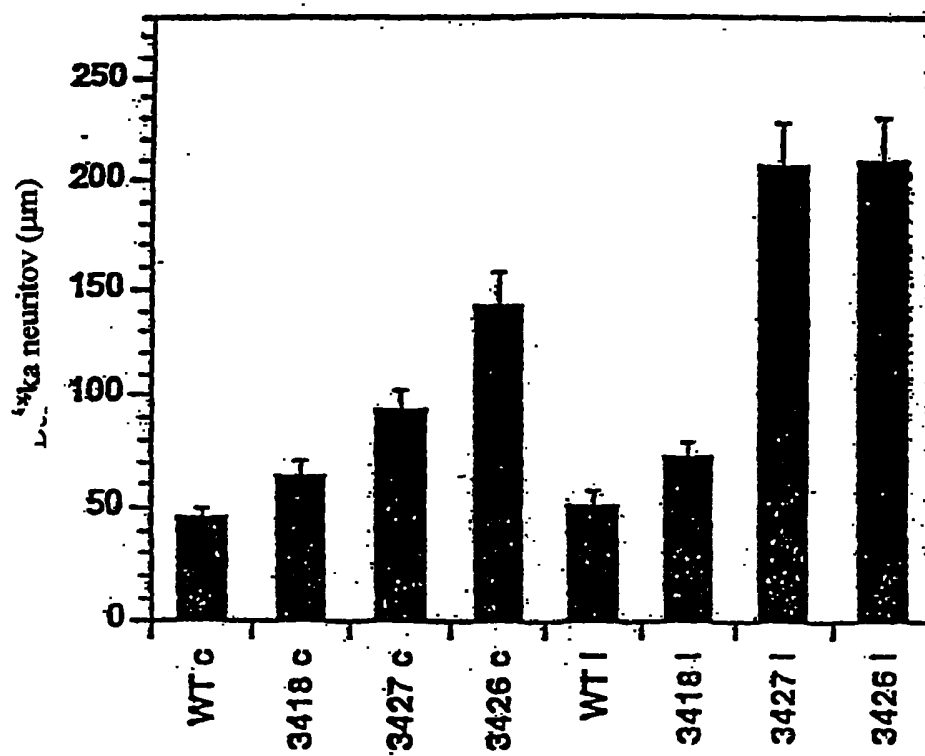
OBR.5



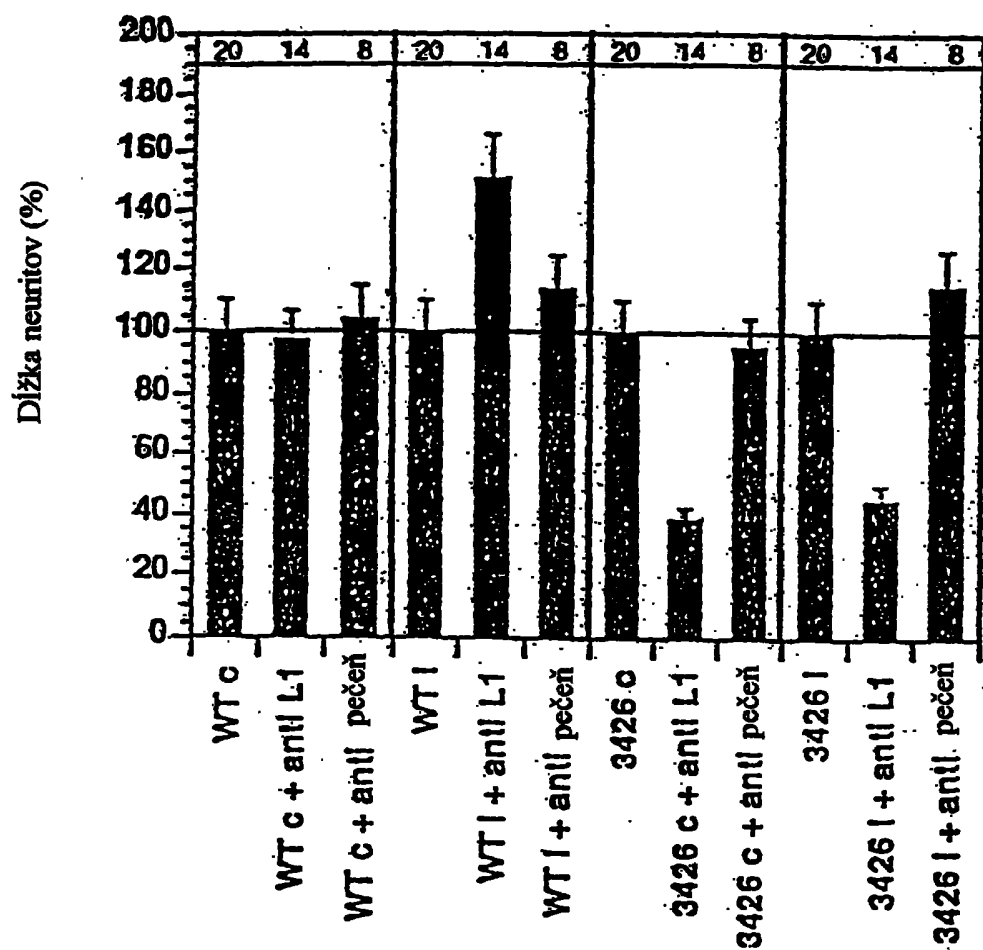
OBR.6



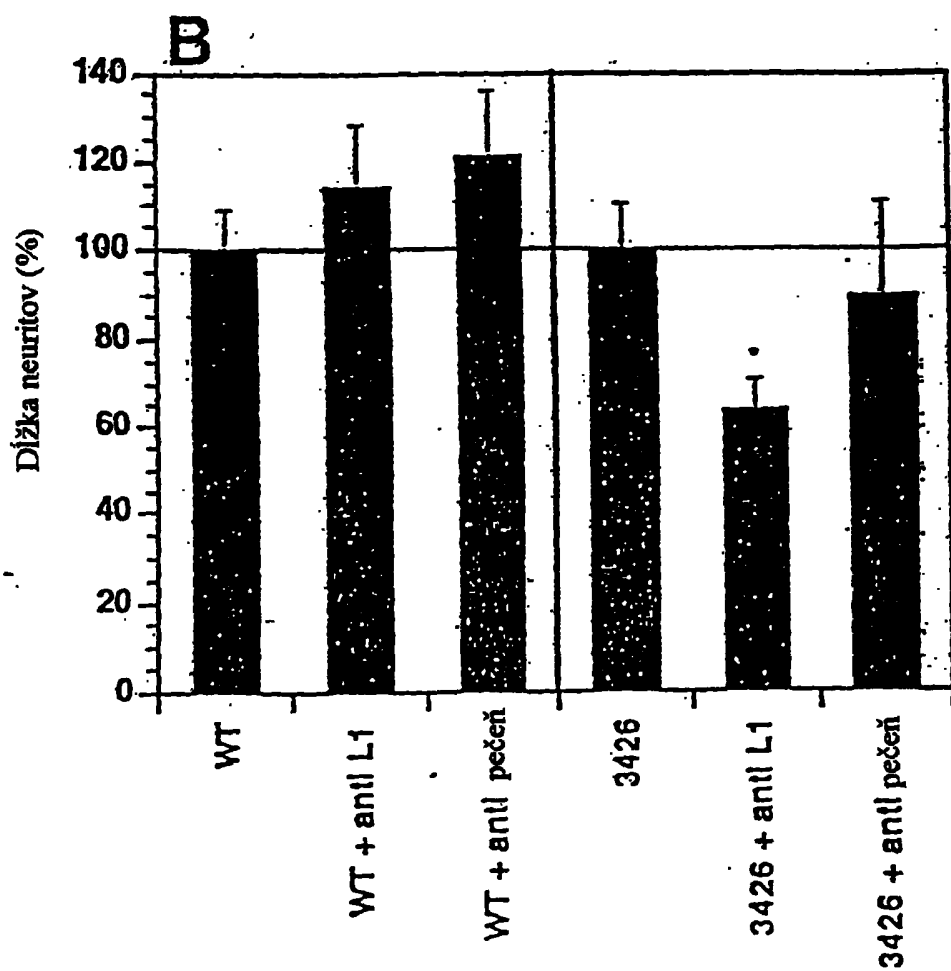
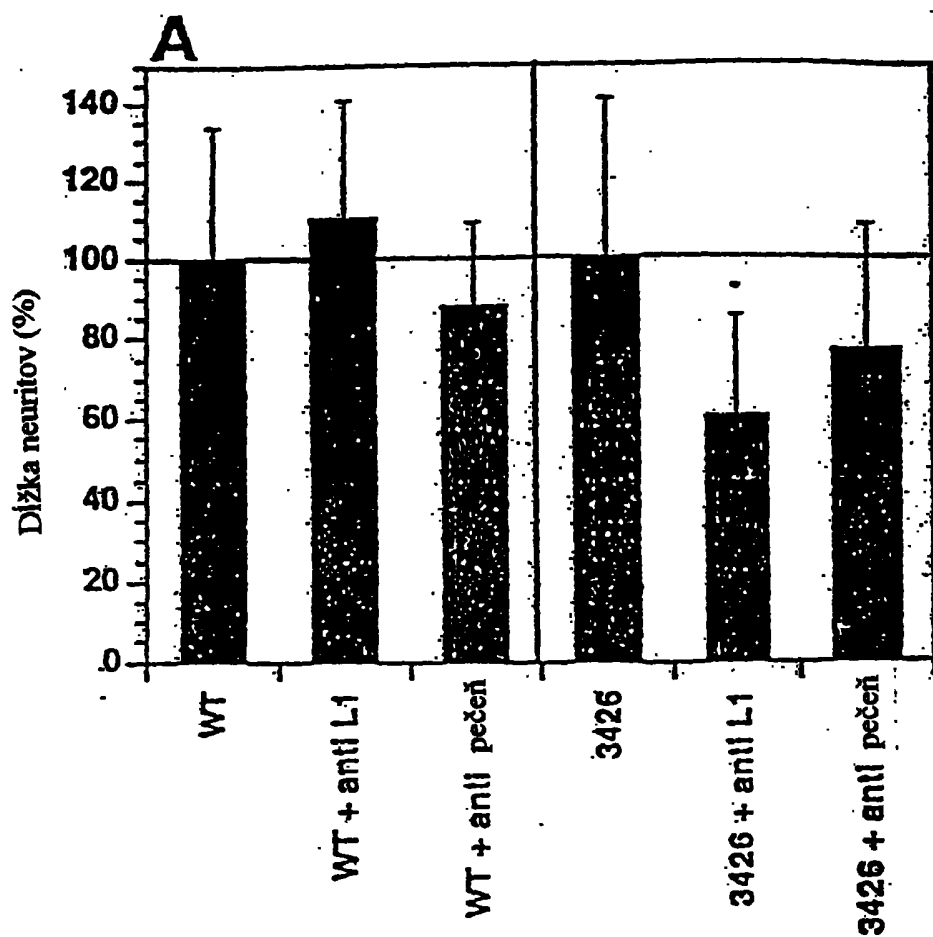
OBR.7



