



NSZQ- 6.12.1990
6.12.1990

ELJÁRÁS HUMÁN CITOSZÓL FOSZFOLIPÁZ A_2 ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1991. 08. 23.

Elsőbbsége: 1990. 08. 24. (07/573,513),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás lényegében tiszta formájú citoszól foszfolipáz A_2 (PLA₂) izolálására biológiai sejtekből. Az eljárás során a sejteket lizálják, a lizátumot frakcionálják, a fehérje-szerű oldatot anioncserélő gyantával, majd hidrofób kölcsönható gyantával kezelik, ezután molekulaméret szerinti kromatografálásnak vetik alá, végül ismét hidrofób kölcsönható gyantával kezelik. A találmány tárgya még eljárás citoszól PLA₂ inhibitorok átvizsgálására. A találmány ismerteti néhány PLA₂ aminosav-részszekvenciáját.

2749/91

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



A

54.846/SZE

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

MSZOS-

121 1/1
121 7/10
81038

ELJÁRÁS HUMÁN CITOSZÓL FOSZFOLIPÁZ A₂
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

2 3 1
RUTH Maria Kramer, INDIANAPOLIS, Indiana,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1991. 08. 23.

Elsőbbsége: 1990. 08. 24. (07/573,513),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya eljárás mintegy 100000 daltonos citoszól foszfolipáz A_2 enzimek izolálására. Pontosabban a találmány új intracelluláris foszfolipáz A_2 enzimmel foglalkozik, amelyet lényegében tiszta formában izolálunk humán monoblaszt eredetű sejtvonalból.

A foszfolipázokat ismerik és tanulmányozzák több, mint 100 éve, és ezek a mindenütt előforduló enzimek nagy terjedelmű osztályát képezik, amelyek hidrolizálják a foszfoglicerideket. A foszfolipázokat öt csoportra kategorizálják (A_1 , A_2 , B, C és D) attól a szubsztrátum-kötéstől függően, amelyet hasítanak.

A foszfolipáz A_2 (PLA_2) a foszfatid-2-acil-hidrolázok közös neve, amelyek katalizálják a foszfogliceridek sn-2-acil észter kötésének hidrolizisét, ekvimoláris mennyiségben alakítva kilizofoszfolipideket és szabad zsírsavakat [Dennis E.A.: The Enzymes, 16. kötet; Academic Press, New York (1983)]. A PLA_2 enzimek megtalálhatók minden élő fajban, és az enzimek sokszínű családját képezik. Az eddig tanulmányozott PLA_2 -k közül a nagy többség molekulatömege mintegy 14 kD, és aminosavszekvenciájuk nagy homológiát mutat.

A leggyakrabban és legalaposabban tanulmányozott PLA_2 -k a kiválasztott formájúak. Ezek az enzimek a sejten belül termelődnek, becsomagolódnak a szekréciós vezikulumokba, és később kibocsátódnak az extracelluláris környezetbe, ahol segítenek a biológiai anyag emésztésében. Ezzel szemben a citoszól PLA_2 elenyészően csekély mennyiségben található, megmarad a sejten belül, és teljesen más célt szolgál, mint a kiválasztott forma. A citoszól PLA_2 alapos vizsgálatát gátolja ezen enzimek rendkívül kis koncentrációja a sejtekben [Vadas és Pruzanski: Lab. Investigation 55(4), 391(1986)].

A citoszól PLA_2 kulcs szabályozószerepet játszik a vérlemezke aktiváló faktorok (platelet activating factors; PAF) és eikozanoidok néven ismert lehetséges elő-gyulladás-közvetítők képződéséhez vezető bioszintetikus útban. Az eikozanoidok között találjuk a prosztaglandinokat, tromboxánokat, hidrox-eikozatetraénsavat, leukotriéneket és lipoxinokat [Mobilio és Marshall: Ann. Reports in Med. Chem. 24, 157 (1989)]. Az eikozanoidok termelésénél a sebességkorlátozó prekursor a szabad arachidonsav, ez speciális citoszól PLA_2 -k hatására szabadul fel membrán foszfolipid raktáraiból [Dennis: Drug Dev. Res. 10, 205 (1987)]. Ugyanez az enzimes lépés termel lizofoszfolipideket is, amelyeket át lehet alakítani, hogy PAF-eket képezzenek. Az alapszinteken a citoszól PLA_2 részt vesz a celluláris foszfolipid metabolizmus fenntartásához szükséges dezacilezési-reacilezési reakciókban, míg a receptor-közvetített, megnövekedett PLA_2 aktivitás egybeesik a gyulladásos válaszban csúcsosodó sejtaktiválással. Jól ismert, hogy a citoszól PLA_2 kulcs receptor-közvetített szabályozó helyet foglal el a gyulladások, magas vérnyomás és szöveti sérülések lehetséges lipid közvetítőinek bioszintetikus útjaiban.

