

CZ 295444 B6

Rekombinantní protein, protilátka, kompozice a krmivo pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí, nukleová kyselina, vektor a rekombinantní organismus

5

Oblast techniky

Vynález se týká antisekrečního faktoru ovlivňujícího transport kapaliny a/nebo zánětlivé reakce. Konkrétněji se vynález týká určitého rekombinantního proteinu, protilátky, kompozice a krmiva pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí, nukleové kyseliny, vektoru a rekombinantního organismu.

15

Dosavadní stav techniky

Všechny buňky a tkáně jsou kriticky závislé na konstantním a normálním tekutém prostředí v kombinaci s adekvátním krevním zásobením. Porucha jednoho nebo obou těchto systémů se může rychle stát pro organismus fatální. Existují dva různé systémy nerovnováhy tekutiny:

20

A. edém, který je charakterizován abnormální akumulací tekutiny v intracelulárním prostoru tkáně nebo v tělních dutinách;

25

B. dehydratace, která v přísném slova smyslu znamená jen ztrátu vody, ale která je často používána pro popis kombinované ztráty vody a iontů.

35

Nejběžnějšími příčinami edému a dehydratace jsou: průjem, nemoci spojené se zánětem, mozkový edém, astma, rhinitida, konjunktivitida, artritida, glaukom, různé formy patologických změn tlaku v intrakraniálním prostoru, (hypotenze a hypertenze), změny tlaku ve středním uchu, jako například morbus meniere, dermatitida, chemické nebo fyzikální poruchy kůže a kožních žláz, jako například mastitida, různé formy endokrinních poruch, jako například diabetes insipidus, Connův syndrom, Cushingův syndrom a morbus Addison, poruchy ledvin, jako například pyelonefritida a glomerulonefritida, metabolické poruchy, jako například myxedém a akutní interminentní porfyrie. Dále jsou to vedlejší účinky způsobené různými léky, jako například antidiabetiky, cytostatiky, barbituráty, narkotiky a analogy narkotik.

40

Průjem je způsoben změnou permeability pro vodu a ionty ve střevě. Tato porucha je často způsobena bakteriálními enterotoxiny, které produkuje například *Escherichia Coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* a *Clostridium difficile*. Porucha může být také způsobena střevním zánětem. Protože transport vody je spjat se vstřebáváním elektrolytů a živin, trpí zvířata pravidelně průjmy a malnutricí, která se projeví snížením hmotnostních přírůstků u rostoucích zvířat. Organismus může ovlivnit tuto nerovnováhu neurohormonálními mechanismy, například uvolněním somatostatinu a peptidů opiátového typu z interneuronů ve střevní sliznici. Tyto polypeptidy jsou zodpovědné za zpomalení sekrece tekutiny a zmírnění průjmu.

45

Nedávno popsany antisekreční faktor (AF) byl zčásti purifikován z vepřové hypofýzy a ukázalo se, že zastavuje patologickou sekreci indukovanou různými enterotoxiny. Vysoké hladiny AF ve vepřovém mléce chrání kojená mláďata proti neonatálním průjmům.

50

Při léčbě průjmů u lidí i zvířat se běžně používá různých antimikrobiálních látek. Jsou také často užívány jako potravinová aditiva u vepřů, skotu a drůbeže. S ohledem na rychlý vývin rezistentních bakterií ve střevech je nyní používání antibiotik při terapii enteritidy omezováno jak u lidí, tak ve veterinární medicíně.

55

Jiná antidiarhetika čelí sekreci ve střevní sliznici. Poněvadž tyto látky jsou zaměřeny proti organismu hostitele, je nepravděpodobné, že se v tomto případě časem rozvine rezistence. Mezi

- tyto látky patří neuroaktivní léky, jako například fenothiaziny a thioxantheny. Díky značným nežádoucím účinkům těchto látek nebyly v mnoha zemích zahrnuty mezi léky pro anti-diarhetickou terapii. Další látky jsou deriváty opiátů, jako například kodein a loperamid. Protože mnohé z těchto látek mají také inhibiční vliv na střevní motilitu, zamezují tak rychlé clearanci
- 5 patogenních bakterií ze střevního prostředí a rozhodně nemohou být proto doporučeny pro terapii enteritidy dyzenterického nebo parazitárního původu. Deriváty somastatinu byly zavedeny nedávno, ale jejich použití je limitováno obtížným podáváním těchto látek a možnými interakcemi s endokrinní regulací růstu.
- 10 Antisekreční faktor AF nebyl dosud přímo použit k léčbě malnutrice a průjmů pro obtížnou přípravu tohoto proteinu v dostatečné čistotě. Nicméně bylo možné indukovat podobné proteiny u domácích zvířat, kterým bylo podáváno speciální krmivo (SE patent č. 9000028–2). Vepři, kterým byla taková potrava podávána, měli vysokou hladinu AF-podobného proteinu a vykazovali značně vyšší hmotnostní přírůstek oproti kontrolním zvířatům. AF u krys provokovaných
- 15 toxinem A z C. difficile poskytuje ochranu nejen proti intestinální sekreci, ale potlačuje i zánět a krvácení ve střevě.

Podstata vynálezu

- 20 Hlavním objektem vynálezu je nový rekombinantní protein a jeho homology a fragmenty (peptidy) pro použití k normalizaci patologických transportů tekutiny. Tyto proteiny a peptidy se souborně označují jako antisekreční faktory (AF). Při použití AF dochází také k částečné inhibici nebo totální eliminaci vývoje zánětlivých reakcí různé etiologie. Návratu k normálnímu stavu
- 25 (normální transport tekutin a nepřítomnost zánětu) je docíleno při použití těchto proteinů nebo peptidů. AF proteiny či peptidy jsou efektivně absorbovány přes sliznici střeva bez ztráty svého účinku (v porovnání s intravenózním podáním). V důsledku toho existují různé režimy léčby a správné podání tohoto proteinu nebo peptidů může rychle restaurovat narušenou rovnováhu tekutiny (vody a iontů) v organismu a zvrátit vývoj zánětu nebo obojí.

- 30 Souhrnně lze uvést, že rekombinantní AF (rAF) a jeho homology a fragmenty mohou být použity k imunodetekci, jako přísady do krmiv pro urychlení růstu zvířat a jako protiprůjmová léčiva, a to proti onemocněním spojeným s edémem, dehydratací a/nebo zánětem.

- 35 Předmětem vynálezu je rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology, nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.

- Ve výhodném provedení je fragment uvedený výše vybrán ze skupiny zahrnující: a) aminokyseliny č. 35 až 42, b) aminokyseliny č. 35 až 46, c) aminokyseliny č. 36 až 51, d) aminokyseliny č. 36 až 80 a e) aminokyseliny č. 1 až 80 aminokyselinové sekvence znázorněné v SEQ ID NO: 1.
- 40

- Zvláště pak je předmětem vynálezu peptid $X_1VCX_2X_3KX_4R$ odpovídající fragmentu, který obsahuje aminokyseliny č. 35 až 42 rekombinantního proteinu znázorněného v SEQ ID NO: 1, kde X_1 je nebo není zastoupen, X_2 je H, R nebo K, X_3 je S, L nebo jiná neutrální aminokyselina a X_4 je T nebo A.
- 45

- Předmětem vynálezu je dále také protilátka specifická vzhledem k proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homologům nebo fragmentům, které mají antisekreční aktivitu.
- 50

- Kromě toho je předmětem vynálezu také kompozice pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u zvířat, včetně člověka, která jako aktivní složku obsahuje účinné množství rekombinantního proteinu nebo jeho homologu nebo fragmentu definovaného výše.
- 55

Ve výhodném provedení obsahuje tato kompozice jako fragment výhodný fragment uvedený výše.

5 Dále je předmětem vynálezu také použití rekombinantního proteinu uvedeného výše pro výrobu kompozice pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u zvířat, včetně člověka.

10 Předmětem vynálezu je také krmivo pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u obratlovců, které obsahuje jako účinnou přísadu rekombinantní protein definovaný výše nebo rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus, který je schopen ho produkovat.

15 Předmětem vynálezu je dále také použití protilátky specifické, vzhledem k výše uvedenému rekombinantnímu proteinu, při in vitro zkouškách pro detekci uvedeného proteinu nebo jeho homologů nebo fragmentů.

Dále je předmětem vynálezu také nukleová kyselina kódující tento rekombinantní protein, homolog nebo fragment.

20 Dále je předmětem vynálezu také použití této nukleové kyseliny pro výrobu odpovídajících proteinů nebo homologů nebo fragmentů.

Dalším předmětem vynálezu je vektor obsahující výše uvedenou nukleovou kyselinu a rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus, který obsahuje tento vektor.

25 Konečně je předmětem vynálezu i rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus schopný produkovat výše uvedený rekombinantní protein.

30 Jako organismů, které jsou schopny produkovat rekombinantní protein, lze použít různých typů organismů, jako rekombinantních bakterií a eukaryontních organismů, jako například kvasinek, rostlin a obratlovců, kromě člověka.

35 V posledních deseti letech proběhlo mnoho pokusů o izolaci čistého proteinu AF konvenčními biochemickými metodami, ale protein se nepodařilo získat v homogenní formě. Pomocí nové metody se podařilo získat poločistý protein AF pro imunizaci a selekci antisér pomocí imunohistochemické metody bylo vybráno vhodné antisérum. Pomocí tohoto antiséra bylo možno vyklenovat rekombinantní lidskou cDNA, exprimující AF v E. coli.

40 Byla stanovena sekvence nové cDNA a zjistilo se, že je jedinečná. Se znalostí této sekvence byly zkonstruovány oligonukleotidové sondy, které hybridizovaly s lidskou hypofyzární RNA. Velikost této RNA okolo 1400 párů bází je ve shodě s velikostí sekvenované cDNA, která obsahuje 1309 párů bází plus póly(A)zakončení. Částečná cDNA sekvence z kryší hypofýzy se ukázala jako identická s lidskou cDNA, což ukazuje, že se jedná o všudypřítomnou strukturu konzervovanou v AF genech z různých druhů. Tato podobnost umožňuje použít stejné oligonukleotidové sondy k identifikaci AF kódující RNA a DNA z různých druhů.

45 Kromě toho bylo možno exprimovat rAF v biologicky aktivní formě. AF protein jako fúzní protein s glutathion S-transferázou byl exprimován ve velkém množství v E. coli a čištěn do homogenního stavu pomocí afinitní chromatografie. Po rozštěpení fúzního proteinu trombinem se ukázalo, že rekombinantní AF (rAF) je extrémně účinný, 44 ng (10^{-12} mol) má ve střevě krysy poloviční maximální inhibiční schopnost na sekreci kapaliny indukovanou cholera toxinem.

55 Pomocí genové technologie byly produkovány malé fragmenty rAF. Ukázalo se, že aktivita sídlí v malé sekvenci obsahující 7–8 aminokyselin. To bylo prokázáno pomocí chemické syntézy na pevné fázi, při které byl produkován technický oktapeptid. Ukázalo se, že tento oktapeptid je na

molární bázi víceméně stejně biologicky aktivní jako rAF. Pomocí místně orientované syntézy byly vytvořeny různé sekvence uvnitř aktivního místa a zjistilo se, že záměny určitých aminokyselin se obešly bez ztráty biologické aktivity.

5 Množství sekretované tekutiny bylo měřeno pomocí modelu střevní kličky: klička tenkého střeva

byla sešita dvěma stehy. Do kličky bylo injikováno určité množství enterotoxinu. Při testování antisekretorických látek jsou tyto látky podány mezi jednou hodinou před a dvěma hodinami po provokaci toxinem. Injekce byla aplikována třemi různými způsoby intravenózně, intraintestinálně a intranasálně. Tekutina se akumulovala ve střevní kličce pět hodin po podání toxinu.

10 Sekrece byla počítána podle hmotnosti akumulované tekutiny na 1 cm střeva.

Sekvence proteinu byla určena jednak sekvenováním aminokyselin a jednak nepřímo dedukcí ze sekvence cDNA.

15 Rekombinantní AF má velmi malé toxické nebo systemické účinky. Nebyly zaznamenány žádné toxické reakce u krys, kterým byla podávána 100x vyšší dávka než ta, která vyvolává polovinu maximální inhibice. Protože je látka účinná i po podání do průsvitu střeva, bude možné tuto látku podávat i perorálně.

20 Rekombinantní AF inhibuje sekreci také při podání po provokaci toxinem, na rozdíl od přirozeného AF, který se zdá být účinný pouze, pokud je injikován před podáním toxinu. AF by tedy mohl být podáván jak profylakticky, tak terapeuticky.

25 Ukázalo se, že rAF a jeho peptidové fragmenty inhibují cytotoxické reakce a zánět způsobený toxinem A z *Clostridium difficile* ve střevě. Pomocí testu permeability barviva bylo zjištěno, že rAF a jeho fragmenty mohou zvrátit patologické změny permeability indukované cholera toxinem nejen ve střevní sliznici, nýbrž i v plexus choroideus, který reguluje tlak likvoru v mozku. U králíků byla vyrobena antiséra proti rAF a použita při imunostanovení ELISA (enzyme linked immuno assay). Tato metoda může být použita k měření hladiny AF v tělesných tekutinách nebo

30 krmivu.