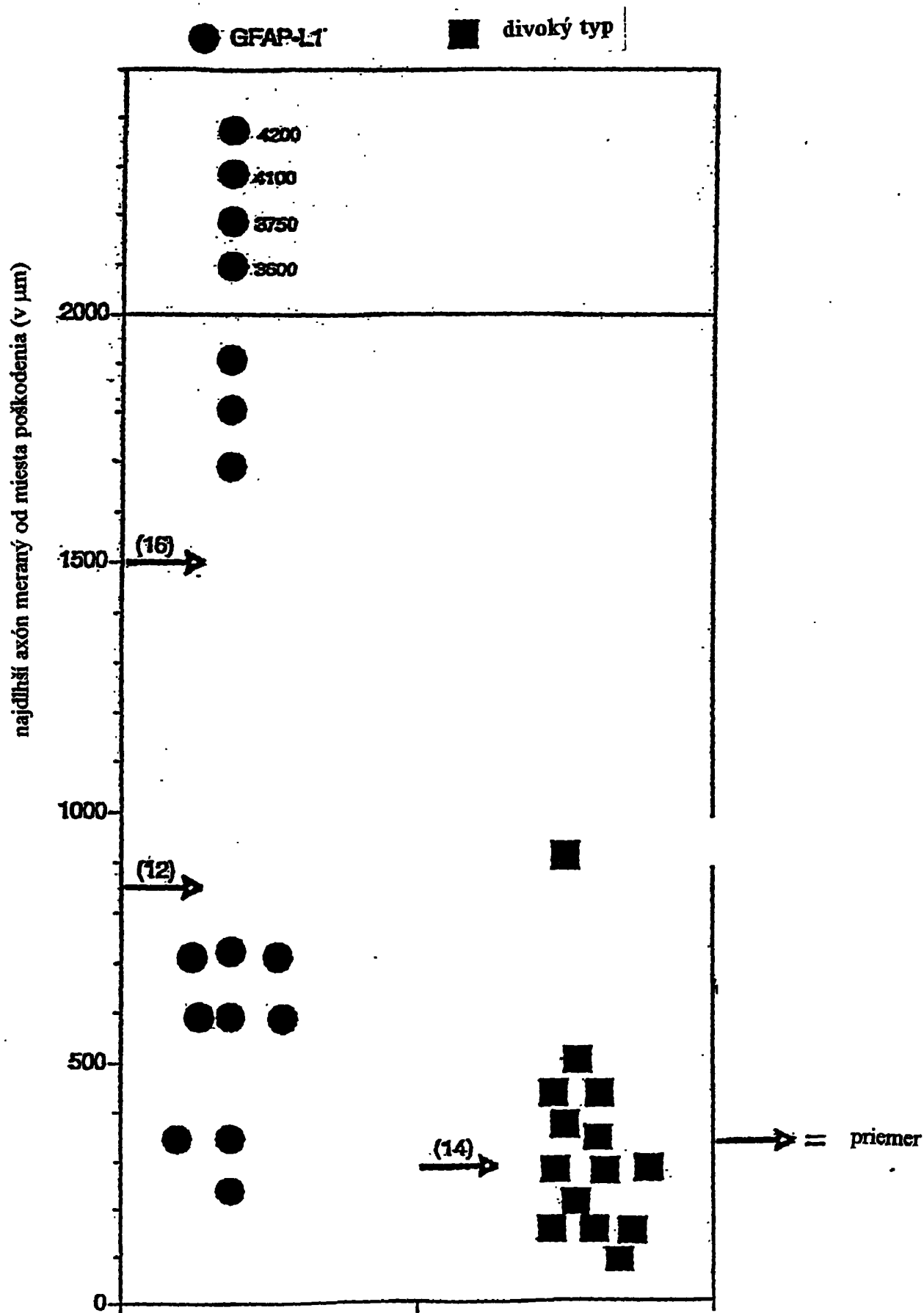
OBR.8



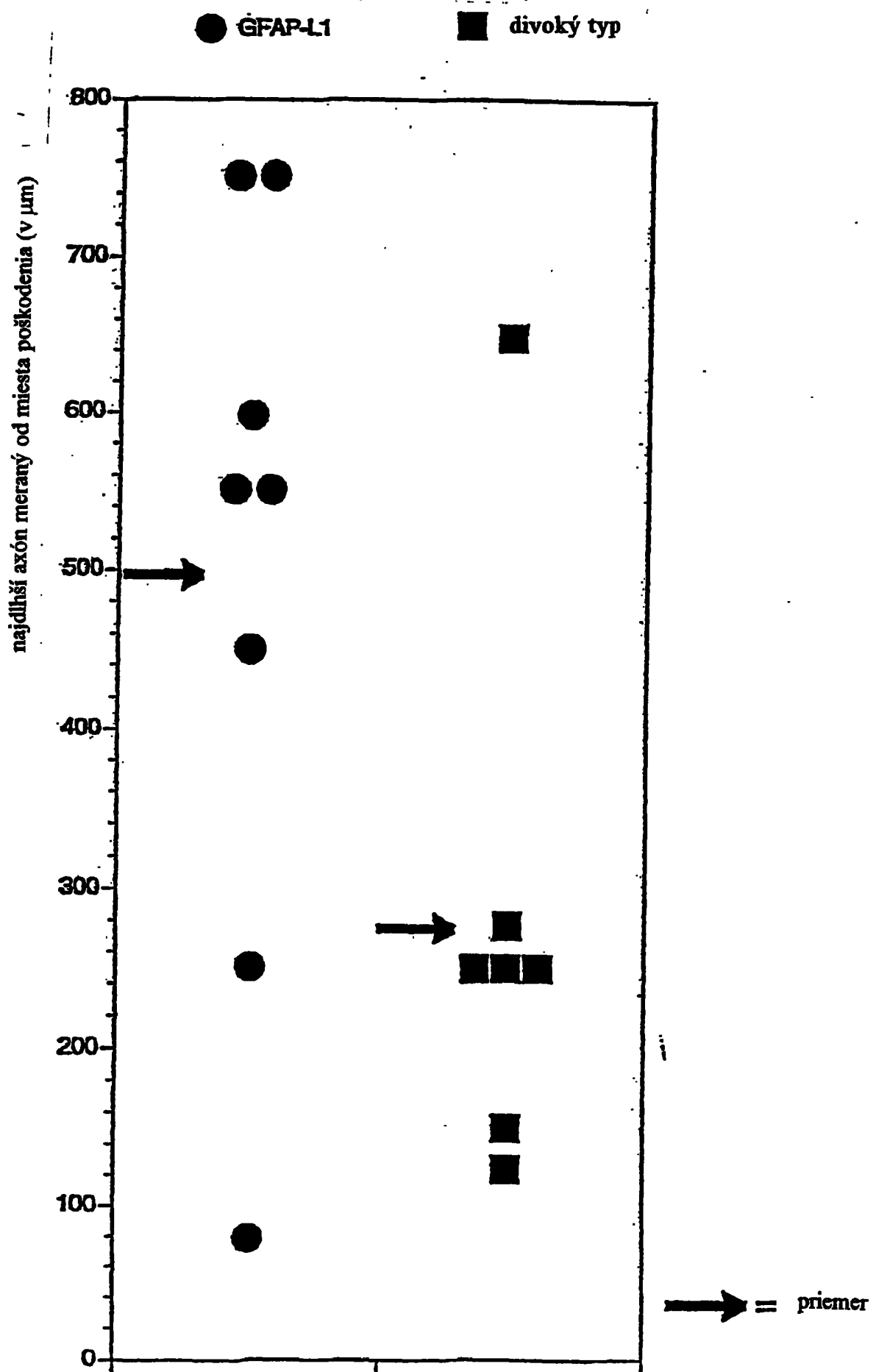
OBR.9