Az eddig izolált és tanulmányozott PLA_2 -k nagy többsége extracelluláris formájú. Azok az inhibitorok, amelyeket extracelluláris PLA_2 alapú modellekben azonosítottak, nem bizonyultak a gyulladások hatékony inhibitorainak in vivo. Ahhoz, hogy PLA_2 inhibitorokat fejlesszünk ki gyulladásgátló tulajdonságokkal, úgy tűnik, hogy a gyulladás biokémiai útjában érdekelt, leginkább közelálló intracelluláris PLA_2 -t kell alkalmaznunk modell enzimként a könnyebben izolálható extracelluláris PLA_2 helyett [Dennis: Bio/Technology 5, 1294 (1987)].

Az a lehetőség, hogy módosuljon a receptor-közvetített, citoszól PLA_2 aktivitás enziminhibitorok révén, elérendő cél, és új terápiás lehetőségekhez vezethet az asztma, iszkémia, artritisz, szeptikus sokk és a bőr gyulladásos betegségeinek kezelésében. A citoszól PLA_2 aktivitás sajátos betegségi állapotokkal társult fajlagos gátlásának inaktiválása jelentős felhasználást nyerhet a gyógyászat terén. Ennek a célnak az elérésére először azonosítani kell bizonyos betegségek patogenezisében érdekelt citoszól PLA_2 -ket.

A találmány eljárást tartalmaz foszfolipáz A_2 izolálására lényegében tiszta formában valmely biológiai sejtéből, ahol az eljárás az alábbi lépésekből áll:

- a.) az említett sejtet lizáljuk
- b.) a sejt-lizátumot frakcionáljuk, hogy sejttörmeléktől, organelumoktól és membránoktól lényegében mentes fehérjeszerű oldatot kapjunk;
- c.) az említett fehérjeszerű oldatot érintkezésbe hozzuk olyan anioncserélő gyantával, amely a fehérjeszerű oldatban levő foszfolipáz A_2 kötésére képes;
- d.) az említett foszfolipáz A_2 -t eluáljuk az említett anioncserélő gyantáról;
- e.) a d.) pontban kapott, foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot érintkezésbe hozzuk egy hidrofób kölcsönható gyantával, amely az említett foszfolipáz A_2 kötésére képes,
- f.) az említett foszfolipáz A_2 -t eluáljuk az említett hidrofób kölcsönható gyantáról;
- g.) a foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot elkülönítjük az együtt eluálódó szennyeződésektől molekulaméret szerinti kromatografálással;



h.) a g.) pontban kapott foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot egy hidrofób kölcsönható gyantával hozzuk érintkezésbe olyan körülmények között, amelyek csak gyenge kölcsönhatást tesznek lehetővé a PLA_2 és a gyanta között.

A találmány olyan polipeptiddel foglalkozik, amely az alábbi aminosav-szekvenciákat foglalja magában: Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Thr-Ile-Ile-Tyr-Phe-Val-Leu-Ala-Asn-Ile-Asn-Phe-Arg-Lys-Tyr-Lys-Ala-Pro-Gly-Val-Pro és Leu-Lys-Leu-Pro-Phe-Pro-Tyr-Val-Glu-Leu-Phe-Ile-Glu-Lys-Ile-Pro-Arg; ennek a polipeptidnek PLA_2 aktivitása van, és molekulatömege mintegy 100 kilodalton. A jelen találmány olyan polipeptiddel is foglalkozik, amely az alábbi aminosav-szekvenciát foglalja magában: Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Thr-Ile-Ile-Tyr-Phe-Val-Leu-Ala-Asn-Ile-Asn-Phe-Arg-Lys-Tyr-^{-Lys-}Ala-Pro-Gly-Val-Pro; ennek a polipeptidnek PLA_2 aktivitása van, és molekulatömege mintegy 100 kilodalton. A találmány továbbá olyan polipeptiddel is foglalkozik, amely az alábbi aminosav-szekvenciát foglalja magában: Leu-Lys-Leu-Pro-Phe-Pro-Tyr-Val-Glu-Leu-Phe-Ile-Glu-Lys-Ile-Pro-Arg; ennek a polipeptidnek PLA_2 aktivitása van, és molekulatömege mintegy 100 kilodalton. A találmány továbbá foglalkozik egy olyan polipeptiddel, amelyet az 1. igénypont szerinti eljárással tisztítunk, PLA_2 aktivitása van, és molekulatömege mintegy 100 kilodalton.