Metoda purifikace protilátek proti AF (přirozenému nebo rekombinantnímu), která se provádí pomocí afinitní chromatografie na kolonách s agarózou, s kopulovaným rAF, je popsána níže.

35 Také se potvrdilo, že tyto protilátky jsou vhodné pro detekci AF v tkáňových řezech pomocí imunohistochemických technik a pro detekci AF ve Western-blotu.

Vynález je dále popsán na neomezujících příkladech doprovázených obrázky.

40

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1a a dále obr. 1b

45 Sekvence nukleové kyseliny a dedukovaná aminokyselinová sekvence nového lidského proteinu. Potvrzená aminokyselinová sekvence je podtržena.

Obr. 1c

50 Horizontální mapa ukazující klonovanou cDNA a oligonukleotidové primery.

Obr. 2

55 Coomassie brilliantovou modří zbarvený SDS-polyakrylamidový minigel (A) a imunoblot zkoušený s antisérem proti AF (B) vepře. Linie s neindexovanými čísly obsahují fúzní proteiny

glutathion-agaróza-čištěný GST-AF s proteinem AF-1, AF-2 a AF-3, zatímco linie s indexovanými čísly obsahují fúzní proteiny rozštěpené trombinem. Nalevo jsou uvedeny molekulové hmotnosti (R), (BDH). GST-AF-1 fúzní protein je vysoce degradován, ale imunoblotová analýza ukazuje jen detekci celé délky proteinu a spontánního trombónového štěpení. V GST-AF-3 je 26 kDa produkt, pravděpodobně glutathion S-transferázový konec, který je nezávisle exprimován.

Obr. 3a

Western blot používající antisérum proti rekombinantnímu proteinu AF-2. Byly použity tyto složky: nalevo porcín (P) a tři lidské hypofýzy (H1, H2, H3) a napravo tři rekombinantní proteiny AF-1, AF-2 a AF-3 obr. 2. V centrální části standard molekulární hmotnosti (R).

Obr. 3b

ELISA u rAF používající surové antisérum a afinitně čištěné protilátky vypěstované v těle králíka.

Obr. 4

Autoradiogram Northern blotů RNA z lidské a vepřové hypofýzy (p = směsný, i = individuální materiál). Bylo použito 5 µg čisté mRNA v každé jamce a 3-konce 32P- značené oligonukleotidové sondy. Autoradiogram byl vyvíjen po 7 dnech.

Obr. 5

Kryořezy adenohypofýzy obarvené antisérem proti rekombinantnímu proteinu GST-AF-2. A. Řezy inkubované s imunním sérem ukazující rozptýlené buňky s různým stupněm pozitivní imunoreaktivity (plné šipky). Mnoho buněk není obarveno (světlé šipky). B. Postupné řezy k A inkubované s imunním sérem preabsorbovaným v přebytku rekombinantního proteinu GST-AF-2. Nedochází k žádnému specifickému obarvení buněk. C a D. Imunopozitivní buňky ve větším zvětšení ukazují obarvení cytoplazmy endokrinních buněk, kde n = jádro a c = cytoplazma.

Obr. 6

Biologická aktivita rAF-1 testující inhibici CT-indukované sekrece tekutiny. Rostoucí dávky proteinu byly potkanům podány i.v.; 3 µg CT byly vstříknuty do střevní kličky, po 5 h byla měřena akumulace tekutiny (mg/cm střeva). Každá hodnota reprezentuje střední hodnotu ± směrodatnou odchylku u skupiny šesti zvířat.

Obr. 7

Biologická aktivita intravenózně injikovaného rAF-1; 0,5 µg rAF bylo podáno 20–30 s před nebo 90 min po provokaci 3 µg CT do střevní kličky potkana.

Obr. 8

Biologická aktivita intraluminárně injikovaného rAF-1; 3 µg rAF byly podány 20–30 s před nebo 90 min po provokaci 3 µg CT do střevní kličky potkana; rAF byl injikován 5 cm proximálně od místa, kam byl aplikován CT.

Obr. 9

- A (x2,5) je kontrolní klička (PBS) ukazující buněčné zbytky v průsvitu (L) střeva, zbarvení na zbývající sliznici není patrné, což svědčí pro úplnou destrukci epitelální výstelky. B (0,5 μ l P1 před CT provokací) ukazuje jasně ohraničenou epitelální výstelku tvořící klky, což svědčí pro normální neporušenou sliznici. L = průsvit střeva. Čárka 500 μ m. C (x10) ukazuje destrukci sliznice v PBS–ošetřené kontrolní skupině a D znázorňuje sliznici střeva ve zkoumané skupině (podání P1). Černá šipka směřuje k epitelální výstelce, LP = lamina propria, mm = muscularis mucosa, světlá šipka směřuje ke kryptickým buňkám. Čárka = 100 μ m. E (x25) znázorňuje destrukci mukogy v kontrolní skupině (ošetřené/BS) a F ukazuje totéž v odpovídajícím zvětšení u potkana léčeného P1 před CT provokací. Čárka = 50 μ m.

Obr. 10

- 15 Fluorescence Evansovy modři (EB) ve vzorku jejunální kličky ze tří skupin potkanů ošetřených CT nebo kontrolním pufrem (PBS); předléčených antisekretorickým peptidem P1 nebo kontrolním pufrem (PBS). LP = lamina propria. Černá šipka směřuje k epitelální výstelce; světlá šipka směřuje ke kryptickým buňkám. Čárka = 100 μ m.

20 Obr. 11

Fluorescence Evansovy modři (EB) ve vzorku plexus choroideus od stejného potkana jako na obr. 10. Čárka = 50 μ m.

25

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

30

Protilátky proti AF připravenému pro klonování cDNA

- Antisekreční faktor byl připraven z vepřové krve pomocí afinitní chromatografie na agaróze a izoelektrickou fokusací. Do jednoho litru vepřové krve (obsahující antikoagulační látky) byl přidán 1 g thiosulfátu sodného a 1 mg fenylmethyl–sulfonylfluoridu. Krevní buňky byly separovány pomocí centrifugace a čistá plasma byla eluována přes kolonu se Sepharosou 6B (Pharmacia LKB Biotechnology Stockholm). Objem gelu odpovídal asi 10 % objemu roztoku. Po promytí pomocí trojnásobku objemu fosfátovým pufrem pufrovaného roztoku chloridu sodného (PBS = 0,15M NaCl, 0,05M fosfát sodný, pH 7,2) byla kolona eluována pomocí dvojnásobku objemu lože 1M roztokem alfa–methyl D–glukosidu v PBS. Eluát byl koncentrován a dialyzován vůči vodě v průtokovém ultrafiltru "Omega" (Filtron technology Corp.).

- Frakce byla poté frakcionována pomocí izoelektrické fokusace v amfolinu (Pharmacia). Gradient pH byl 4–6 ve 400 ml izoelektrofokusační koloně. Frakce mající izoelektrický bod mezi 4,7 a 4,9 byla sebrána a dialyzována proti PBS. Částečně čistý AF byl rozdělen na malé části a použit na produkci antisér u králíků výše popsanou metodou. Králíci byli imunizováni a kapacita séra byla otestována z hlediska schopnosti barvit intracelulární materiál v řezech lidské hypofýzy (metoda je popsána v příkladu 6). Jen jedno ze sér bylo specifické a barevně rozlišilo intracelulární části složky bez obarvení extracelulárních matrix proteinů. Toto antisérum bylo vybráno pro screening knihovny cDNA/lambda fág GT1 I z lidské hypofýzy expresí proteinů v E. coli.

Příklad 2

Screening cDNA knihoven z lidské hypofýzy a mozku

- 5 5'-úsek cDNA knihovny izolovaný z normální lidské hypofýzy a pocházející z tkání získaných od devíti bělochů byl zakoupen od Clontech Laboratories. Pro screening knihovny byly naočkované tágy v množství 3×10^4 PFU na 150 mm misku s *E. coli* Y1090. Výše popsané králíčí antisérum proti vepřovému AF bylo absorbováno v polovině objemu *E. coli* Y1090 lyzátu po 4 hodiny při 23 °C a rozředěno v poměru 1 : 400.

10

Screening probíhal podle Younga a Davise (Young, R.A. a Davis, R.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1 194–1 198.). S alkalickou fosfatázou konjugovaná kozí protikrálíčí protilátka byla použita jako druhá protilátka (Jackson). Byly vybrány pozitivní plaky, eluovány do fágového suspenzního média (20mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 2 % želatina), přeočkovány a podrobeny dalšímu screeningu, dokud nebyly všechny plaky pozitivní.

15

cDNA–reklonování– Fág DNA z AF rekombinantů byl izolován pomocí Wizard Lambda Preps (Promega) a štěpen pomocí EcoR1. Inerty byly čištěny pomocí soupravy Sephaglas BandPrep Kits (Pharmacia), reklonovány do pGex–1lambdaT vektoru (Pharmacia) tak, jak bylo popsáno výrobcem a transfekovány do buněk Epicurian Coli XL1– Blue, Top 1 nebo BL21 (všechny tři od firmy Stratagene. rAF nebo r peptidy byly připraveny v BL21 buňkách, pokud není uvedeno jinak.

20

Amplifikace cDNA pomocí PCR– Pro získání chybějící 5'-koncové cDNA bylo použito metody na bázi PCR zvané RACE (rapid amplification of cDNA ends). Modifikovaná RACE metoda, která generuje R'-RACE-Ready cDNA s kotevními oligonukleotidy napojenými na 3'-konci molekuly lidské mozkové cDNA byla zakoupena od Clontech Laboratories. 5'-Konec byl amplifikován z části 5'RACE-Ready cDNA ve dvou PCR amplifikačních krocích používajících 5'primery komplementární kotevnímu a dvěma genově specifickým (vnořené geny) 3'PCR primerům A a B (A = báze 429–411 a B = báze 376–359, obr. 1a). Různé menší části RACE fragmentu byly dále amplifikovány pro expresi odpovídajících peptidů a testování jejich biologických vlastností. Pozice báze a aminokyselin na počátku a na konci těchto oligonukleotidových fragmentů a jejich odpovídajících peptidů jsou ukázány v tabulce 1. Vepřový a hovězí cDNA (ClonTech Laboratories) byla použita jako templát pro amplifikaci fragmentů odpovídajících N3 v tabulce 1. Obměna této sekvence byla také uměle vložena pomocí místně orientované mutagenese. Při této metodě byly syntetizovány různé oligonukleotidy korespondující polohám 168–193 za účelem jednotlivého nahrazení aminokyselin v pozicích 35–42 (pozice jak jsou znázorněny v SEQ ID NO: 1). Amplifikovaný DNA fragment byl klonován do pGex–1lambdaT vektoru za použití místa EcoR1 zabudovaného do kotevního a genově specifického primeru. K ověření sekvence získané RACE metodou byla amplifikována dvouřetězcová cDNA z lidské hypofýzy a mozku (Clontech) pomocí dvojice příměrů C/D obsahující navíc štěpné místo EcoR1 (obr. 1b). Primery byly vytvořeny tak, aby umožnily amplifikaci celého otevřeného čtecího rámce (ORF). Produkty PCR z hypofýzy a mozku o očekávané velikosti byly štěpeny EcoR1 izolovány a klonovány do plazmidového vektoru pGex–1lambdaT.

35

40

45

DNA sekvenování a oligonukleotidy DNA z plazmidu pGex1lambdaT byla použita jako templát pro sekvenování vložených segmentů metodou dideoxyterminace řetězců za použití kitu Sequenase verze 2.0 (U.S. Biochemical Corp.). Počáteční dopředně a reverzní příměry kopírující oblasti pGex–1lambdaT bezprostředně před a za vloženou DNA byly získány od Pharmacia. Další příměry byly syntetizovány (Scandinavian Gene Synthesis AB) na bázi sekvenční informace. Byly sekvenovány tři různé PCR4 klony tak, aby nedošlo k výměně bází Tág polymerázou při 5'-RACE metodě.

50

Data nukleotidové sekvence a dedukované proteinové sekvence byla sestavena a analyzována pomocí programu MacVector 4.1 (Eastman Chemical Co.). K předpovědění odpovídajících

55

aminokyselinových sekvencí vložené cDNA bylo porovnáváno využití kodonů v různých čtecích rámcích. Tak byl získán jeden velký otevřený čtecí rámec. Vyšetřování sekvenčních dat DNA a proteinu bylo prováděno pomocí CD-ROM disku Entrez (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA).

5

Molekulární klonování a sekvenční analýza cDNA- Polyvalentní antiséra proti AF proteinu z vepře se použijí pro screening cDNA z lidské hypofýzy.

10

Byly izolovány dva klony exprimující imunoreaktivní AF, odděleny z fágu lambda a reklonovány do EcoR1 místa vektoru pGex-1lambdaT, jak je to popsáno v kitu od firmy Pharmacia. Pomocí restriční analýzy byly zjištěny velikosti inzertů 1100 a 900 bp. DNA sekvenování dvou klonů ukázalo úplnou homologii kromě jedné substituce (obr. 1, C nahrazující T v pozici 1011). Pomocí RACE metody byla získána sekvence předcházející 5' konci klonu Z. Fragment měl celkovou délku 376 bp (což nezahrnuje syntetické nukleotidové raménko u 5' konce). Úplná rekonstruovaná cDNA obsahovala 1309 párů bází následovaných póly A řetězcem, kterému předchází póly A signální řetězec (obr. 1, pozice 1289 – 1295). Otevřený čtecí rámec ORF 1146 bp byl nalezen v pozicích 63–1208.