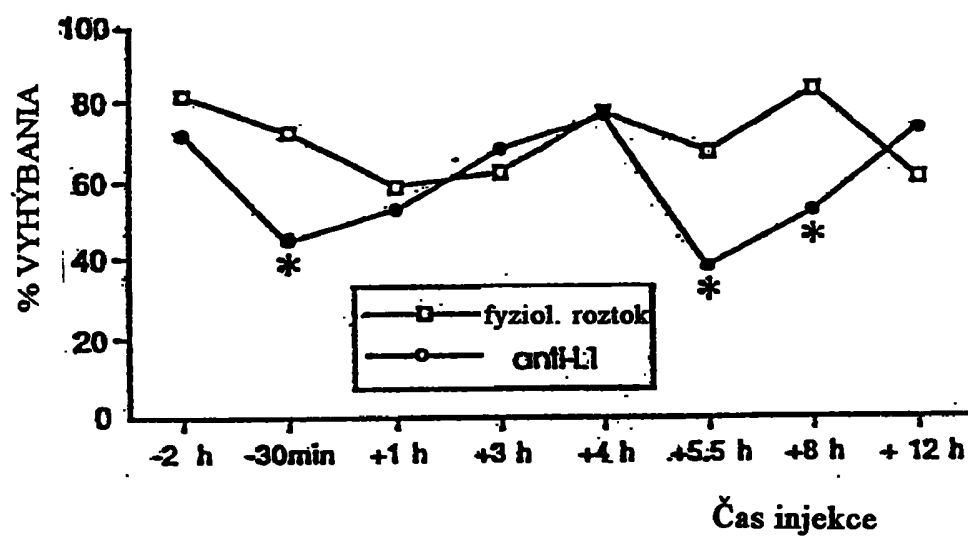
OBR.10

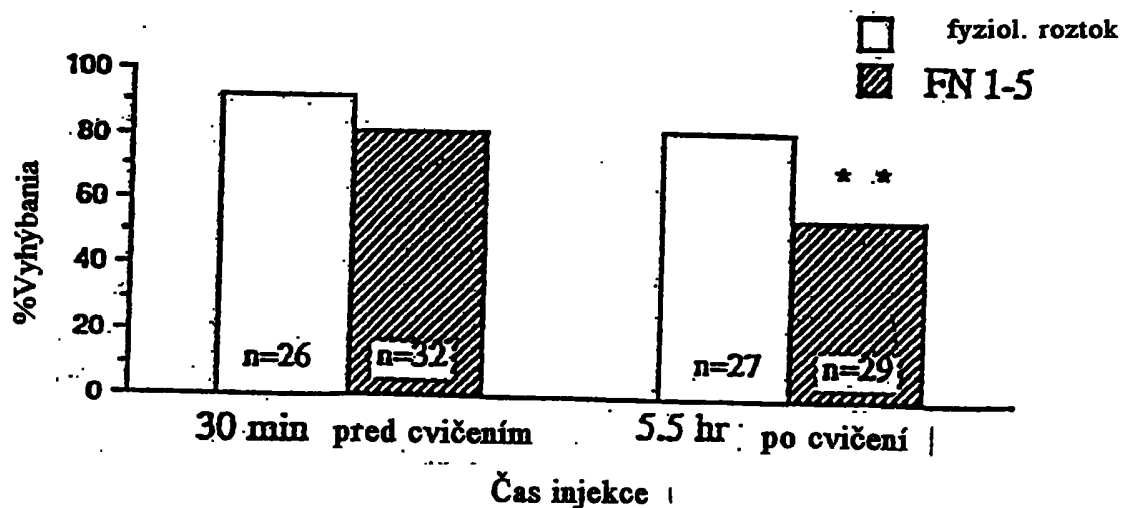
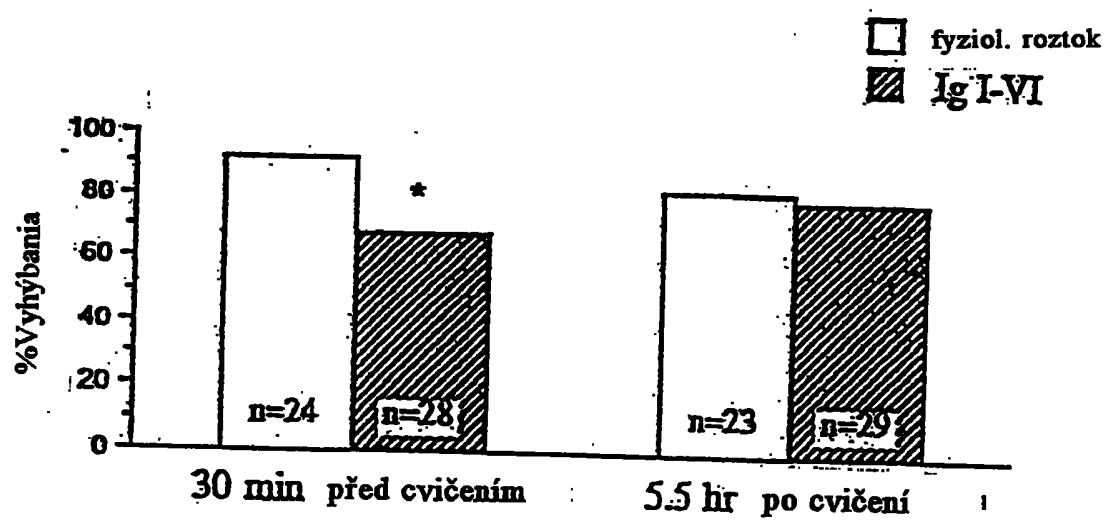