Az 1. ábra az SDS poliakrilamid gélelektroforézis eredményeit mutatja be. Az egyes csíkok a találmány szerinti eljárás egyes lépéseinek tisztítási hatását mutatják be.

A 2. ábra azt mutatja be, hogy a találmány szerinti tisztított fehérje közvetlen korrelációban van a maximális PLA_2 aktivitással.

A 3. ábra a koncentráció hatásának diagramja, amely azt

mutatja be, hogy a találmány szerinti PLA_2 Ca^{2+} -függő, és maximális enzimaktivitását 1 mMól/l alatti Ca^{2+} koncentrációnál éri el.

A 4. ábra a találmány szerinti PLA_2 cianogén-bromidos hasítási termékeit mutatja be, miután e termékeket SDS poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá.

Egyik kiviteli módjában a jelen találmány olyan eljárást nyújt, amellyel a citoszól PLA_2 több, mint 10000-szeres tisztítását érhetjük el az U937 humán monoblaszt sejtvonalból kiindulva.

A PLA_2 -nek ez az új formája olyan modellvizsgálatokhoz alkalmas, amelyek gyulladásellenes vagy anti-iszkémiás tulajdonságokkal bíró vegyületeket azonosítanak. A szakterület jelenlegi állása arra utal, hogy azok a vegyületek, amelyek a lizofosfolipidek képződésében, valamint az eikozanoidok és PAF-ok bioszintetikus útjában szabályozó helyet elfoglaló speciális PLA_2 -t szelektíven gátolják, gyulladásgátló és anti-iszkémiás gyógyszerek kiváló jelöltjei lehetnek.

A találmány szerinti eljárás azzal kezdődik, hogy lizáljuk azokat a sejteket, amelyek a citoszól PLA_2 -t tartalmazzák. Minden sejt tartalmazza a PLA_2 valamilyen formáját, és annak kiválasztása, hogy melyik sejtípust használjuk, nagy mértékben függ a sejt általános szeerepétől a testben. A citoszól PLA_2 -t illetően, amely részt vesz az eikozanoid és PAF termelés szabályozásában, azok a sejtek az előnyösek, amelyek az immunrendszert alkotják. Még előnyösebb sejtípusok a mieloid eredetű sejtek, amelyek közvetlenül érdekeltek a gyulladásos válaszban. A vérlemezkék, neutrofilok, makrofágok, monociták és az ilyen sejtekből származó sejtvonalak jó példák a nagy mértékben előnyös sejtekre. A sejtvona-



lak gyakran nem az érett sejttípusból származnak; ezek gyakran inkább olyan sejtekből fejlődnek ki, amelyek a differenciálódó őssejtekből alakulnak ki. A differenciálódási folyamat sokféle sejtet foglal magában, amelyek az őssejtekből alakulnak ki és az érett sejttípusban érik el csúcspontjukat. Ennek a leírásnak a céljára a differenciálódási folyamaton belüli sejteket prekursor sejteknek nevezzük.

A kiválasztott sejttípust megfelelő mennyiségben kell biztosítani, hogy képesek legyünk megtisztítani az ebben a sejttípusban található adott citoszól PLA_2 -t. A szükséges sejttömeg természetesen függ a keresett PLA_2 koncentrációjától a sejten belül. Mivel a citoszól PLA_2 igen csekély koncentrációban található a sejten belül, tipikusan 10^{11} - 10^{12} összes sejt szükséges, hogy nekikezdhessünk a találmány szerinti eljárásnak. Így az in vitro sejtenyésztés az előnyös eljárás arra a célra, hogy nagy számú sejthez jussunk a találmány gyakorlati kivitelezéséhez. Az ilyen technikák jól ismertek a szakterületen és sokféle módon kivitelezhetők. A véradásból származó vérlemezkék izolálása azonban szintén előnyös eljárás megfelelő mennyiségű olyan sejt beszerzésére, amellyel a találmány szerinti eljárás gyakorlatilag megvalósítható.