15

20 Příklad 3

Expresce lidského AF proteinu z rekombinantních plazmidů

25

Konstrukce a čištění fúzních proteinů– Klony cDNA byly získány pomocí imunologického screeningu a pomocí PCR amplifikace úplné cDNA byly ligovány do pGex-1lambdaT. Tento vektor umožnil expresi cizích proteinů v E. Coli jakožto fúzních produktů k C konci Schistosoma japonicum 26kDa glutathion S-transferázy (GST), která může být afinitně purifikována za nadenaturačních podmínek pomocí kitu získaného od firmy Pharmacia. V krátkosti, noční kultury E. coli transformované rekombinantními pGex-1lambdaT plazmidy byly zředěny čerstvým médiem a kultivovány 3 h při 37 °C. Expresce proteinu byla indukována pomocí 0,1 mM IPTG (izopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosidu) a po 4 h růstu při 30 °C byly buňky peletizovány a resuspendovány v PBS. Buňky byly lyžovány ultrazvukem, ošetřeny 1 % Tritonem X 100–0 a centrifugovány při 12 000 x g po dobu 10 minut. Supernatant obsahující exprimované fúzní proteiny byl čištěn pasáží lyzátů přes glutathionovou agarózu (Pharmacia). Fúzní proteiny byly buď eluovány konkurenčně vzhledem k volnému glutathionu nebo byly štěpeny přes noc pomocí 10 U hovězího trombinu pro odstranění AF proteinu z GST afinitního řetězce. Celá metoda používající pGex plazmidu a purifikace rekombinantních proteinů nebo peptidů byla prováděna za použití kitu dodaného od firmy Pharmacia.

30

35

40

Sekvence a velikost rekombinantních AF proteinů– Pro potvrzení kódující sekvence byl izolován transkript o celé délce za použití PCR– amplifikace hypofyzální a mozkové cDNA. Pomocí páru primerů C/D, bylo izolováno 1215 bp identických se sekvencí klonu-4 (obr. 1). ORF kódoval 382 aminokyselin s vypočtenou molekulární hmotností 41,14 kDa a vypočtenou hodnotou pI–4,9.

45

50

AF klony 1,2 a 3 a oligonukleotidy N1–5 (obr. 1 a tabulka 1) byly ligovány do pGex-1lambdaT plazmidového vektoru tak, že ORF byl v rámci s proteinem glutathion S-transferázou (GST). Konstrukty byly transformovány do E. coli a exprese fúzních proteinů byla indukována pomocí IPTG. Čištěné fúzní proteiny a trombinem rozštěpený AF protein nebo peptid byly podrobeny analýze SDS–PAGE a Western blotu za použití antiséra proti vepřovému antisekrečnímu faktoru (obr. 2). Obarvením proteinů pomocí modři Coomassie brilliant blue byly identifikovány diskrétní pásy každého proteinu kromě proteinu GST–AF–1, což ukázalo degradaci na menší komponenty.

55

Syntéza peptidů na pevné fázi– Menší peptidy (P7–P18 v tabulce 1) byly vytvořeny na pevné fázi (K.J. Ross- Petersen AS) v peptidovém syntetizátoru Applied Biosystems. Čistota každého

peptidů byla 93–100 % podle hodnocení HPLC na reverzní fázi Deltapak C18, 300 a za použití lineárního gradientu 0,1 % trifluoroctové kyseliny ve směsi voda/acetonitril.

5 Sekvenování aminokyselin– Analýza proteinových sekvencí byla provedena za účelem ověření identifikace ORF. Čisté AF proteiny byly zpracovávány na 10 % gelu macro–slab SDS–PAGE a přeneseny na membránu Problot (Applied Biosystems) pomocí elektroblotování (Bio–Rad). Skvrny byly zviditelněny pomocí barvením Ponceau S, vyříznuty z blotu a prvních 20 amino-

10 kyselin proteinu bylo sekvenováno pomocí automatizované Edmanovy degradace na automatickém sekvenovači (Applied Biosystems).
Byly stanoveny N–terminální sekvence klonu–2 a 3 a ukázalo se, že aminokyseliny jsou v dobrém souhlasu s aminokyselinami 63–75 a 130–140 předpovězené sekvence (obr. 1).

15 Porovnání s jinými proteinovými sekvencemi dostupnými v GenBank ukázalo, že sekvence rAF je unikátní (obr. 1) ve všech svých částech a žádné podobné sekvence nebyly oznámeny.

20 Prvních deset zbytků proteinů se ukázalo jako relativně hydrofobních při analýze podle Kyte–Doolittle a může tvořit signální peptid, který je odštěpen ještě před exocytózou proteinu. Tato interpretace je podpořena analýzami Western blot (obr. 3), při nichž se zdá, že tento rekombinantní protein má o něco vyšší molekulární hmotnost než protein extrahovaný z hypofýzy.

Tento rozdíl může jít částečně na vrub 5 přídavných aminokyselin obsažených v rekombinantním proteinu, které vytvářejí trombinové rozštěpitelné místo fúzního proteinu.

25 Příklad 4

Produkce a testování antiséra rAF

30 Antiséra proti rekombinantnímu GST–AF fúznímu proteinu– V organismu králíka byly vytvořeny protilátky proti čistěným fúzním proteinům GST–AF–1, GST–AF–2 a trombinem štěpenému čistému AF1 proteinu (rAF) pro použití v ELISA, Western blotu a imunohistochemických studiích. Každému králíkovi bylo podáno 100 µg antigenu v 1 ml PBS smíšeného se stejným objemem Freundova kompletního adjuvans. Každá imunizace byla rozdělena do 8–10

35 dávek injikovaných do hřbetu intrakutánně. Dvě udržovací dávky o 50 µg antigenu byly injikovány ve třetím a pátém týdnu, přičemž ta poslední byla bez Freundova kompletního adjuvans.
Králíkům byla odebrána krev 6. den po poslední udržovací dávce a oddělené sérum bylo skladováno při –20 °C. Citlivost antiséra byla testována pomocí dot–blot zkoušky. Protein GST–AF–2 byl amplifikován na ECL nitrocelulózové membráně při zředění 1 : 5 a antisérum bylo zředěno v poměru 1 : 1000. Membrána byla blokována pomocí 1 % hovězího sérového albuminu (BSA) v PBS při 4 °C po dobu 16 hodin a potom inkubována po dobu 1,5 hodiny pomocí 1 : 800 ředěného králíčího anti GST AF nebo vepřového antiséra. Blot byl vyvinut pomocí konjugátu alkalické fosfatázy a kozího a protikrálíčího imunoglobulinu a následně pomocí brom–4–chlor–3–

45 indolylfosfátu a p–nitro–modř tetrazolia (Boehringer Mannheim). V případě tohoto testu byl odhadovaný limit pro detekci antigenu okolo 1 ng.
Elektroforéza na SDS–polyakrylamidovém gelu a imiflunobloting– Elektroforéza na SDS–polyakryl–amidovém gelu (SDS–PAGE) extraktů z lidské a vepřové hypofýzy a čistých AF proteinů byla prováděna na 10 % akrylamidovém gelu minislab, v podstatě jak je to popsáno v Laemmli (Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680–685) s modifikací, že bis–akrylamid jako síťovadlo byl nahrazen N,N'–diallyltartardiamidem v odpovídajícím molárním množství. Pyronin Y (Sigma) byl použit jako marker čela elektroforézy. Předem barevně označené etalony molekulové hmotnosti byly nakoupeny od BDH. Každý protein byl potom obarven pomocí Coomassie brilliantové modři nebo elektroforeticky přenesen na ECL nitrocelulózu s 0,45 mm velkými póry

(Amersham) pro imunoblotování. Následující inkubace pomocí BSA, konjugovaného anti-IgG a substrátu alkalické fosfatázy byly stejné jako pro dot-blot zkoušku popsanou výše.

5 Jak bylo výše zmíněno, obarvení Coomassie Brilliant modří nevytvořilo žádný oddělený pás GST-AF-1 proteinu, pravděpodobně v důsledku proteolytické degradace na menší složky. Při Western blot analýze poskytl protein o úplné délce mnohem silnější signál než degradované produkty (obr. 2b). Silná reakce s antisérem proti vepřovému AF ukázala, že rekombinantní proteiny měly opravdu stejnou imunoreaktivitu jako AF. Molekulová hmotnost proteinu o úplné délce byla asi 60 kiloDalton (kDa), což je hodnota vyšší než skutečná molekulová hmotnost 10 41139 Dalton (Da) odhadnutá na základě aminokyselinového složení.

Proteiny byly dále imunoblotovány a testovány s antisérem vyvinutým proti GST-AF-2, které váže trombinem rozštěpené proteiny (obr. 3).

15 Antisérum proti rekombinantnímu GST-AF-2 reagovalo s přírodním AF proteinem o zdánlivé molekulové hmotnosti 60 kDa a s některými menšími složkami, pravděpodobně produkty enzymatické degradace (obr. 3a).

20 ELISA pro určení koncentrace AF- Při testu ELISA bylo použito anti-AF-1 a anti-AF-2 podle výše popsané metody (Zachrisson, G., Largergard, T. a Lonnroth, I. (1986) Acta path. Microbiol. Immunol. Scand. C, 94,227-231). Jak je ukázáno na obr. 3b, citlivost tohoto testu se surovým antisérem byla mezi 1-10 µg proteinu, zatímco test s afinitně čištěnými protilátkami měl citlivost mezi 5-50 µg proteinu.

25

Příklad 5

Northern blot analýza RNA z hypofýzy

30 Northern blot analýza- Lidské hypofýzy byly získány postmortem z nemocnice Sahlgrenska (se svolením komise Swedish Health and Welfare Board, paragraf 2 transplantationslagen, 1975 : 190). RNA byla z hypofýzy extrahována pomocí guanidinium thiokyanátu podle Chomczynskiho a Sacchiho (Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987), Analyt. Biochem. 162, 156-159) Polyadenylovaná RNA byla selektována pomocí komerčního kitu (Pharmacia) za použití kolon s oligodT-celulózou. Dále bylo použito směsné lidské hypofyzální mRNA od 35 107 dárců odkoupené od Clontech. Každý vzorek o 5 µg póly (A+)RNA byl ošetřen glyoxalem a podroben elektroforéze na 1,2 % agarozovém gelu (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning a laboratory manuál, str. 7.40-7.42, Cold spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Po proběhnutí tříhodinového kapilárního alkalického přenosu 40 v 0,05 M NaOH na Hybond N+ nylonové membrány (Amersham) proběhla prehybridizace a hybridizace během 24 h vždy při 42 °C. Hybridizační roztok obsahoval 50 % formamidu, 5xSSPE, 10xDenhardův roztok s 250 µg/ml denaturované nízkomolekulární DNA a 50 µg/ml polyadenylové kyseliny. Bloty byly testovány pomocí čtyř různých antisenze 28 bp oligo- 45 nukleotidů obsahujících pozice 132-105 (příměř E), 297-270 (primer F), 748-721 (příměř G) a 833-806 (primer H) sekvence (obr. 1). Tyto sondy byly na 3'-konci označeny terminální transferázou (Boehringer Mannheim) plus (alfa³²P) ddATP (Amersham) a čištěny na kolonách Nick (Pharmacia). Pět přidavných promývacích cyklů pomocí 5xSSPE/0,1 % SDS- 50 0,5xSSPE/0,1 % SDS bylo provedeno při 42 °C, každý 30 minut s opakováním posledního promývání. Filtry byly exponovány na Hyperfilm MP (Amersham) po dobu sedmi dnů.

50

Expres v hypofýze- Northern blot analýzy byly provedeny se směsí čtyř oligonukleotidových sond, které hybridizovaly s různými sekvencemi podél klonované cDNA. SONDY hybridizovaly s jediným pásem mRNA, která byla separována z hypofýzy, o délce asi 1400 bp. Nejsilnější signály byly získány z humánního materiálu, ale vepřový materiál také vykazoval křížovou 55 reakci.

Příklad 6

5 Distribuce AF v řezech hypofýzy

Druh a tkáň– Lidské hypofýzy byly získány postmortem v nemocnici Saigrenska (se svolením komise Swedish Health and Welfare Board, paragraf 2 Transplantationslagen, 1975 : 190). Žlázy byly zmrazeny na -70°C a tak uchovávány, kromě těch, které byly použity pro histologické zkoušky. Ty byly fixovány 24 h ve 4 % paraformaldehydu rozpuštěném ve fosfátem–pufrovaném roztoku chloridu sodného (PBS = 0,15M NaCl, 0,05 M fosfát sodný, pH = 7,2) a poté byly přemístěny do 7,5 % sacharózy v PBS. Hypofýzy z vepřů o stáří 5 až 7 měsíců získané na jatkách byly během transportu a až do doby použití umístěny na suchém ledu při -70°C . Potkani Sprague–Dawley pro biologické zkoušky, 2–3 měsíce starší, byli získáni od firmy B&K Universal AB, Sollentuna, Švédsko. Králíci (New Zéland White) pro imunizaci byli získáni od firmy Lidköping Kaninfarm, Švédsko.