OBR.11

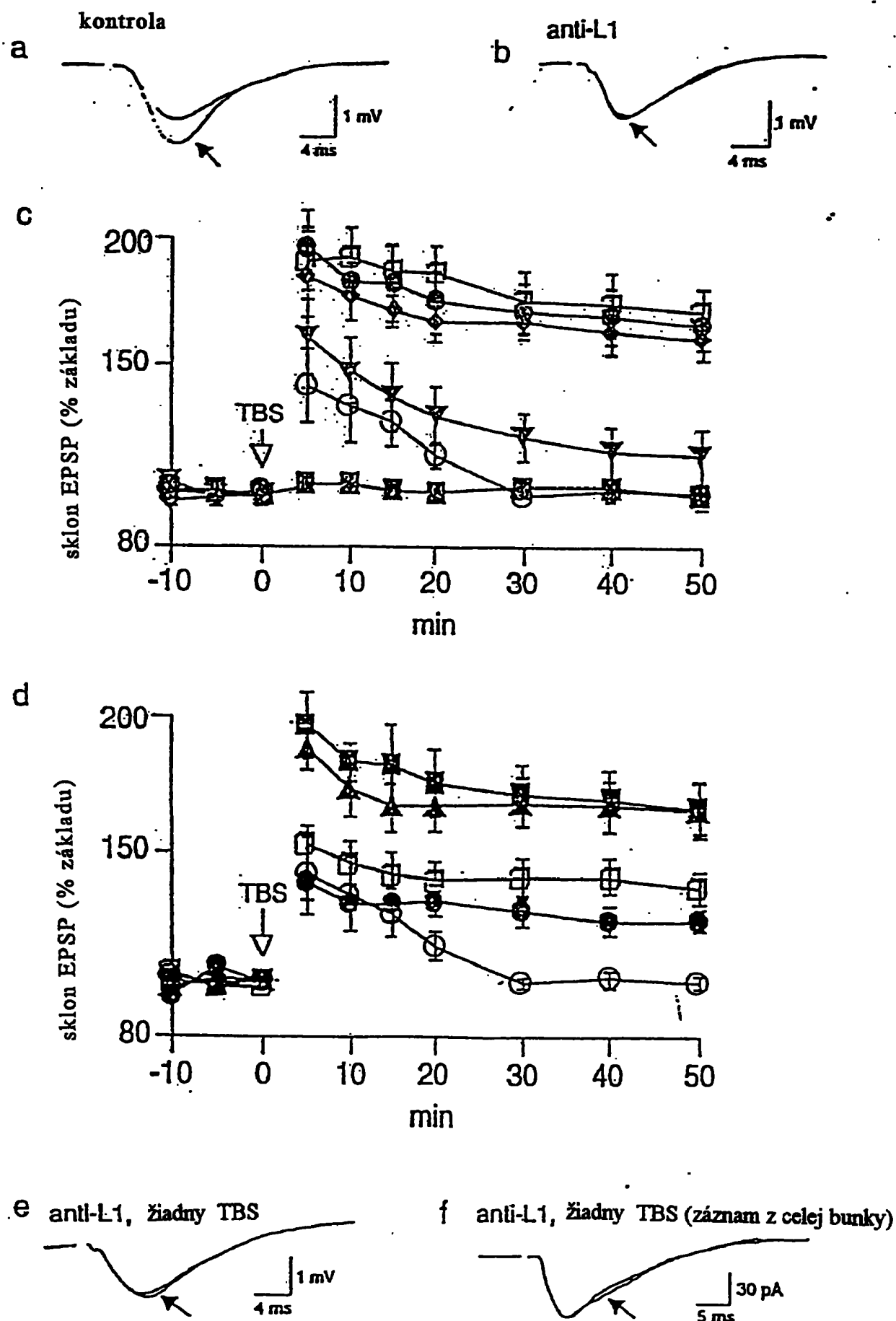


OBR.12

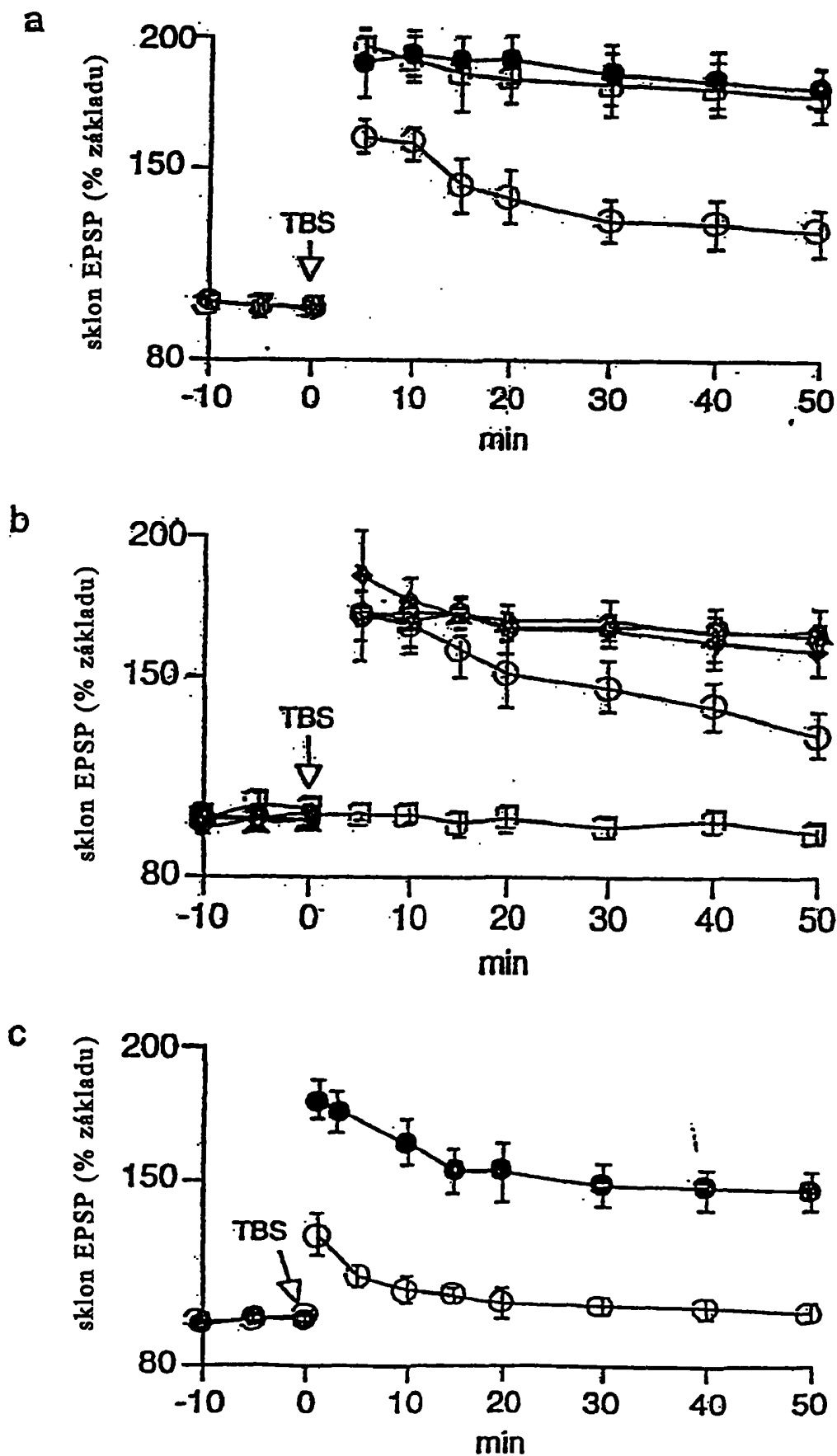