Miután növesztettük és kinyertük, a kiválasztott sejteket különböző eljárásokkal lizálhatjuk, beleértve (de nem csak ezekre korlátozva) az enzimes bontást, kémiai lizálást, ozmotikus sokkot, mechanikus zúzást, ultrahangos kezelést, és nyomási sokkot. Előnyös lizálási eljárások a mechanikus eljárások, és különösen előnyös a nyomási sokk. A nyomási sokk legelőnyösebb formája a sejtek szétzúzására a nitrogén kavitáció. A nitrogén kavitációval a lízist úgy hajtjuk végre, hogy a sejtszuspenziót

kevertetett sejtzúzó bombába helyezzük és nitrogénnel 20 percre nyomás alá helyezzük mintegy $4 \cdot 10^6$ Pa értéken. A nyomást azután hirtelen kiengedjük, és ezzel a sejtek szétrobbanását idézzük elő.

A lizálási munkamenetet (a.) lépés) a legjobban egy vagy több proteáz inhibitor jelenlétében hajtjuk végre fiziológiás pufferban. Ha így teszünk, a rendkívül csekély mennyiségű citoszól PLA_2 denaturálódása és lebomlása minimális lesz. Sokféle, kereskedelmi forgalomban kapható proteáz inhibitor áll rendelkezésre. Ezekre (a korlátozás igénye nélkül) példák lehetnek az antipain, alfa₁-antitripszin, aprotinin, besztatin, kimosztatin, cisztatin, leupeptin, pepsztatin^A, fenil-metánszulfonil-fluorid (PMSF), és a tripszin inhibitor (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana). Az előnyös proteáz inhibitor kombináció a PMSF (1 mmól/l), leupeptin (100 μ mmól/l), és pepsztatin^A (100 μ mmól/l), 2 mmól/l etiléndiamin-tetraecetsav jelenlétében.

A b.) lépésben a lizátumból oldható és szemcsés frakciókat készítünk, hogy megkönnyítsük az ez után következő tisztítási lépéseket. A sejttrömelék és az organelumok eltávolítása az oldható frakcióból a citoszól fehérjék (beleértve a PLA_2 -t) olyan oldatát eredményezi, amelyet tovább lehet tisztítani. Az előnyös frakcionálási technika az ultracentrifugálás, bár az elkülönítés más módszerei is beleillenek a találmány szerinti eljárásba, pl. a többszöri szűrés.

A c.) lépés folytatja az izolálást, a PLA_2 -t tartalmazó oldatot érintkezésbe hozva valamely anioncserélő gyantával. Azok az elkülönítési technikák, amelyek a molecula ion-töltéseit hasznosítják, a szakterületen jól ismertek. Egy alapvető munka, amely leírja a technika állását a fehérjetisztításban, és amely hasznos

a jelen találmány megértésében, a következő: Scopes R.K.: Protein Purification. Springer-Verlag Inc., New York (1982). A c.) lépést egyedi tételekben is végrehajthatjuk; azok azonban, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy ezt a lépést a legjobban oszlopkromatográfiával (column chromatography; CC) lehet elvégezni. Számos anioncserélő gyanta van kereskedelmi forgalomban, és alkalmazható a jelen találmány céljaira. Az ilyen gyantákra példák lehetnek a Fast Flow Sepharose Q (Pharmacia), Cellfine A-800 (Amicon) és Silica PAE (Amicon). A legelőnyösebb gyanta a Fast Flow Sepharose Q. Az előnyös kötő és mosó puffer az alábbi: 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-merkapto-etanol (2-ME), 1 mmól/l etilén-bisz(oxi-etilénitrilo)tetraecetsav (EGTA), és 25 mmól/l trisz.HCl (pH 8).