Immunohistochemie– Fixované hypofýzy byly zmrazeny v tekutém dusíku a byly připraveny 7 μm tlusté kryo–řezy. Z každého vzorku bylo připraveno 5–10 řezů, které obsahovaly různé části žlázy. Řezy byly upevněny na mikroskopická sklíčka. Vzorky byly blokovány 5 % odtučněným sušeným mlékem a inkubovány s primárním králičím antiserem (anti–GST–AF–2 fúzní protein), zředěny 1 : 4000–1 : 8000 ve vlhké komoře přes noc při 4°C . Po promytí v pufru byly vzorky inkubovány jednu hodinu při 23°C s alkalickou fosfatázou konjugovanými vepřovými antikráličími imunoglobuliny a zředěnými v poměru 1 : 5 (Dako A/S). Imunoreakce byly vizualizovány pomocí fosfatázových substrátů jak byl popsáno jinde (Jennische, E., Matjka, G.L. (1992) Acta Physiol. Scand. 146,79–86) Kontrolní vzorky byly inkubovány s imunním sérem absorbovaným s přebytkem GST–AF–proteinu nebo s produkty všech inkubačních kroků kromě primárních protilátek.

30 Distribuce AF v řezech hypofýzy– Distribuce AF v řezech lidské hypofýzy byla studována pomocí imunohistochemických technik (obr. 5). Ve všech vyšetřovaných vzorcích bylo obarveno určité množství buněk adenohypofýzy. Imunohistochemický materiál byl lokalizován v granulích v cytoplasmě. Signál byl zrušen preabsorpcí imunního séra a přebytkem GST–AF–2 proteinu. Žádné zbarvení nebylo pozorováno v zadních částech žlázy (neurohypofýze).

35 Distribuce imunoreaktivního materiálu v hypofýze ukázala výhradně intracelulární distribuci AF v sekrečních buňkách předního laloku hypofýzy (adenohypofýzy). Mezi proteiny uvolňované z tohoto laloku patří růstový hormon, thyreotropin, kortikotropin, prolaktin a luteinizační hormon. Pasáž těchto hormonů z intracelulární lokalizace do vaskulárního systému je spouštěna uvolňovacími faktory, které jsou produkovány neuroendokrinními buňkami v hypothalamu.

Příklad 7

45 Biologická aktivita rAF

Antisekreční aktivita– Antisekreční aktivita byla měřena na modelu intestinální kličky potkana, popsaném již dříve (Lange, S. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 239–242). Jejunalní klička byla intoxikována 3 μg cholera toxinu. Různé dávky čištěného AF–1– proteinu nebo BPS (kontrola) byly injikovány před nebo po provokaci cholera toxinem. Hmotnost akumulované tekutiny v intestinální kličce (ng/cm) byla měřena po pěti hodinách. Každý vzorek AF byl testován nejméně na šesti potkanech. Fisherův PLSD byl použit pro statistickou analýzu získaných dat.

55 Biologická aktivita rAF proteinu– Biologická aktivita čistého rAF proteinu klonu–1 produkovaného v E. coli byla testována na potkanu, jako modelu. Kapacita rAF inhibovat sekreci

intestinální tekutiny po i.v. injekci podané 20–30 s před intestinální intoxikací cholera toxinem je zřejmá z obr. 6. U kontrolních zvířat, kterým byl podán pouze pufr, způsobil cholera toxin výraznou sekreci 412 ± 9 mg tekutiny na cm střeva. Čistý rAF způsobil na dávce závislou inhibici sekrece, která byla významně rozdílná od výsledků získaných po podání pouze pufru ($p < 0,01$, $n = 6$). Devět ng proteinu klonu-1 stačí k redukci odpovědi na 34 %, zatímco 44 ng ($44 \cdot 10^{-12}$ mol) a 220 ng redukuje odpověď na 46 % a 78 %. Biologická aktivita rekombinantního AF je větší než jakéhokoliv doposud známého enterotoxinu, a větší než aktivita jakéhokoliv neurohormonu nebo intestinálního hormonu nebo neuropeptidu regulujícího transport vody a elektrolytu. Kromě toho hodnota aktivity lidského rAF u potkana je překvapivě vysoká, což pravděpodobně odráží všudypřítomnost struktury konzervované v rAF molekulách z různých druhů. Tato hypotéza je podpořena skříženou reaktivitou mezi lidským a vepřovým vzorkem zjištěnou při analýze Western blot a Northern blot.

Byla porovnávána kapacita 0,5 μ g rAF inhibovat intestinální sekreci po i.v. injekci podané 20–30 s před a 90 minut po intoxikaci cholera toxinem (obr. 7). Oba způsoby podání měly značný inhibiční účinek oproti kontrolám ($p < 0,01$, $n = 6$).

Na rozdíl od přírodního AF, rekombinantní protein byl účinný i v tom případě, že byl podán po provokaci toxinem, což jej činí užitečným při léčení průjmu.

3 μ g rAF byly indikovány do 8–10 cm dlouhé střevní kličky umíšené bezprostředně proximálně, vzhledem ke střevní kličce, která byla intoxikována toxinem cholery. rAF byl indukován 20–30 s před nebo 90 min po intoxikaci cholera toxinem. Na obr. 8 je ukázáno, že v obou zkoušených skupinách došlo ke značné redukci sekrece tekutiny ($p < 0,01$, $n = 6$) a nebyl pozorován žádný rozdíl mezi nimi. Tento experiment ukazuje, že rAF je aktivní po perorálním podání a může být použit v krmivu jako aditivum a nemá žádné silnější vedlejší účinky.

V příkladech popsanych výše byl rAF produkován v buňkách *Epicurian coli* XL-1. V těchto buňkách byla velká část produkovaného rAF degradována na menší peptidy. Pokud byl rAF produkován v buňkách BL21, jen jeho malá část byla degradována a v buňkách Top 1 nedošlo vůbec k žádné degradaci. Překvapivě byla biologická aktivita úměrná rozsahu degradace. Tzn. vyšší degradace byla spojena s vyšší aktivitou. Z těchto důvodů byly i různé menší fragmenty, které vznikly, testovány na možnou biologickou aktivitu.

Jak je ukázáno v tabulce 1, byly tyto fragmenty testovány i v podáním před intoxikací cholera toxinem stejným způsobem, jak je to popsáno výše pro intaktní rAF. Peptidy exprimované klonem 2 a 3 byly testovány v množství 0,1, 1 a 10 μ g a neměly žádný efekt na účinek toxinu. Naproti tomu 1 μ g peptidů exprimovaného pomocí RACE fragmentu (klon 4) měl značný efekt. Z RACE fragmentu bylo vytvořeno mnoho kratších konstruktů a exprimováno v pGex-1 λ . Aktivní místo bylo nalezeno v poloze mezi aminokyselinovými zbytky 35–51, jak je ukázáno v tabulce 1. Ve snaze určit přesněji aktivní místo byly vytvořeny tři malé peptidy pomocí metody syntézy na pevné fázi. Dva z nich byly aktivní -peptid 35–46 (P3) a peptid 35–42 (P1). Posledně zmíněný oktapeptid IVCHSKTR (P1) byl aktivní v dávce menší než 1 ng a byl ve stejném molárním množství téměř stejně účinný jako intaktní rAF. Naproti tomu kratší hexapeptid VCHSKT (P2) neměl žádný účinek, pokud byl podán v dávce mezi 1 ng a 10 μ g.

Peptid X1VCX2X3KX4R odpovídající s určitými změnami a/nebo delecemi lidskému fragmentu P1 byl také vytvořen místně orientovanou mutagenézí a byla testována jeho biologická aktivita. Byly také srovnány sekvence z hovězí a vepřové cDNA. Tyto studie ukázaly následující změny a/nebo delece:

X1 je I nebo není zastoupen,

X2 je H, R nebo K,

X3 je S, L nebo jiná neutrální aminokyselina,

X4 je T nebo A.

5

Tabulka 1

Kód	*Oligonukleotid	**Peptid	***Inhibice CT sekrece pmol ED50	
N1	63–301	1–80	+	4
N2	168–301	36–80	+	6
N3	168–215	36–51	+	3
N4	122–170	21–36	–	
N5	186–269	42–69	–	
P3	S.P.S****	35–46	+	7
P1	S.P.S.	35–42	+	5
P2	S.P.S.	36–41	–	

10 * Pozice párů bází v SEQ ID číslo 1, která byla exprimována v konstruktu vytvořeném z AF cDNA a pGex-1-lambda.

** Pozice aminokyselinových zbytků (SEQ ID č. 1) v AF na začátku a na konci syntetizovaného peptidu.

15 *** U aktivních peptidů byla zaznamenávána inhibice cholera toxinem indukované sekrece tekutiny v sešité střevní kličce potkana, u účinných peptidů je uvedeno jejich množství (pmol) inhibující polovinu maximální sekrece (ED50).

**** Tyto peptidy byly produkovány syntézou na pevné fázi.

20 Vliv rAF na zánět střevní sliznice byl také testován na modelu střevní kličky potkana. Dvaceti potkanům bylo podáno 0,5 µg toxinu A z *Glostridium difficile* (Torres, J.F., Jennische, E., Lange, S. a Lonnroth, I. (1990) Gut 781–785.) a sekretovaná tekutina a zánět byl měřen po 2,5 a 5 h (10+10 potkanů). Polovina potkanů v každé skupině dostala 100 ng i.v. 30 s před podáním toxinu a druhá polovina dostala PBS pufr jako placebo. Po usmrcení potkanů byly střevní kličky rozříznuty a střední 2–3 cm část kličky byla zmrazená na suchém ledě. Zmrazené vzorky byly nařezány v Leica kryostatu na 8 µm řezy. Řezy byly obarveny pro demonstraci alkalických fosfatáz pomocí enzymatické histochemie. Alkalické fosfatázy jsou exprimovány v intestinálních epiteliálních buňkách a barvení umožňuje stanovit integritu střevního epitelu. Z výsledků je patrno (obr. 9), že u kontrolních potkanů došlo k velmi rozsáhlému poškození intestinální sliznice: po 2,5 hodinách byly epitelové buňky odděleny od základní membrány a byla pozorována nekrotická tkáň, dále bylo po 5 hodinách zjištěno rozsáhlé krvácení. Naproti tomu u zvířat, kterým byl podán rAF, nedošlo k žádnému oddělení epiteliálních buněk, nekróze nebo krvácení. Sekrece tekutiny indukovaná toxinem A byla inhibována ze 199 ± 4 na 137 ± 5 mg/cm po 2,5 h (p < 0,01) a z 421 ± 3 na 203 ± 6 mg/cm po 6 h (5 potkanů na skupinu, p < 0,01).

35 Stejný experiment byl proveden s 0,5 µg peptidů IVCHSKTR (=P1) místo rAF proteinu. Tento oktapeptid měl stejný vliv na toxinem A indukovaný intestinální zánět a sekreci tekutiny, jak je ukázáno na obr. 9.

40

Toxicita– Pro test toxicity byl rAF injikován ve vysoké dávce 50 µg na potkana. Nebyly zjištěny žádné zřejmé toxické reakce během období jednoho týdne.

Příklad 8

Biologická aktivita rAF na intestinální permeabilitu

- 5 Pro vyhodnocení vlivu rAF na permeabilitu organické látky rozpuštěné v krvi byl proveden pokus s barvivem Evansova modř (EB) podle dříve popsané metody (Lange, S., Delbro DS, Jannische, E., Evans Blue permeation of intestinal mucosa in the rat. Scand. J. Gastroenterol 1994, 29 : 38–46.). Experiment byl zpočátku proveden tak, jak je popsáno v příkladu 7 a obr. 5 a to i.v. podáním rAF před intoxikací cholera toxinem (CT). Nebyla však měřena sekrece
- 10 tekutiny, nýbrž po 90 min po provokaci toxinem bylo i.v. podáno barvivo EB, a to 1 ml 1,5% roztoku v PBS. Barvivo cirkulovalo po dobu 5 min v organismu. Po této době byli potkani transkardiálně perfundováni přes levou komoru a pravou síň (byla použita peristaltická pumpa–Cole Parmer Instruments, Chicago, Ill., USA) pomocí roztoku 200 ml PBS/Alsevierovo činidlo (1/1 poměr) o teplotě 4 °C po dobu 150 s. Vše probíhalo v etherové anestezii. Tak byla odstraněna
- 15 všechna Evansova modř (EB) přítomná ve vaskulárním systému a ponechána byla pouze EB v intestinální tkáni pro detekci barviva extrakcí formamidem.

- Výsledky v tabulce 2 ukazují, že CT- provokace signifikantně zvyšuje ($p < 0,001$) množství EB, které může být extrahováno z intestinální tkáně o asi 43 %, zatímco i.v. podání 1 BrT před
- 20 CT-intoxikací zabraňuje tomuto nárůstu a množství EB extrahované z tkáně ve skupině 1 (kontrola) se nelišilo od skupiny 3 (1rAF + CT).