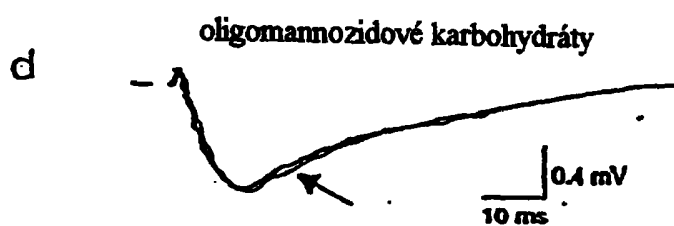
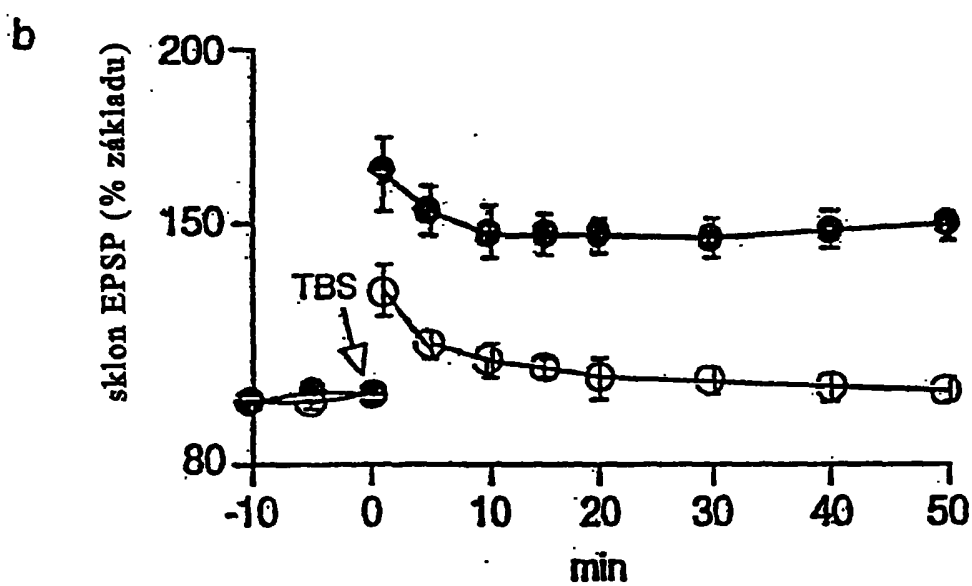
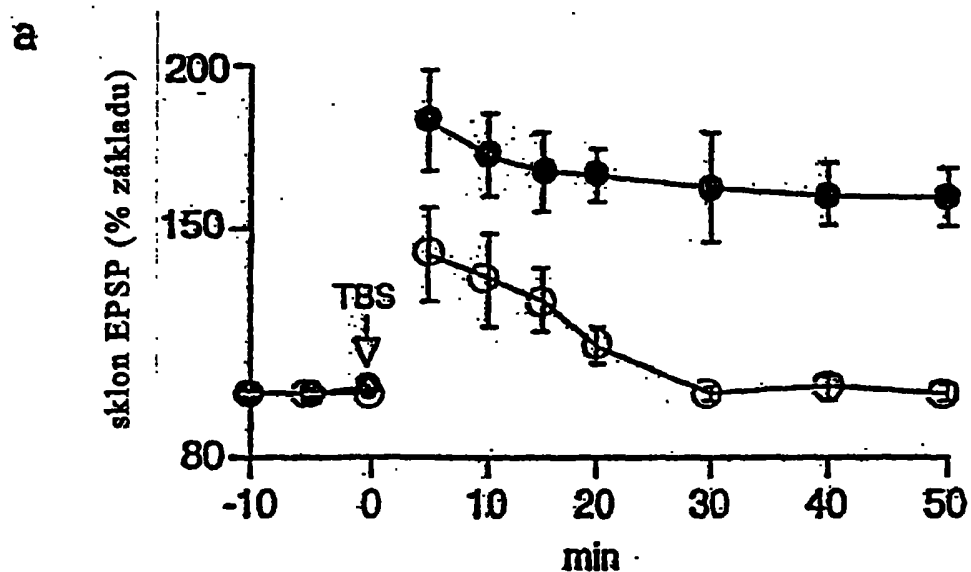