Miután a keresett PLA_2 -t ionos úton a gyantához kötöttük és a szennyező fehérjéket kimostuk, a PLA_2 -t eluálni kell a gyantából. A d.) lépést úgy hajtjuk végre, hogy megváltoztatjuk a puffer ionos tulajdonságait olyan módon, hogy a puffer ionok kiszorítsák a PLA_2 -t a gyantából. A puffer lépésenkénti megváltoztatása az eluciós körülményekhez a találmány szerinti eljárásnak megfelel. Azok azonban, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy az eluciós puffer gradiens előnyösebb, mivel nagyobb elválasztás érhető el az eluált fehérjék között. A legelőnyösebb gradiens 100 % kötő és mosó pufferral kezdődik és lineárisan halad a 100 % eluciós puffer felé [500 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8)]. Az oszlop eluálását előnyösen követjük 280 nm-nél mért abszorbanciával a frakciók szedése közben.

A d.) lépésben kapott frakciókat vizsgálhatjuk PLA_2 aktivitásra, és standard technikákkal koncentrálnakhatjuk. Az előnyös kon-

centrálási technikák olyan gyengédek, hogy az enzimek nem denaturálódnak és oldott ionok előnyösen nem koncentráálódnak. Előnyösök azok a standard koncentráló munkamenetek, amelyek molekulaméret szerint szétválasztó és sómentesítő géleket alkalmaznak; ilyenek pl. a Sephadex G-25 vagy G-50, vagy a Biogel P30 vagy P60. A különösen előnyös koncentráló eljárások az ultraszűrési technikán alapulnak. A kereskedelmi forgalomban számos ultraszűrési koncentráló egység található, pl. egy kevertetett cella YM30 membránnal (Amicon).

A PLA_2 -t tartalmazó koncentrált mintát tovább tisztítjuk az e.) lépésben egy hidrofób kölcsönható gyanta segítségével. Az ilyen gyanták jól ismertek a szakterületen, ezeket arra használják, hogy a fehérjéket a hidrofób tulajdonságaik alapján tisztítsák, amely tulajdonságok hozzátartoznak a szóban forgó molekulához. Az ilyen gyantákra példák lehetnek (a korlátozás szándéka nélkül) a Phenyl-Superose (Pharmacia), Phenyl-Sepharose (Pharmacia), és Hydropore HIC (Rainin). Megfelelő pufferolási körülmények között a PLA_2 a hidrofób kölcsönható gyantához kötődik és a nem kötődő egyéb fehérjék kimosása után, eluálható az oszlopról káros bomlási hatások nélkül.

Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy az e.) lépést a CC eljárással (oszlopkromatográfia) előnyös végrehajtani. Az előnyös hidrofób kölcsönható gyanta a Phenyl-Superose, és az előnyös kötő pufferösszetétele az alábbi: 500 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8). Előnyös, ha az f.) lépésben a PLA_2 -t lineáris gradiens alkalmazásával eluáljuk, 100 % kötő pufferral kezdve és kifejlesztve 100 % eluciós pufferig [50 % etilén-glikol vízben, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8)]. Az oszlop eluálását előnyösen követ-

jük 280 nm-nél mért abszorbanciával, miközben frakciókat gyűjtünk. A kapott frakciókat meg kell vizsgálnunk PLA_2 aktivitásra és koncentrálnunk kell, amint fentebb leírtuk, mielőtt belekezdénénk a találmány szerinti eljárás következő lépésébe.

Az eljárás g.) lépése tovább tisztítja a PLA_2 -t tartalmazó mintát molekulaméret szerinti szétválasztási technikákkal. Ezt a lépést csak akkor előnyös lefolytatni, ha minimum 5 mg fehérjét izoláltunk az f.) lépésből. Ha a g.) lépés előtt szükségessé válik a minták összegyűjtése, az izolált anyagot káros hatások nélkül tárolhatjuk 4°C hőmérsékleten akár három hétig is, ha a koncentráció 2 mg/ml-nél nagyobb. Az enzimesen aktív fehérjék molekulaméret szerinti szétválasztásán alapuló tisztítását sokféle eljárással valósíthatjuk meg, így pl. (a korlátozás szándéka nélkül) szűréssel, dialízissel, sűrűség-gradienssel vagy gélelektroforézissel.