Tabulka 2

25

Skupina	Provokace	ng	EB/g int. tkáň $\times 10^{-7}$	% zvýšení EB–konc
1	PBS + PBS	6	$29,3 \pm 1,0$	
2	PBS + CT	6	$51,8 \pm 1,3$	43 (p 0,01)
3	1rAF + CT	6	$29,6 \pm 1,5$	0 NS

- Výsledky z obr. 10 a 11 ukazují extravazaci barviva EB v tenkém střevě a v odpovídajícím plexus choroideus z laterální komory mozku po CT–provokaci střeva s nebo bez předchozí
- 30 terapie potkanů pomocí P1 (IVCHSKTR).

- Experimenty byly prováděny následujícím způsobem: Samci potkana Sprague–Dawiey, o hmotnosti 350 g, byli ponecháni o hladu po 18 hodin před začátkem experimentu, ale měli volně přístupný zdroj vody. Potkani byli rozděleni do skupin po šesti. Peptid P1, cholera toxin (CT) a PBS byly podávány podle tabulky 3.
- 35

Tabulka 3

Skupina	i.v. ing. 1+	p.o. inj.	I.v. inj. 2+
A	P1	CT	EB
B	PBS	CT	EB
C	PBS	PBS	EB

- 40 + P1 i.v. injekce 1 byly podány v objemu 2 ml PBS, p.o. injekce roztoku EB v objemu 5 ml; i.v. injekce 2 se skládala z 1,5 ml 3% roztoku EB v PBS. Ether byl použit jako anestetikum během injekčních podávání.

- I.v. injekce P1 (0,5 μ g) nebo PBS byly podány 10–15 s před p.o. provokací 100 μ g CT nebo
- 45 PBS. 60 min po perorální provokaci byli potkani uvedeni do anestezie pomocí etheru a i.v. jim

bylo podáno barvivo EB. Barvivo bylo ponecháno ekvilibrovat dalších 30 min. Po této době bylo potkanům podáno znovu anestetikum (ether) a potkani byli perfundováni intrakardiálně přes levou komoru pomocí 250 ml roztoku Alseverova činidla v PBS=50/50 tak, aby bylo odstraněno všechno barvivo přítomné ve vaskulárním systému. Po této perfúzi, která proběhla během 2–3 min, bylo možno pomocí fluorescenční registrace detekovat jen barvivo navázané mimo vaskulární systém.

Z mozku a části tenkého střeva byly odebrány vzorky a zmrazený na suchém ledu a v kryostatu byly nařezány 8 µm tlusté řezy. Tyto řezy byly vysušeny vzduchem, umístěny v médiu s xylenem a pozorovány v Zeissově fluorescenčním mikroskopu za použití kombinace filtrů, která je používána u fluorescence emitované rodaminem.

Výsledky na obr. 10 a 11 demonstrují, že intenzita fluorescence (bílá barva) je podobná v obou vzorcích – v tenkém střevě (obr. 10) i plexus choroideus (obr. 11) ve skupině A (P1 i.v. + CT p.o.) a C (PBS i.v. + PBS p.o.). Ve srovnání s vysokou fluorescenční intenzitou v tenkém střevě a v plexus choroideus ve skupině B (PBS i.v. + CT p.o.), výsledky jasně demonstrují, že injekce oktapeptidu před provokací CT inhibuje CT-indukovanou extravaskulární penetraci EB. Výsledky ukazují, že to platí nejenom pro vaskulární systém tenkého střeva, ale i pro plexus choroideus v laterální komoře mozku.

Závěrem: Efekt i.v. podaného oktapeptidu IVCHSKTR inhibuje CT-indukovanou extravaskulární penetraci barviva EB v tenkém střevě stejně tak, jako v plexus choroideus v centrálním nervovém systému. Účinek rAF a jeho peptidových derivátů nenacházíme tedy pouze v tenkém střevě, ale ovlivňuje i permeabilitu cév v centrálním nervovém systému. Tato zjištění ukazují, že rAF a jeho deriváty mohou být použity i k odstranění patologického intrakraniálního tlaku, změny tlaku ve středním uchu a různých forem změn permeability.

Použitá literatura

1. Young, R.A. a Davis, R.W. (1983) Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 80, 1194–1198.
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manuál, str. 1.74–1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
3. Frohman, M. A., Dush, M.K. a Martin, G.R. (1988) Proc. Nati. Acad. Sci., USA 86, 8998–9002.
4. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680–685.
5. Zachrisson, G., Largergard, T. a Lonnroth, I. (1986) Acta path. Microbiol. Immunol. Scand. C, 94, 227–231.
6. Chomoczynski, P., Sacchi, N. (1987), Análys. Biochem. 162, 156–159.
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning laboratory manual, str. 7.40–7.42, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
8. Jennische, E., Matjka, G.L. (1992) Acta Physiol. Scand. 146, 79–86.
9. Lange, S. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 239–242.
10. Torres, J.F., Jennische, E., Lange, S. a Lonnroth, I. (1990) Gut 781–785.
11. Lange, S., Delbro DS, Jannische, E., Evans Blue permeation of intestinal mucosa in the rat. Scand. J. Gastroenterol 1994, 29: 38–46.

Legenda k obrázkům

Obr. 1a a dále obr. 1b.

5

Sekvence nukleových kyselin a odpovídající aminokyselinové sekvence nového lidského proteinu.

Obr. 1c.

10

Horizontální mapa ukazující klonovanou cDNA a oligonukleotidové primery.

Obr. 2. Coomassie modře zbarvený SDS-polyakrylamid minigel (A) a imunoblotová proba s antisérem proti části AF (B). Linie s neprimerovými čísly obsahuje glutathion-agaróza-čištěnou GST-AF fúzi proteinů AF-1, AF-2 a AF-3, dále linii s primerovými čísly obsahující fúzi proteinů rozštěpenou trombinem. Nalevo jsou uvedeny molekulové hmotnosti (R), (BDH). GST-AF-1 fúze proteinu je vysoce degradována, ale imunoblot ukazuje jen detekci celé délky proteinu a spontánních produktů trombinového štěpení. V GST-AF-3 je 26 kDa protein, pravděpodobně konec glutathion S-transferázy, který je nezávisle exprimován.

20

Obr. 3a. Western blot používající antisérum proti rekombinantnímu proteinu AF-2. Byly použity tyto složky: nalevo porcín (P) a tři lidské hypofýzy (H1, H2, H3) a napravo tři rekombinantní proteiny AF-1, AF-2 a AF-3 (Obr. 2). V centrální části standarda molekulární hmotnosti (R).

Obr. 3b. ELISA u rAF používající antisérum a afinitně čištěné protilátky vyrobené v těle králíka.

Obr. 4. Autoradiogram Northern blotu RNA z lidské a vepřové hypofýzy (p = pooled, i = individualit, materiál). Bylo použito 5 ug čisté mRNA v každé bázi, 3'-koncové oligonukleotidové próby značené ³²P byly použity a autoradiograficky vyvíjeny po 7 dní.

30

Obr. 5. Kryorezy z adenohypofýzy značené s antisérem proti rekombinantnímu proteinu GST-AF-2. A. Řezy inkubované s imunním sérem ukazující buňky s různým stupněm imuno-reaktivity (silné šipky). Mnoho buněk postrádá značení (světlé šipky). B. Různé řezy k A inkubované s imunním sérem preabsorbovaným s přebytkem rekombinantního GST-AF-2. Zde není žádné specifické značení buněk. C a D. Značná imunosenzitivita buněk je znázorněna znázorněním cytoplazmy endokrinních buněk, kde n = nukleus a c = cytoplazma.

35

Obr. 6. Biologická aktivita rAF-1 testující inhibici CT-indukované sekrece tekutiny. Rostoucí dávky proteinu byly krysám podány i.v. 3 µg CT byly podány do střevní kličky, po 5 h byla měřena akumulace tekutiny (mg/cm střeva). Každá hladina reprezentuje hlavní S.A.E. +/- skupiny šesti zvířat.

40

Obr. 7. Biologická aktivita intraluminárně injikovaného rAF-1; 0,5 µg rAF byl podán 20-30 sec před nebo 90 min po intoxikaci 3 µg CT do střevní kličky krysy.

45

Obr. 8. Biologická aktivita intraluminárně injikovaného rAF-1; 3 µg rAF byly podány 20-30 sec před nebo 90 min po intoxikaci 3 µg CT do střevní kličky krysy; rAF byl injikován 5 cm proximálně od místa, kam byl aplikován CT.

Obr. 9. A (x2.5) je kontrolní klička (PBS) ukazující celulární zbytky uvnitř lumen (L), značení na zbývající sliznici není patrné, což svědčí pro úplnou destrukci epitelu. B (0,5 µl P1 před CT podáním) ukazuje jasně epitelie tvořící villi, což svědčí pro normální neporušenou sliznici. L=lumen střeva. Čárky 500 µm. C (x10) ukazuje destrukci epitelu v PBS-ošetřené kontrolní skupině a D znázorňuje sliznici střeva ve zkoumané skupině (podání P1). Černá tečka označená šipkou v epitelu, LP=lamina propria, mm=muscularis mucosae, světlá šipka na buňkách krypt.

55

Čárky =100 μ m. E (x25) znázorňují destrukci mukózy v kontrolní skupině (ošetřené PBS) a F ukazuje odpovídající výsledky ze skupiny krys ošetřených P1 před CT podáním. Čárky =100 μ m.

5 Obr. 10. Fluorescence Evans Blue ve vzorku jejunální kličky ze tří skupin krys ošetřených CT nebo kontrolním pufrem (PBS); prošetřených antisekretorickým peptidem P1 nebo kontrolním pufrem (PBS). LP=lamina propria. Černá šipka znázorňuje epitelie; světlá šipka ukazuje buňky krypt. Čárky = 100 μ m.

10 Obr. 11. Fluorescence Evans Blue ve vzorku plexus choroideus od krys znázorněných na obr. 10. Čárky = 50 μ m.

15 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology, nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.
- 20 2. Fragment podle nároku 1, který je vybrán ze skupiny zahrnující: a) aminokyseliny č. 35 až 42, b) aminokyseliny č. 35 až 46, c) aminokyseliny č. 36 až 51, d) aminokyseliny č. 36 až 80 a e) aminokyseliny č. 1 až 80 aminokyselinové sekvence znázorněné v SEQ ID NO: 1.
- 25 3. Peptid $X_1VCX_2X_3KX_4R$ odpovídající fragmentu, který obsahuje aminokyseliny č. 35 až 42 rekombinantního proteinu znázorněného v SEQ ID NO: 1, kde X_1 je I nebo není zastoupen, X_2 je H, R nebo K, X_3 je S, L nebo jiná neutrální aminokyselina a X_4 je T nebo A.
- 30 4. Protilátka specifická vzhledem k proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homologům nebo fragmentům, které mají antisekreční aktivitu.
- 35 5. Kompozice pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u zvířat, včetně člověka, **vyznačující se tím**, že jako aktivní složku obsahuje účinné množství rekombinantního proteinu znázorněného v SEQ ID NO: 1 nebo jeho homologů nebo fragmentů, které mají antisekreční aktivitu.
- 40 6. Kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že fragment je vybrán ze skupiny zahrnující a) aminokyseliny č. 35 až 42, b) aminokyseliny č. 35 až 46, c) aminokyseliny č. 36 až 51, d) aminokyseliny č. 36 až 80 a e) aminokyseliny č. 1 až 80 aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 1.
- 45 7. Použití rekombinantního proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homologů nebo fragmentů, které mají antisekreční aktivitu, pro výrobu kompozice pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u zvířat, včetně člověka.
- 50 8. Krmivo pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u obratlovců, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou přísadu rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology, nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.
- 55 9. Krmivo pro normalizaci patologického transportu tekutin a/nebo zánětlivých reakcí u obratlovců, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou přísadu rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus schopný produkovat rekombinantní protein, kterýžto protein má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology, nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.

- 5 **10.** Použití protilátky specifické vzhledem k rekombinantnímu proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homologům nebo fragmentům, které mají antisekreční aktivitu, při in vitro zkouškách pro detekci uvedeného proteinu nebo jeho homologů nebo fragmentů.
11. Nukleová kyselina kódující rekombinantní protein, který má sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology nebo fragmenty vykazující antisekreční aktivitu.
- 10 **12.** Nukleová kyselina podle nároku 11, kde kódované fragmenty jsou vybrány ze skupiny zahrnující: a) aminokyseliny č. 35 až 42, b) aminokyseliny č. 35 až 46, c) aminokyseliny č. 36 až 51, d) aminokyseliny č. 36 až 80 a e) aminokyseliny č. 1 až 80 aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 1.
- 15 **13.** Použití nukleové kyseliny, kódující rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu, pro výrobu odpovídajících proteinů nebo homologů nebo fragmentů.
- 20 **14.** Vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.
- 25 **15.** Rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus, který obsahuje vektor zahrnující nukleovou kyselinu kódující rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.
- 30 **16.** Rekombinantní bakteriální nebo nehumánní eukaryontní organismus schopný produkovat rekombinantní protein, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1, nebo jeho homology nebo fragmenty, které mají antisekreční aktivitu.