Čas injekce |
Amnézní efekt fragmentů L1



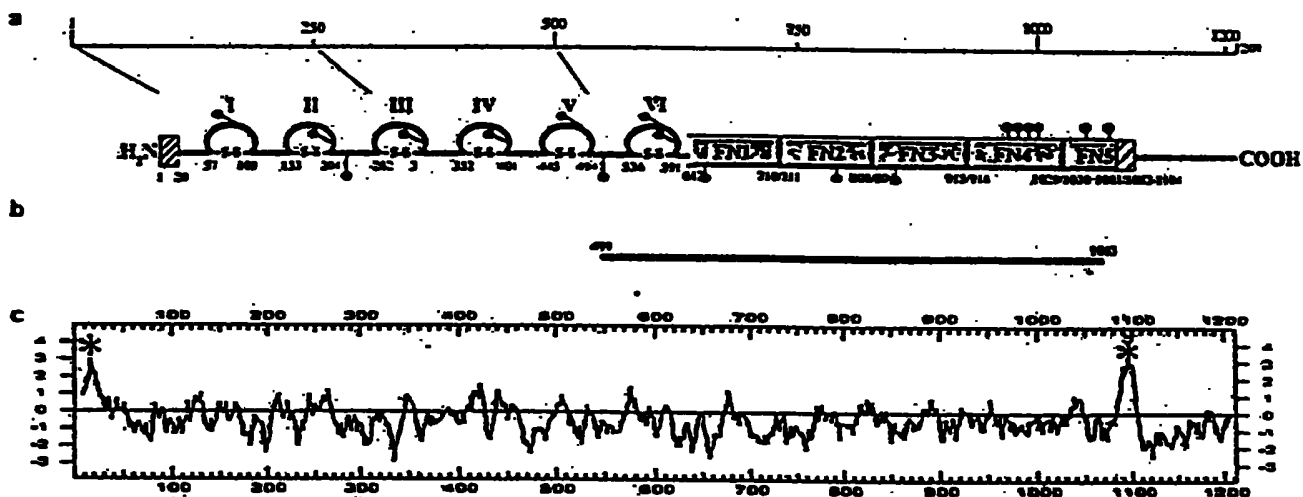
OBR.15





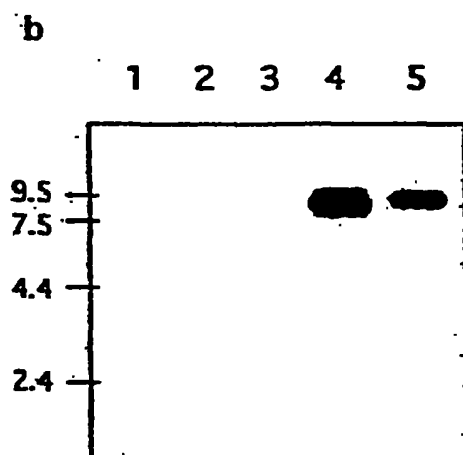
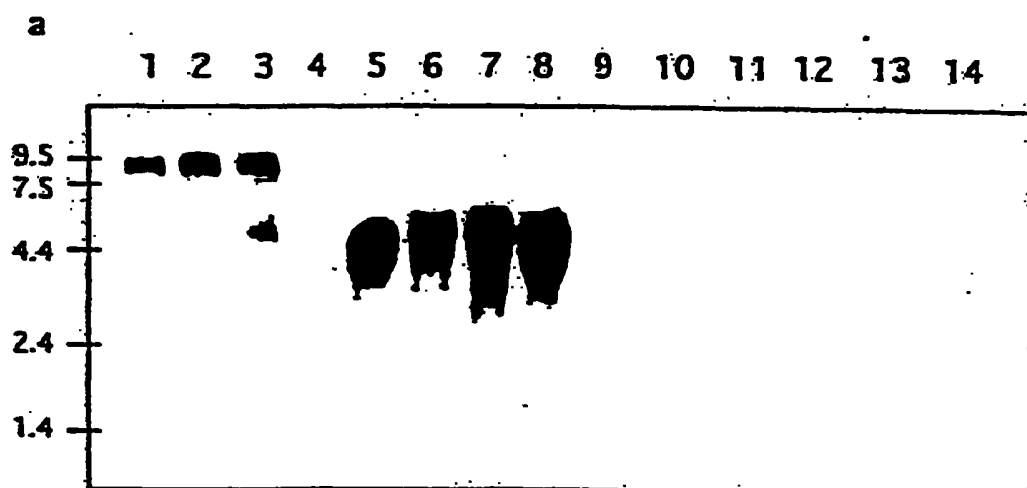
OBR.17

[illegible]

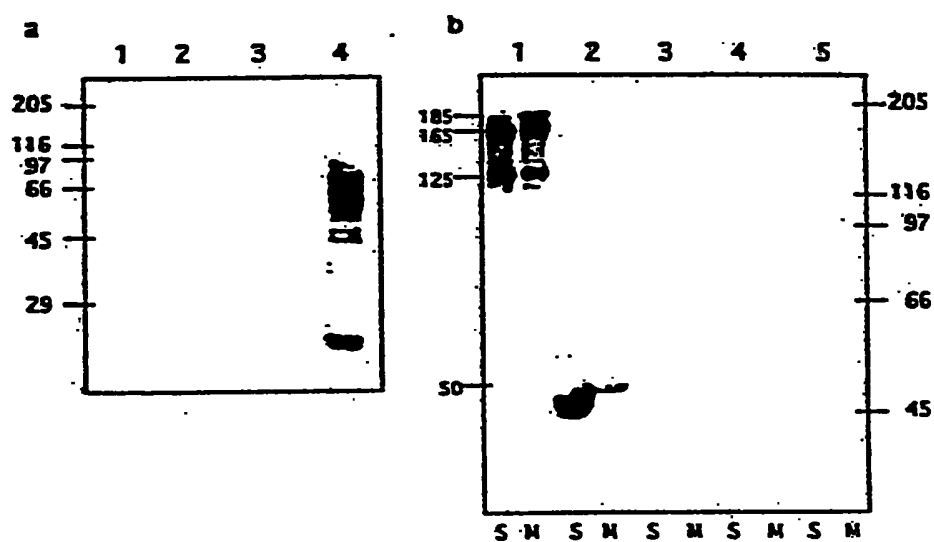


OBR.19

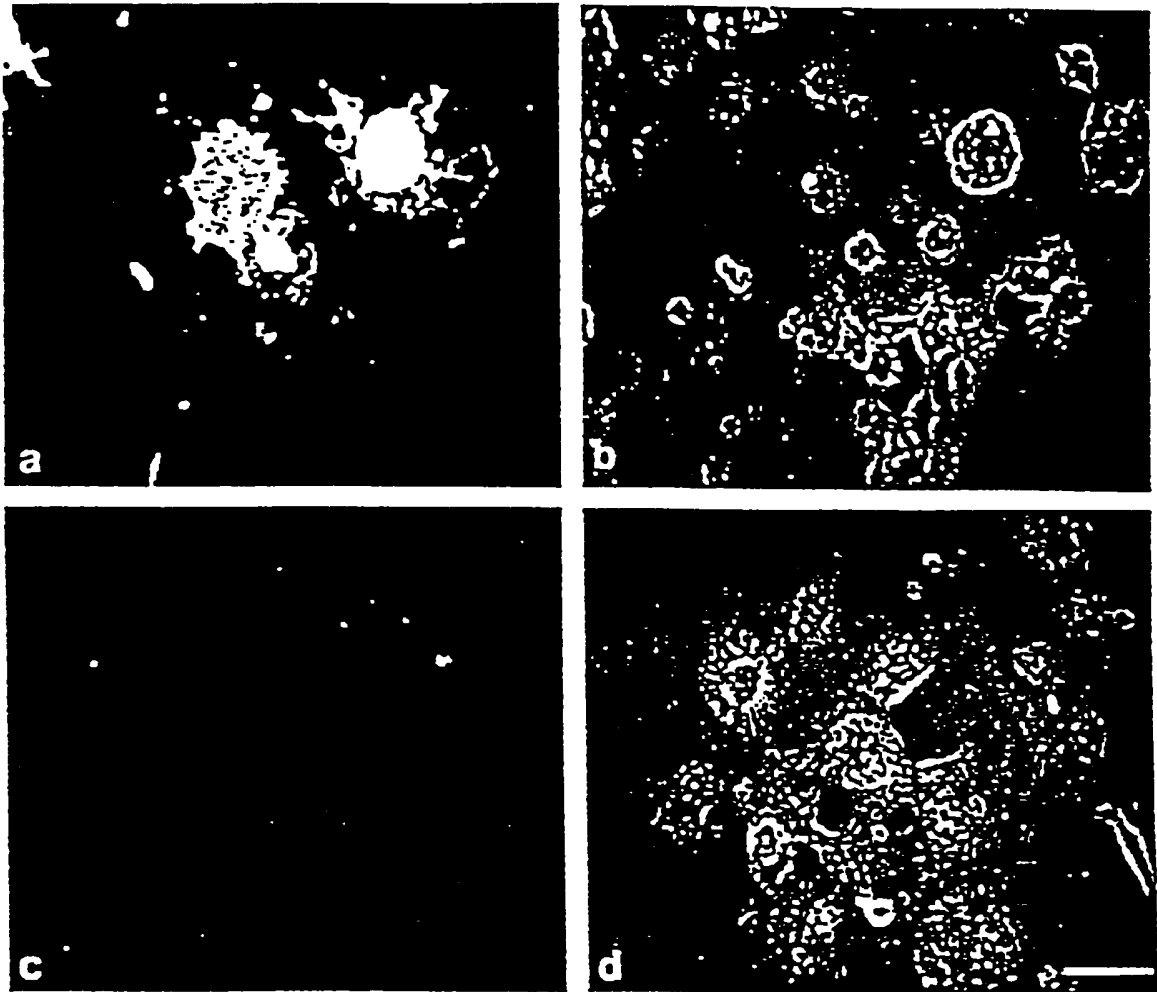
1	K	R	N	R	G	G	K	Y	S	V	K	E	K	E	D	-	H	P	D	F	E	V	O	S	A	K	-	-	D	E	T	F	G	E	Y	-	-	-	S	CHL1																							
1	K	R	S	K	G	G	K	Y	S	V	K	D	K	E	D	-	O	V	D	S	E	A	R	P	H	K	-	-	D	E	T	F	G	E	Y	R	S	L	E	S	L1																						
1	P	R	N	K	G	G	K	Y	P	V	K	E	K	E	D	A	H	A	D	F	E	-	O	P	M	K	E	D	D	G	T	F	G	E	Y	-	-	-	S	NrCAM																							
1	K	R	S	K	G	G	K	Y	S	V	K	D	K	E	D	T	O	V	D	S	E	A	R	P	H	K	-	-	D	E	T	F	G	E	Y	R	S	L	E	S	NgCAM																						
1	K	R	S	R	G	G	K	Y	P	V	R	D	N	K	D	E	H	L	N	P	E	D	K	N	V	E	-	-	D	G	S	F	-	D	Y	R	S	L	E	S	neurofascin																						
1	P	R	N	R	G	G	K	Y	-	V	H	D	R	E	-	-	L	A	N	G	R	R	D	Y	P	E	-	-	E	G	G	F	H	E	Y	-	-	-	S	neuroglian																							
1	K	K	S	K	G	G	K	Y	S	V	K	D	K	E	E	G	O	G	D	A	A	N	O	K	L	K	-	-	D	D	A	F	G	E	Y	R	S	L	E	S	L1.1																						
1	K	R	S	K	G	G	K	Y	S	V	K	E	K	E	E	G	O	I	D	S	E	A	R	P	H	N	-	-	N	E	A	F	G	E	Y	R	S	L	E	S	L1.2																						
35	D	S	D	E	K	P	-	L	-	K	G	S	-	-	R	S	L	N	R	N	M	-	-	-	-	-	-	C	P	T	-	E	S	-	A	D	S	L	V	CHL1																							
39	D	N	E	-	E	K	A	F	-	G	S	S	O	-	-	P	S	L	N	G	D	I	K	-	-	-	-	-	P	L	-	G	S	-	D	D	S	L	A	L1																							
37	D	A	E	D	H	K	P	L	K	K	G	S	R	T	-	P	S	D	R	T	V	K	-	-	-	-	-	-	K	E	-	E	S	-	D	D	S	L	V	NrCAM																							
39	E	A	E	-	K	G	S	-	-	-	A	S	G	S	G	A	G	S	G	V	S	S	P	G	R	G	P	C	A	-	-	A	G	S	-	E	D	S	L	A	NgCAM																						
38	D	-	E	D	N	K	P	L	-	P	N	S	O	-	-	T	S	L	G	T	I	K	-	-	-	-	-	-	Q	Q	-	E	S	-	D	D	S	L	V	neurofascin																							
33	O	P	I	D	N	K	-	S	-	A	G	E	Q	-	-	-	S	V	S	S	A	N	K	-	-	-	-	-	-	P	G	V	E	S	D	T	D	S	M	A	neuroglian																						
39	D	N	E	-	K	C	S	-	-	-	S	O	-	-	-	P	S	C	E	-	S	K	-	-	-	-	-	-	R	-	-	S	S	-	N	D	S	L	A	L1.1																							