Az előnyös molekulaméret szerinti szétválasztási eljárás a géliszűrés. Számos kereskedelmi forgalomban levő gyanta és oszlop alkalmas erre a célra és használható ebben a találmány szerinti eljárásban. Az ilyen gyanták között találjuk (a korlátozás szándéka nélkül) a Superose 12, Superose 6, Sephadex G-200 (Pharmacia), és a Bio-Gel P-300 (BioRad) gyantákat. A legelőnyösebb gyanta a Superose 12. Sokféle különböző puffer elfogadható a géliszűrési eljárásokhoz, a tisztítandó molekula jellemzőitől függően. A találmány szerinti PLA_2 -höz az előnyös géliszűrő puffer az alábbi: 30 % etilén-glikol vízben, 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl (pH 8).

A molekulaméret szerinti szétválasztás előtt az f.) lépésben kapott koncentrált, PLA_2 -t tartalmazó mintán az oldószer

ugyanarra az oldószerre cseréljük le, mint amellyel a molekula-méret szerint szétválasztó oszlopot elő-egyensúlyoztuk. A PLA_2 -t tartalmazó mintán az oldószert sokféle ismert technikával lecserélhetjük, pl. (a korlátozás szándéka nélkül) dialízissel és a koncentrációt követő hígítással.

A h.) lépés az eljárás utolsó lépése; ez a találmány szerinti PLA_2 -t homogenitásig tisztítja. A g.) lépésben kapott, PLA_2 -t tartalmazó oldatot hidrofób kölcsönható gyantával hozzuk érintkezésbe olyan pufferolási körülmények között, amelyek csak gyenge kölcsönhatást tesznek lehetővé a PLA_2 és a gyanta között. Azok a hidrofób kölcsönható gyanták és oszlopok, amelyek megfelelők és előnyösek voltak az e.) lépésben, ebben a lépésben is alkalmasak. Optimális pufferolási körülményeket alkalmazva a PLA_2 átjutása a gyantán keresztül gátolt, miközben a szennyező molekulák vagy a gyantához kötődnek, vagy akadálytalanul keresztüláramlanak a gyantán. Akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy a h.) lépés végrehajtására az oszlopkromatográfia (CC) az előnyös eljárás. Az előnyös puffer, amelyben a PLA_2 -t tartalmazó mintát a h.) lépéshez előkészítjük, és amellyel az oszlopot futtatjuk, az alábbi: 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl (pH 8). Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy a PLA_2 ezek között a pufferolási körülmények között gyengén kötődik a gyantához, és a mosási fázis során elhagyja a gyantát. A mosási folyamatot követő gradiens elució nem esszenciális lépése az eljárásnak, és csak akkor feltétlenül szükséges, ha az oszlopot meg akarjuk tisztítani a következő felhasználáshoz. Akárcsak az előző lépésekben, az oszlopról lejutó frakciókat meg kell vizsgálni PLA_2 aktivitásra, és azokat a frakciókat, amelyek csúcs-aktivitást mutatnak, egyesíteni és koncentrálni kell, amint fentebb tárgyaltuk.

Az aktív citoszól PLA_2 -t, amelyet a találmány szerinti eljárással homogenitásig tisztítottunk, sokféle módon tárolhatjuk. Azok az előnyös tárolási eljárások, amelyek nem hatnak károsan a tisztított PLA_2 enzimaktivitására. A szakterületen számos tárolási eljárás ismeretes, beleértve pl. a tárolást tartósító pufferban, vagy a tárolást liofilezett porként 4°C , -20°C vagy -70°C hőmérsékleten. A találmány szerinti PLA_2 tárolásának legelőnyösebb módja a tárolás oldatban -20°C hőmérsékleten, ahol az oldatot e célra az alábbi módon készítjük el. Egy rész végső oszlop puffert (amely a PLA_2 -t tartalmazza) összekeverünk 2 rész alábbi oldattal: 75 % glicerin/25 % puffer [150 mmól/l NaCl, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8)]. Ehhez 2-ME-t adunk olyan mennyiségben, hogy végső koncentrációja 2 mmól/l legyen.

Az alábbi kiviteli példák segítenek megismertetni a találmány szerinti eljárás gyakorlati kivitelezését és bemutatják a találmány által oltalmazott PLA_2 enzimek jellemzőit.