3 stránky sekvencí

a

9 výkresů

Sekvence ID č:1
 Typ sekvence: Nukleotid s odpovídajícím proteinem
 Délka sekvence: 1309 párů bází plus poly(A) konec
 Vlákno : jednoduché
 Topologie : lineární
 Typ molekuly : cDNA
 Původní zdrojový organismus: člověk
 Bezprostřední experimentální zdroj: hypofýza
 Znaky: od 63 do 1208 bp maturovaný protein
 od 1289 do 1295 bp poly(A) signální sekvence

AATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCCTCCCGGAGACCCGGTCCGGAGGGAG

GAAGGTGGCAAG ATG GTG TTG GAA AGC ACT ATG GTG TGT GTG GAC AAC AGT 101
 Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser>
 5 10

GAG TAT ATG CGG AAT GGA GAC TTC TTA CCC ACC AGG CTG CAG GCC CAG 149
 Glu Tyr Met Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln>
 15 20 25

CAG GAT GCT GTC AAC ATA GTT TGT CAT TCA AAG ACC CGC AGC AAC CCT 197
 Gln Asp Ala Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro>
 30 35 40 45

GAG AAC AAC GTG GCC CTT ATC ACA CTG GCT AAT GAC TGT GAA GTG CTG 245
 Glu Asn Asn Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu>
 50 55 60

ACC ACA CTC ACC CCA GAC ACT GGC CGT ATC CTG TCC AAG CTA CAT ACT 293
 Thr Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr>
 65 70 75

GTC CAA CCC AAG GGC AAG ATC ACC TTC TGC ACC GGC ATC CGC GTG GCC 341
 Val Gln Pro Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala>
 80 85 90

CAT CTG GCT CTG AAG CAC CGA CAA GGC AAG AAT CAC AAG ATG CGC ATC 389
 His Leu Ala Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile>
 95 100 105

ATT GCC TTT GTG CGA AGC CCA GTG GAG GAC AAT GAG AAG GAT CTG GTG 437
 Ile Ala Phe Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val>
 110 115 120 125

AAA CTG GCT AAA CGC CTC AAG AAG GAG AAA GTA AAT GTT GAC ATT ATC 485
 Lys Leu Ala Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile>
 130 135 140

AAT TTT GGG GAA GAG GAG GTG AAC ACA GAA AAG CTG ACA GCC TTT GTA 533
 Asn Phe Gly Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val>
 145 150 155

AAC ACG TTG AAT GGC AAA CAT GGA ACC GGT TCT CAT CTG GTG ACA GTG 581
 Asn Thr Leu Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val>
 160 165 170

Obr. 1a

AATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCGGGAGGGAG

GAAGGTGGCAAG ATG GTG TTG GAA AGC ACT ATG GTG TGT GTG GAC AAC AGT 101
Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser>
5 10

GAG TAT ATG CGG AAT GGA GAC TTC TTA CCC ACC AGG CTG CAG GCC CAG 149
Glu Tyr Met Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln>
15 20 25

CAG GAT GCT GTC AAC ATA GTT TGT CAT TCA AAG ACC CGC AGC AAC CCT 197
Gln Asp Ala Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro>
30 35 40 45

GAG AAC AAC GTG GGC CTT ATC ACA CTG GCT AAT GAC TGT GAA GTG CTG 245
Glu Asn Asn Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu>
50 55 60

ACC ACA CTC ACC CCA GAC ACT GGC CGT ATC CTG TCC AAG CTA CAT ACT 293
Thr Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr>
65 70 75

GTC CAA CCC AAG GGC AAG ATC ACC TTC TGC ACG GGC ATC CGC GTG GCC 341
Val Gln Pro Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala>
80 85 90

CAT CTG GCT CTG AAG CAC CGA CAA GGC AAG AAT CAC AAG ATG CGC ATC 389
His Leu Ala Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile>
95 100 105

ATT GCC TTT GTG GGA AGC CCA GTG GAG GAC AAT GAG AAG GAT CTG GTG 437
Ile Ala Phe Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val>
110 115 120 125

AAA CTG GCT AAA CGC CTC AAG AAG GAG AAA GTA AAT GTT GAC ATT ATC 485
Lys Leu Ala Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile>
130 135 140

AAT TTT GGG GAA GAG GAG GTG AAC ACA GAA AAG CTG ACA GCC TTT GTA 533
Asn Phe Gly Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val>
145 150 155

AAC ACG TTG AAT GGC AAA GAT GGA ACC GGT TCT CAT CTG GTG ACA GTG 581
Asn Thr Leu Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val>
160 165 170

Obr. 1b

CCT CCT GGG CCC AGT TTG GCT GAT GCT CTC ATC AGT TCT CCG ATT TTG 629
 Pro Pro Gly Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu>
 175 180 185

GCT GGT GAA GGT GGT CCC ATG CTG GGT CTT GGT GCC AGT GAC TTT GAA 677
 Ala Gly Glu Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu>
 190 195 200 205

TTT GGA GTA GAT CCC AGT GCT GAT CCT GAG CTG GCC TTG GCC CTT CGT 725
 Phe Gly Val Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg>
 210 215 220

GTA TCT ATG GAA GAG CAG CCG CAC GCA GGA GGA GCG CCG CCG CCA 773
 Val Ser Met Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala>
 225 230 235

GCT CCA GCT TCT GCT GCT GAG GCC GGG ATT GCT ACG ACT GGG ACT GAA 821
 Ala Arg Ala Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu>
 240 245 250

GAC TCA GAC GAT GCC CTG CTG AAG ATG ACC ATC AGC CAG CAA GAG TTT 869
 Asp Ser Asp Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Gln Glu Phe>
 255 260 265

GGC CGC ACT GGG CTT CCT GAC CTA AGC AGT ATG ACT GAG GAA GAG CAG 917
 Gly Arg Thr Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Glu Glu Glu Gln>
 270 275 280 285

ATT GCT TAT GCC ATG CAG ATG TCC CTG CAG GGA GCA GAG TTT GGC CAG 965
 Ile Ala Tyr Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln>
 290 295 300

GCG GAA TCA GCA GAC ATT GAT GCC AGC TCA GCT ATG CAC ACA TCT GAG 1013
 Ala Glu Ser Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu>
 305 310 315

CCA CCC AAG GAG GAG GAT GAT TAC GAC GTG ATG CAG GAC CCC GAG TTC 1061
 Pro Ala Lys Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe>
 320 325 330

CTT CAG AGT GTC CTA GAG AAC CTC CCA GGT GTG GAT CCC AAC AAT GAA 1109
 Leu Gln Ser Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu>
 335 340 345

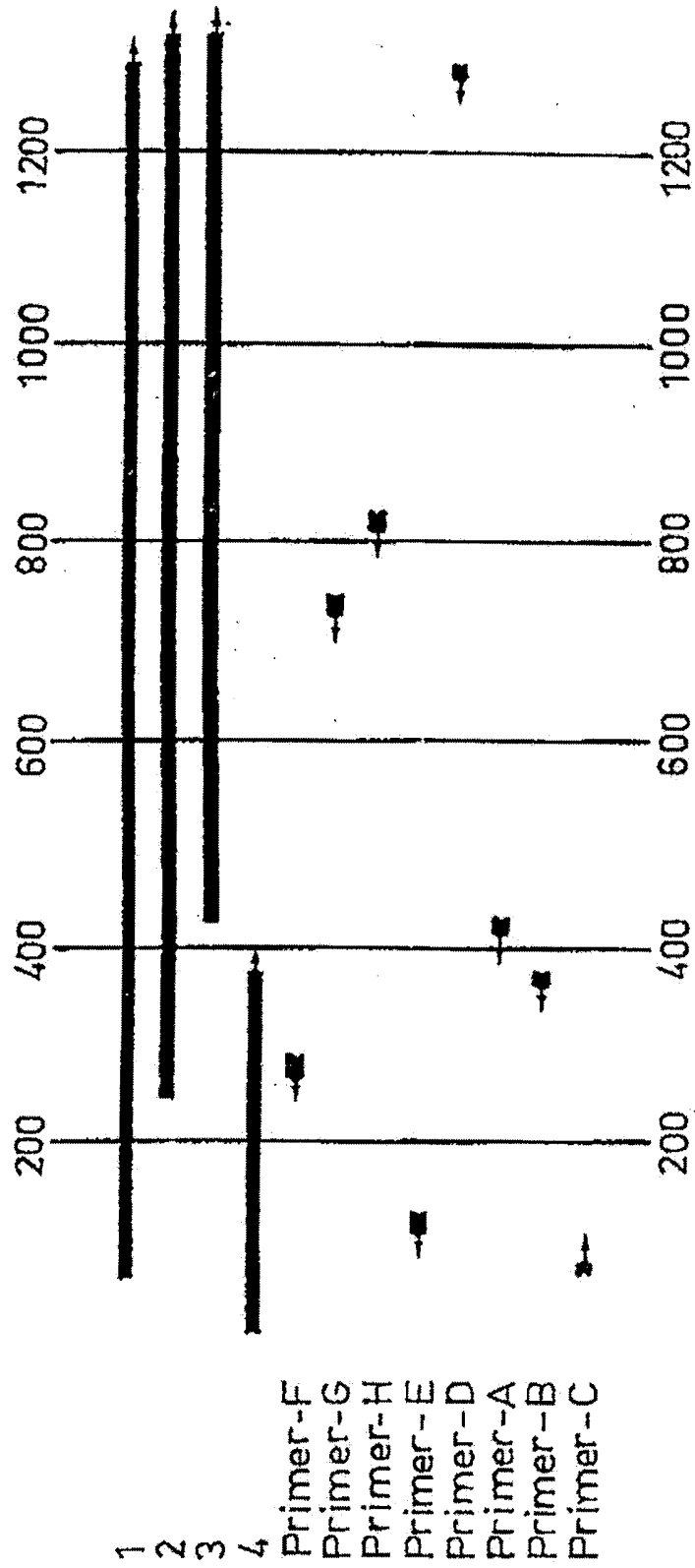
GCC ATT CGA AAT GCT ATG GGC TCC CTG CCT CCC AGG CCA CCA AGG ACG 1157
 Ala Ile Arg Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr>
 350 355 360 365

GCA AGA AGG ACA AGA AGG AGC AAG ACA AGA AGT GAG ACT GCA GGG AAA 1205
 Ala Arg Arg Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys>
 370 375 380