39	D	N	E	-	K	R	-	-	-	-	A	S	O	-	-	-	P	S	L	C	E	D	S	K	-	-	-	-	-	-	L	C	T	-	D	D	G	L	D	L1.2																							
63	E	Y	G	E	G	D	O	S	-	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	A	Y	T	G	A	K	E	K	G	S	V	E	S	N	G	S	-	S	I	A	CHL1																						
67	D	Y	G	G	S	V	D	-	Q	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	S	G	K	K	E	K	E	A	A	G	G	N	E	S	-	S	G	A	L1																						
67	D	Y	G	E	G	V	N	-	G	O	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	S	G	K	K	E	K	E	P	A	E	G	N	E	S	-	S	E	A	NrCAM																					
72	G	Y	G	G	S	G	D	V	O	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	R	-	-	-	-	-	-	G	P	G	A	G	P	G	S	-	S	G	P	NgCAM																					
66	D	Y	G	E	G	G	E	G	O	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	T	V	K	K	D	K	E	E	T	E	G	N	E	S	-	S	E	A	neurofascin																						
62	E	Y	G	D	G	D	T	G	M	-	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	-	G	R	K	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	neuroglian																						
63	D	Y	G	D	S	V	D	-	Q	F	N	E	-	-	D	G	S	F	I	G	Q	Y	S	G	R	R	D	P	R	G	H	D	S	S	G	A	V	S	P	V	L1.1																						
65	D	Y	A	N	S	N	S	V	O	T	E	V	-	-	-	D	E	S	L	A	S	O	S	C	V	R	D	V	P	D	A	E	T	O	E	S	-	S	P	L	L1.2																						
120	T	E	P	L	E	R	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CHL1																							
124	T	S	P	-	N	P	A	V	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L1																							
104	P	S	P	V	N	A	M	N	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NrCAM																							
104	A	S	P	-	A	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NgCAM																							
103	T	S	P	V	N	A	-	Y	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	neurofascin																							
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	neuroglian																								
121	N	P	N	M	P	P	-	-	P	S	H	S	F	P	T	S	V	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L1.1																							
124	N	P	A	T	A	-	-	-	S	H	S	G	-	P	N	S	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L1.2																							