1. példa

U937 sejtek tenyésztése

A humán leukémia monoblasztoid sejtvonalat az American Type Culture Collection-tól (ATCC) szerezzük be. A sejtvonal a törzsgyűjtemény állandó tagja, és bárki számára rendelkezésre áll ATCC CRL 1593 deponálási számon. Az U937 sejteket DMEM/F-12 tenyészetben tartjuk fenn (kereskedelmi termék: GIBCO Laboratories, Grand Island, New York), amely az alábbiakkal van kiegészítve: 5 % borjúembrió szérum (HyClone Laboratories, Logan, Utah), 4 mmól/l L-glutamin (Tanabe USA, San Diego, Kalifornia), 0,02 % Pluronic F-68 (BASF Corporation, Parsippany, New Jersey), 1 mmól/l CaCl_2 , 50 µg/ml tobramicin (Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana), 20 mmól/l HEPES (USB, Cleveland, Ohio), 2,2 g/l NaHCO_3 ,

100 μ mól/l etanol-amin (Sigma Chemical, St.Louis, Missouri).

A.) Felengedtetési munkamenet.

Az ATCC-től kapott ampullát, amely 1 ml sejtszuszpenziót tartalmaz, kivesszük a szárazjeges tartályból és élénken kevertetett 37°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyezzük, és ott tartjuk, amíg a jég felolvad. Ettől a ponttól kezdve minden műveletet steril technikákkal végzünk. Az ampullát kinyitjuk, tartalmát kivesszük, és 15 ml-es, steril kúpos centrifugacsőbe visszük át. 9 ml tápközeg hozzáadása után (37°C hőmérsékleten) a csövet 1000 fordulat/percnél centrifugáljuk 10 percen át asztali centrifugán (Damon/IEC Division, Needham Heights, Massachusetts). A tápközeget dekantáljuk és a sejtüledéket újra szuszpendáljuk 50 ml tápközegben (37°C hőmérsékleten), majd átvisszük egy T-75 típusú szövettenyésztő lombikba (Corning Glass, Corning, New York); ezt azután 37°C hőmérsékletű inkubátorba helyezzük, amely 5 % CO₂-95 % levegő arányra van kiegyensúlyozva (Forma Scientific, Marietta, Ohio).

B.) A sejtek növesztése

Amikor a sejtszám eléri a $1-1,5 \cdot 10^6$ sejt/ml-t, amint ezt Coulter Counterrel meghatározzuk (Coulter Electronics, Hialeah, Florida), a tenyészetet átvisszük 450 ml friss növesztő tápközegbe (így összesen 500 ml lesz), 500 ml-es steril mikrohordozó keverő lombikba (Bellco Biotechnology, Vineland, New Jersey), és 50 fordulat/perccel kevertetjük mikrohordozó mágneses keverő alkalmazásával, 5 %-os CO₂ inkubátorban 37°C hőmérsékleten. Amikor a sejtsűrűség eléri az $1-1,5 \cdot 10^6$ értéket, az 500 ml-es sejtszuszpenziót 5,5 liter tápközegbe visszük át 37°C hőmérsékleten 6 literes mikrohordozó keverőlombikba (Bellco). A keverőlombikba 0,2 mikron nyílású szűrők illeszkednek (Gelman Sciences, Ann

Arbor, Michigan) úgy, hogy a fejteret folyamatosan el lehessen látni gázzal, mégpedig az alábbi keverékkel: 5 % szén-dioxid, 25 % oxigén, 70 % nitrogén. A keverést 50 fordulat/perccel végezzük 37°C hőmérsékleten. Amikor a sejtsűrűség eléri az $1-1,5 \cdot 10^6$ sejt/ml értéket, az 5 liter sejtszuszpenziót mintegy 36 liter tápközegbe helyezzük 37°C hőmérsékleten steril 36 literes rendszerben [Biotech Overhead Drive System (Bellco)]. A tenyészetet gázt, mégpedig 70 % nitrogént, 25 % oxigént, és 5 % szén-dioxidot tartalmazó gázt áramoltatunk, egy sterilítást biztosító nyílású szűrőn keresztül. Az oldalnyílások egyikén keresztül Pasteur pipetta illeszkedik, ezen keresztül is gázt áramoltatunk, az áramlást 5-10 buborék/másodperc mennyiségre állítva be. A tenyészetet 6-7 fordulat/perccel kevertetjük és 37°C hőmérsékleten inkubáljuk. Naponta végzünk sejtszámlálást, és amikor a sejtsűrűség eléri a mintegy $1 \cdot 10^6$ sejt/ml-t, a tenyészetet nagyon kis sebességgel 100 % oxigént áramoltatunk át.