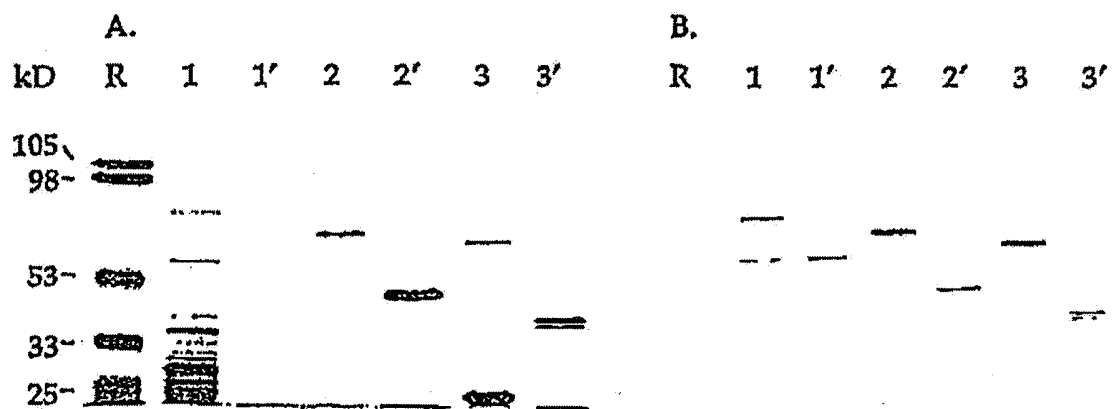
GCG TAGCTGAGTCTGCTTAGGGGACTGCATGGGAGGCACGGGAATATAGGCTTAGATGTGTGT
 Gly>

TATCTGTAAACCATTACAGCCTAAATAAAGCTTGGCAACTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

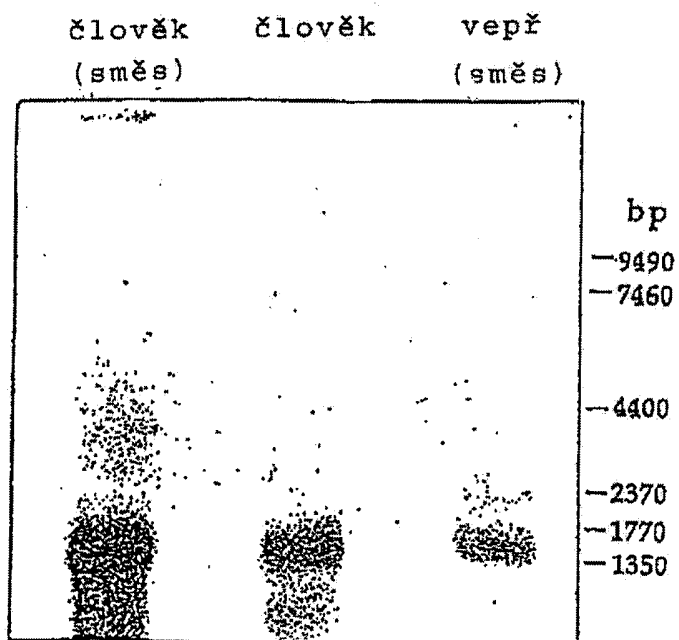
Obr. 1c



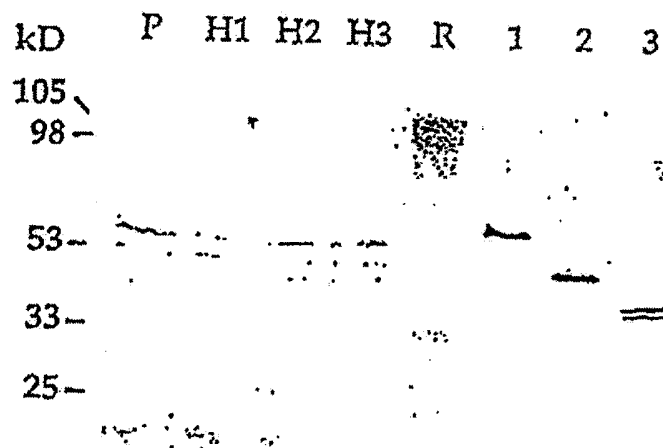
Obr. 2



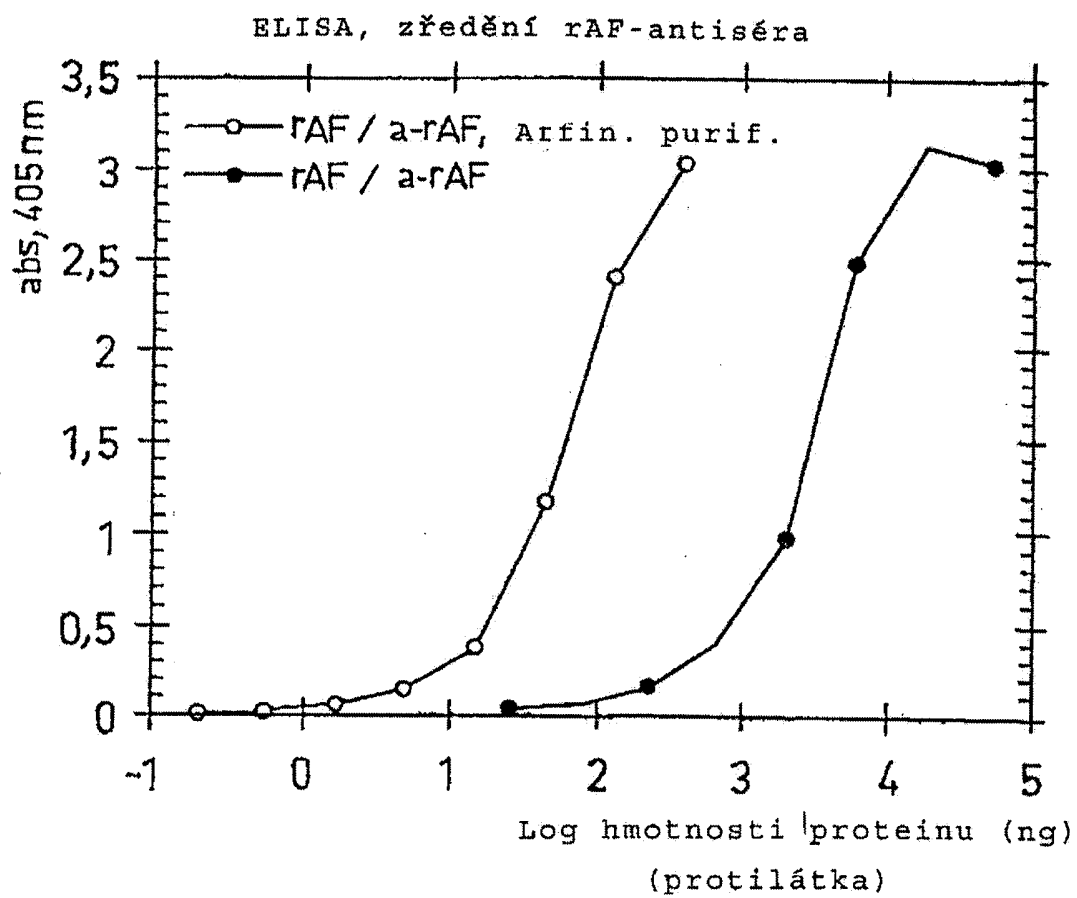
Obr. 4