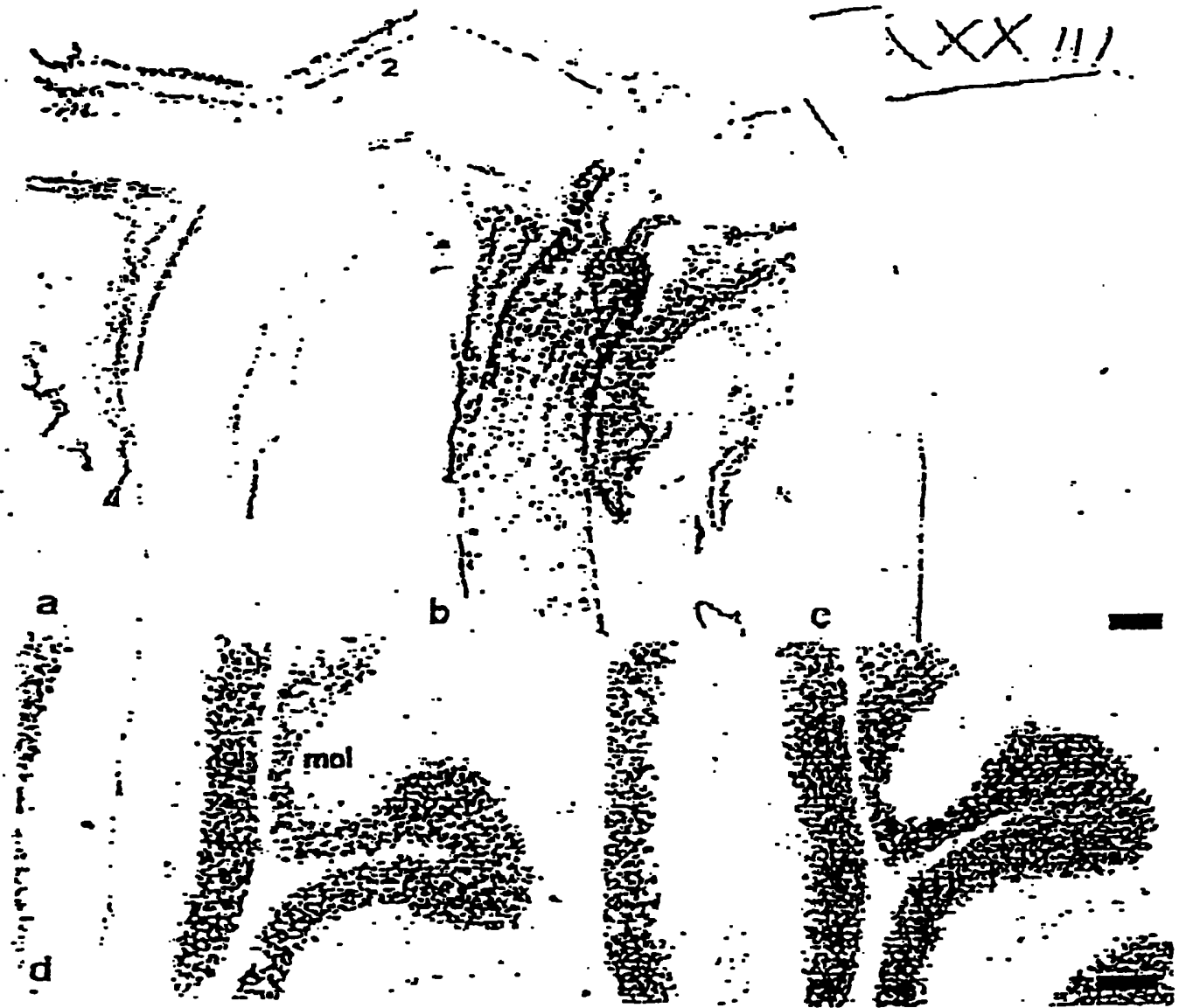
OBR.21



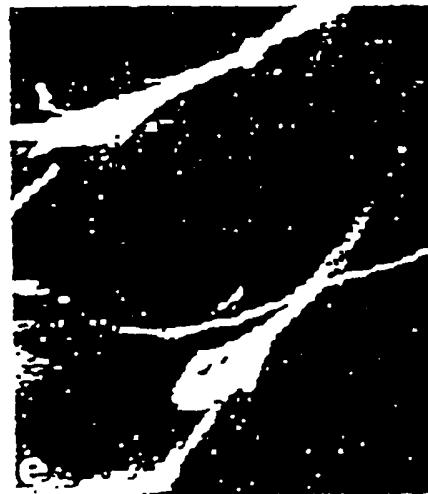
OBR.22



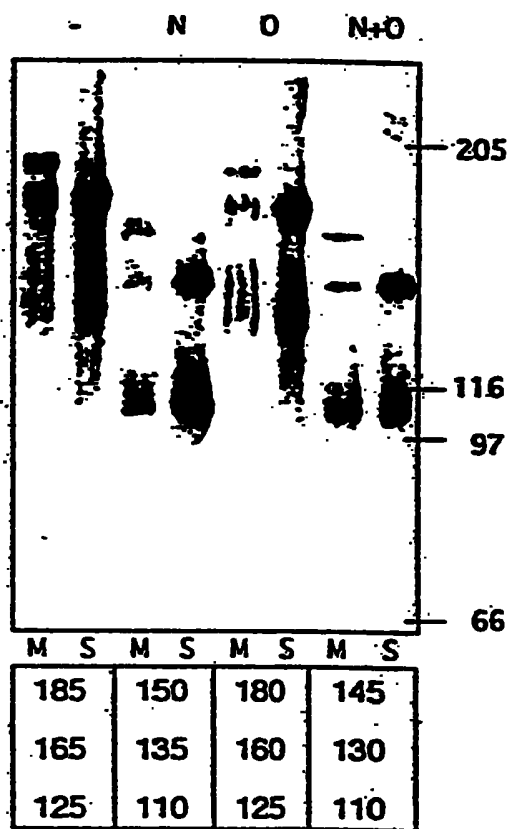
OBR.23



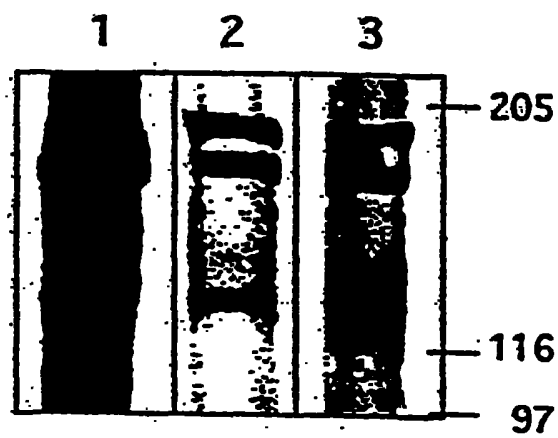
OBR.24



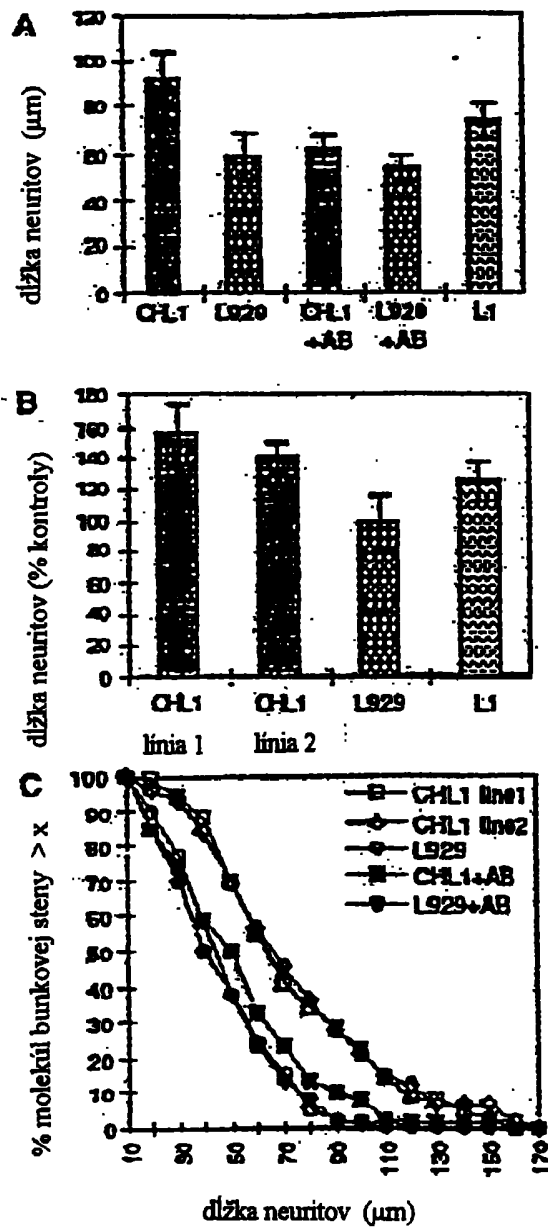
OBR.25

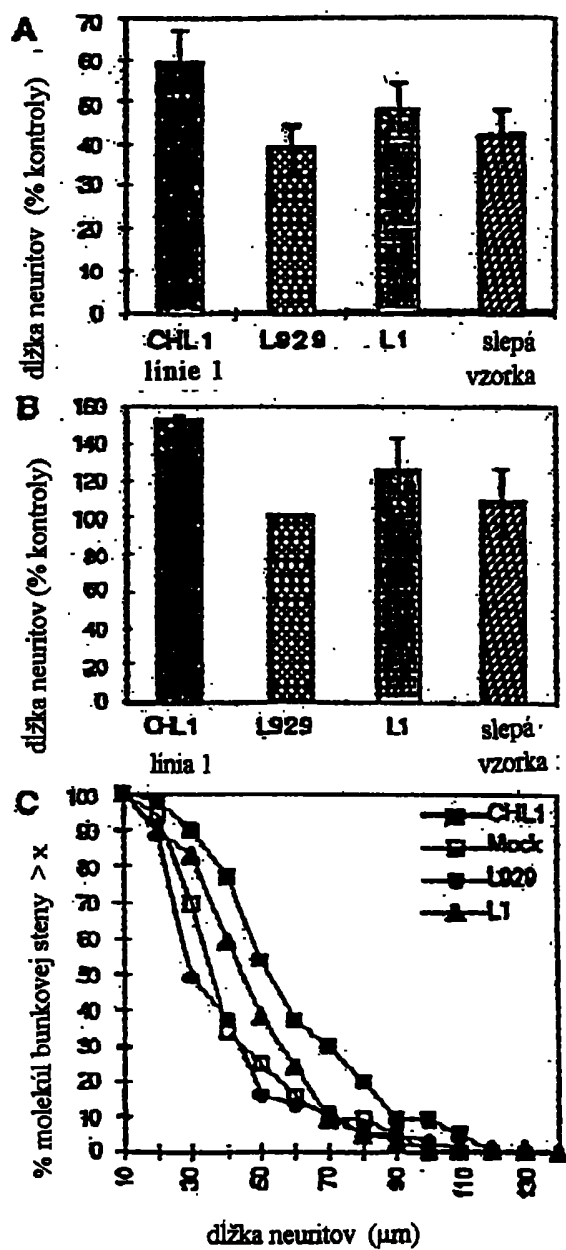


OBR.26



OBR.27





OBR.29