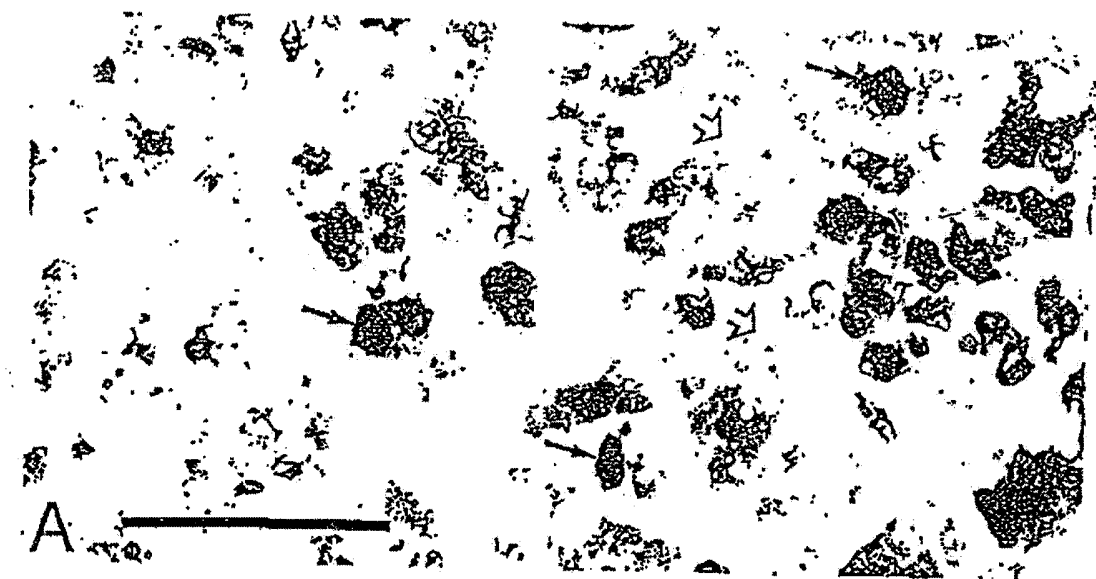
Obr. 3a



Obr. 3b



Obr. 5



B

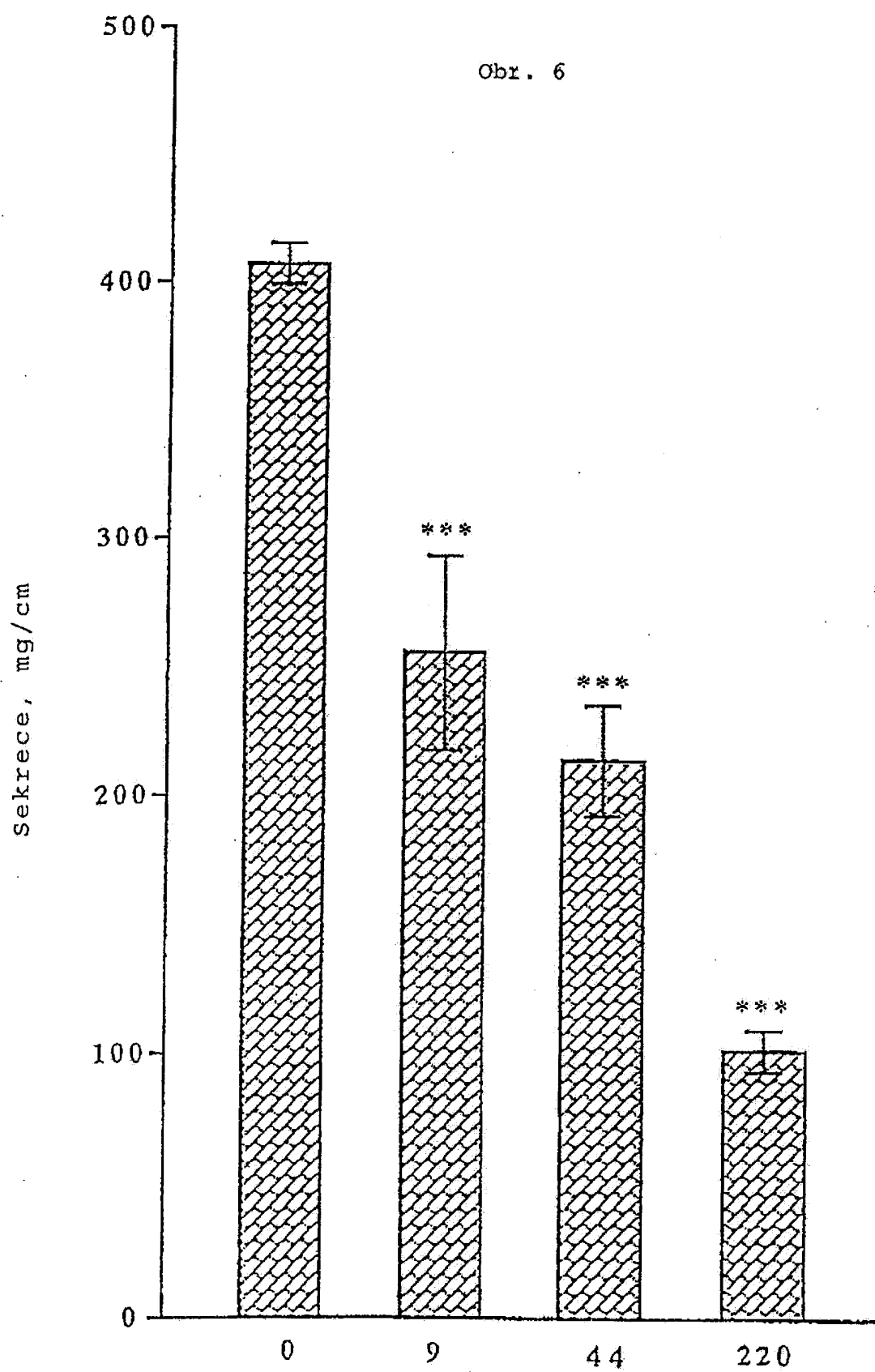


C

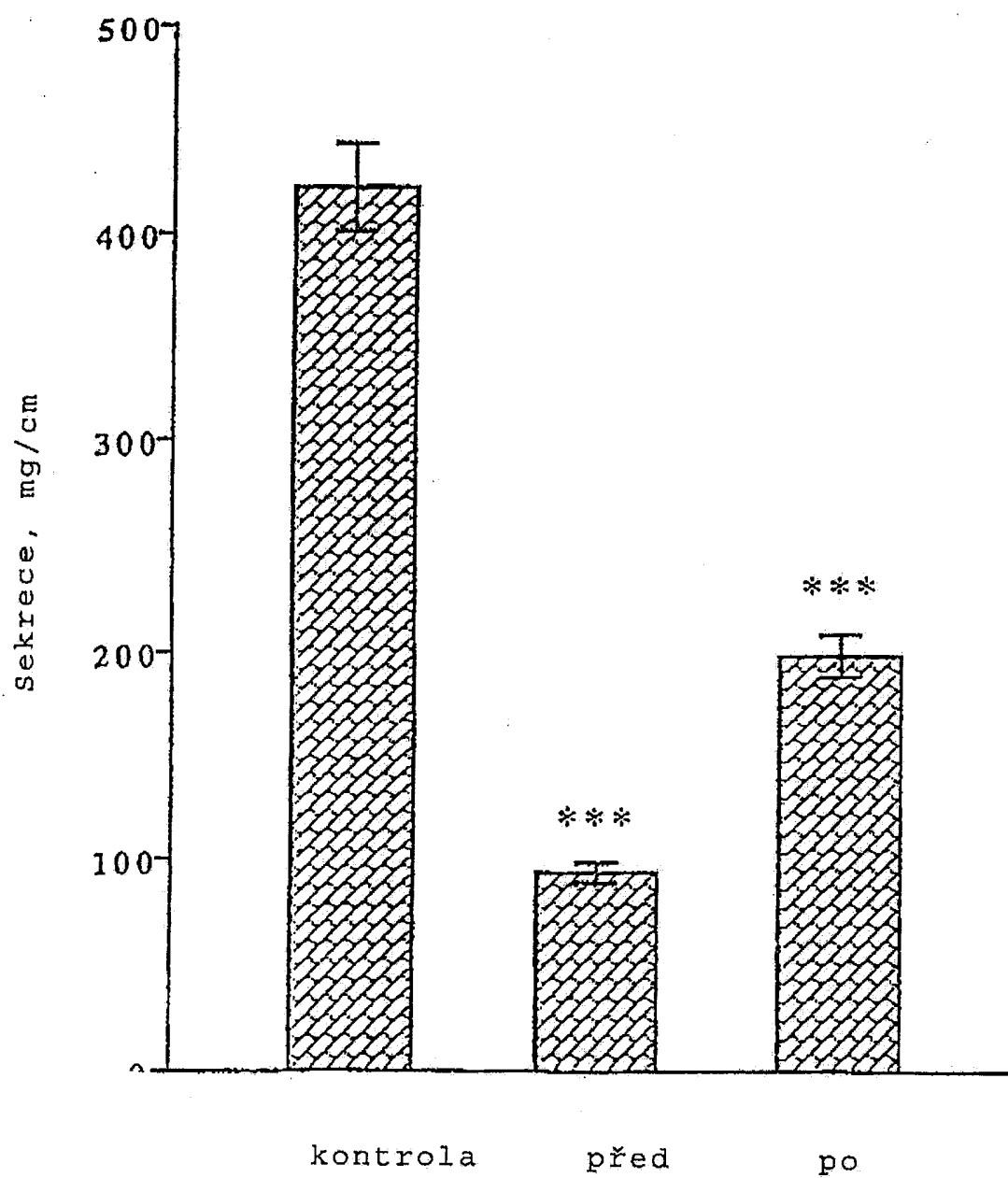


D

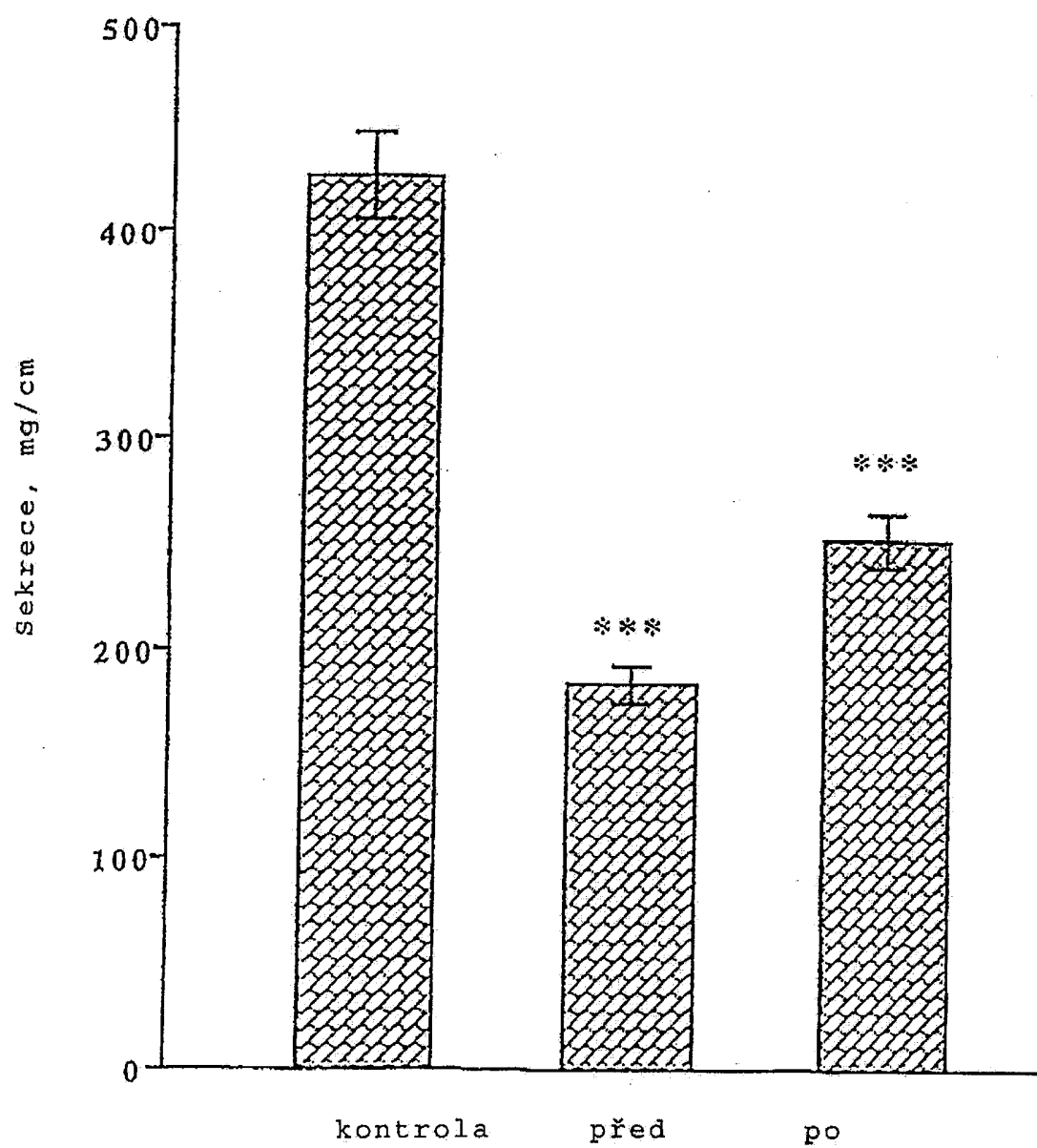




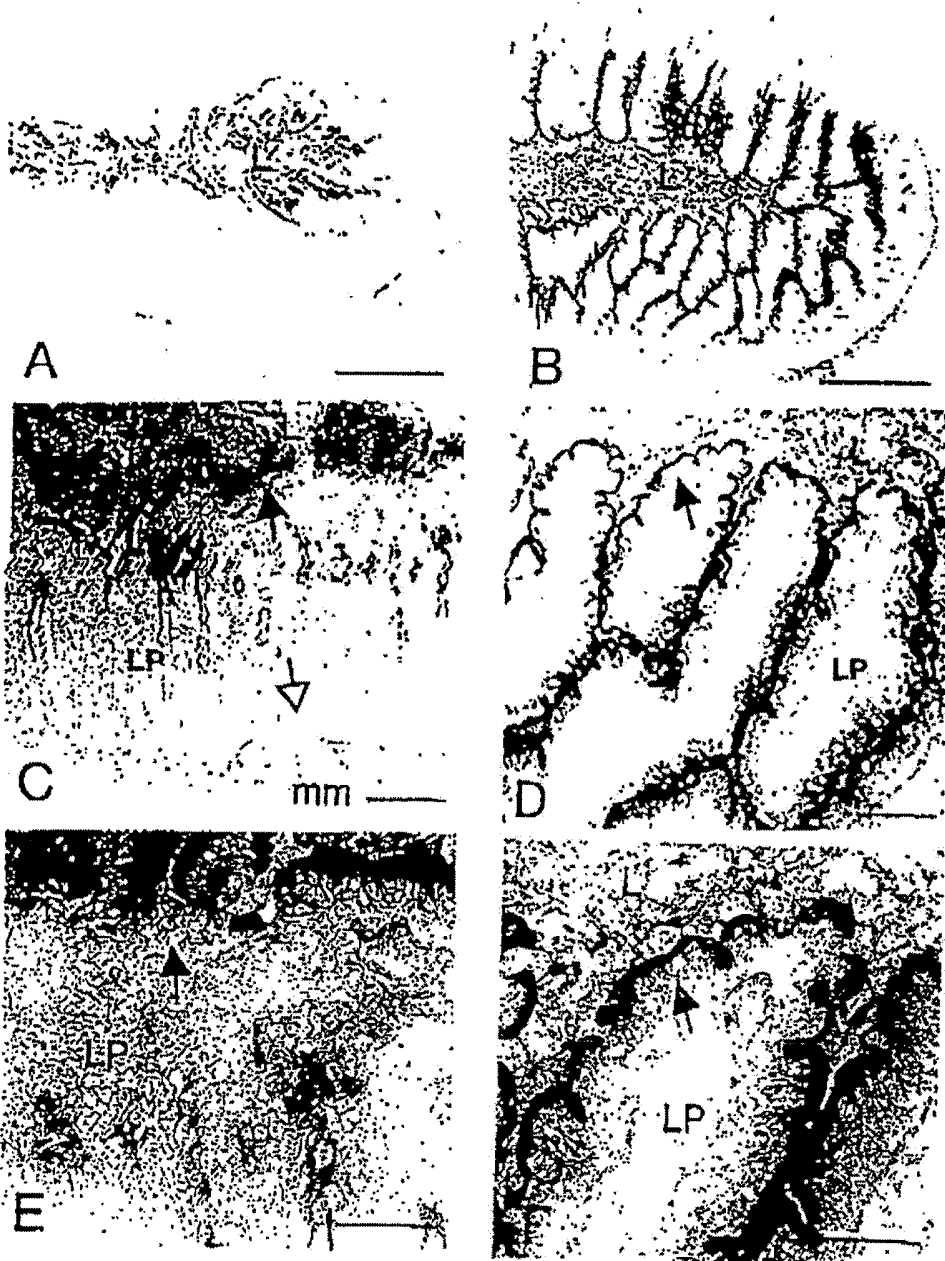
Obr. 7



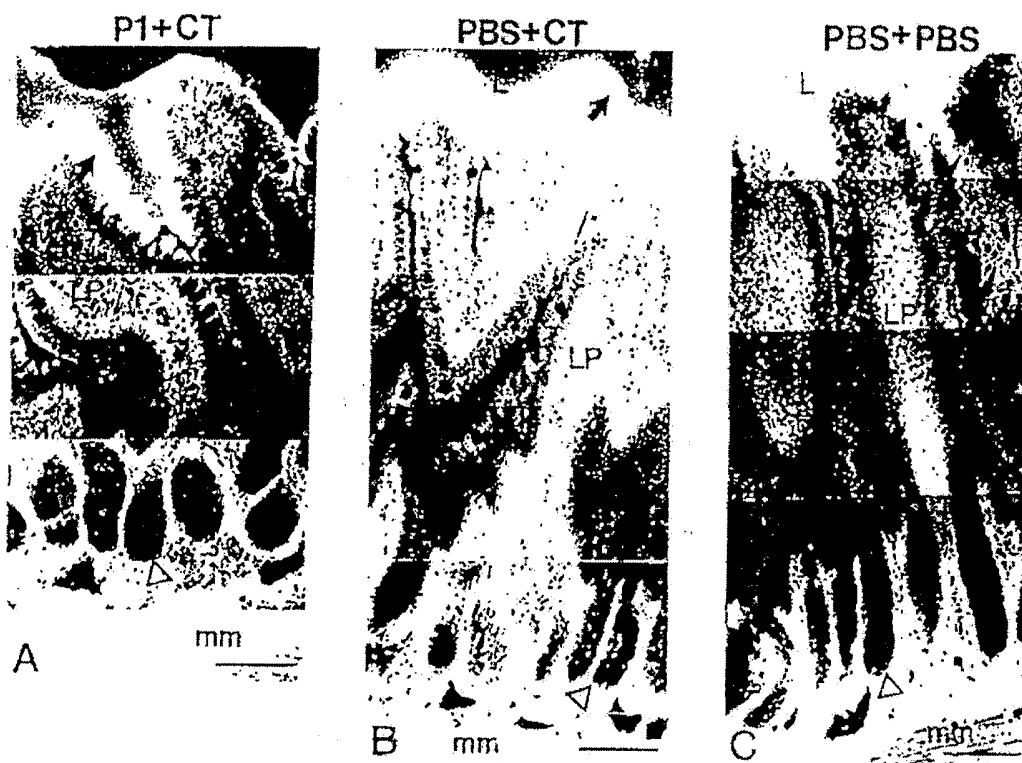
Obr. 8



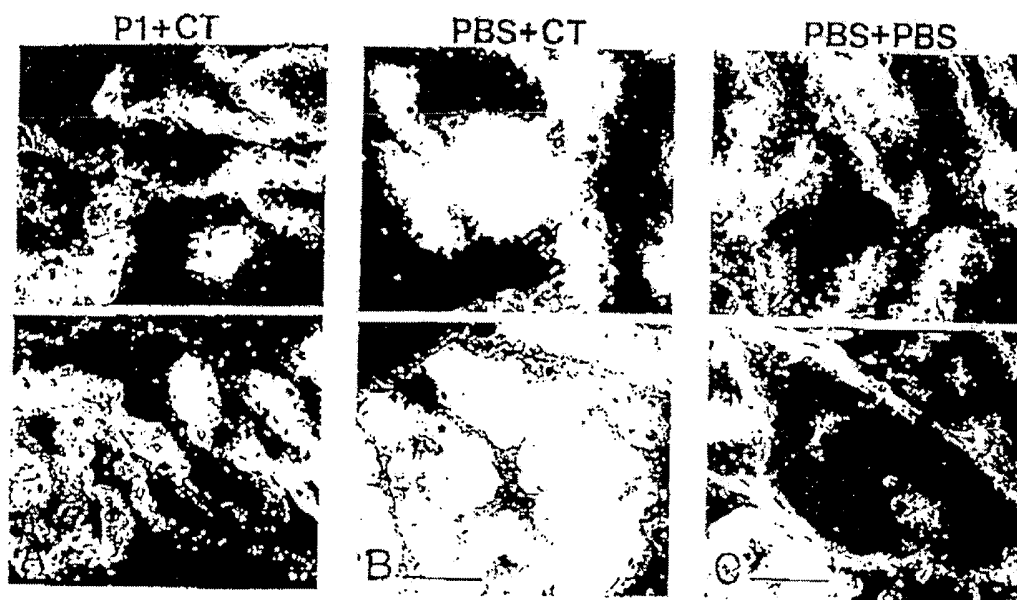
Obr. 9



Obr. 10



Obr. 11



Konec dokumentu