C.) Kinyerési munkamenet

Amikor a tenyészet eléri a $2-3 \cdot 10^6$ sejt/ml sűrűséget, a növesztő edény tartalmát steril, 50 literes ballonba (Nalgene, Rochester, New York) visszük át. A ballont lefedjük és 4°C hőmérsékleten tároljuk mintegy 48 órán át, hogy a sejteket hagyjuk a tartály fenekére leülepedni. Ezután minden lépést 4°C hőmérsékleten végzünk, és steril műveletek nem szükségesek. A tápközeg legnagyobb részét a ballon tetejéről leszívjuk és eldobjuk, és csak 5-6 liter sejtszuszpenziót hagyunk meg. A ballont megforgatjuk, hogy a sejteket újra szuszpendáljuk a tápközegbe, és a sejtszuszpenziót 6 db 1 literes centrifugaedénybe (Nalgene, Rochester New York) öntjük át. Az edényeket 30 percen át centrifugáljuk 2500 fordulat/percnél IEC centrifugában (Damon/IEC,

Needham Heights, Massachussets). A felülúszót eldobjuk, és a sejteket két liter alábbi összetételű oldattal mossuk: 140 mmól/l NaCl, 5 mmól/l KCl, 2 mmól/l etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 25 mmól/l trisz.HCl (pH 7,4). A mosott sejtüledékeket egyesítjük és újra szuszpendáljuk 10^8 sejt/ml sűrűsége (mintegy 10 mg/ml fehérje) az alábbi oldatban: 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l EDTA, 50 mmól/l trisz.HCl, 100 mól/l leupeptin (pH 8); ilyen módon mintegy 500 ml sejtszuszenziót, vagyis 5 g sejtfehérjét kapunk.

2. példa

A foszfolipáz A₂ tisztítása

A.) Az U937 citoszól frakció előállítás:

1 mmól/l, illetve 100 mól/l PMSF és pepsztatin hozzáadása után (olyan kombinált metanolos törzsoldatból, amely 200 mmól/l, illetve 20 mmól/l koncentrációjú), a sejteket átvisszük egy előhűtött Parr sejtzúzó bombába (Parr Instr.Co., Moline, Illinois), mágneses keverővel kevertetjük 4°C hőmérsékleten 20 percen át $4 \cdot 10^6$ Pa nitrogénnyomáson, és lizáljuk a nyomás kiengedésével. A sejt-lizátumot centrifugáljuk (1500 000 xg, 60 perc, 4°C), és az így létrejövő felülúszót összegyűjtjük. Az oszlopkromatográfia előtt ezt a sejt-extraktumot szűrjük először sejtkenőn keresztül, majd Millipak-40 szűrőn (0,22 μ m, Millipore, Bedford, Massachussets), változtatható sebességű perisztaltikus szivattyút alkalmazva.

B.) Sepharose Q anioncserélő kromatográfia

A citoszól frakciót (2-3 g fehérje) 3,2 x 14 cm-es Fast Flow Sepharose Q oszlopra (Pharmacia) visszük fel, amely oszlopot előzőleg 6 ml/perc sebességgel kiegyensúlyoztunk az alábbi oldattal: 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl (pH 8). Az oszlopot 500 ml ugyanilyen összetételű pufferral mossuk, és az eluciót úgy végezzük, hogy 1500 ml lineáris sógradienst

fejlesztünk ki 2 mmól/l 2-ME-t, 1 mmól/l EGTA-t és 25 mmól/l trisz.HCl-t tartalmazó oldatban, 150 mmól/l és 500 mmól/l NaCl határok között, és 12 ml-es frakciókat gyűjtünk. Az oszlop-eluátumokat 280 nm abszorbanciánál mérjük (AUF 2,0), és az egyes frakciókból 2,4 ml-es alikvotokat mérünk PLA₂ aktivitásra. A PLA₂ mintegy 380 mmól/l NaCl-nél eluálódik, a 47-56. frakciónál (120 ml). Ezeket a frakciókat összegyűjtjük és 25 ml-re koncentrálnak, Amicon ultraszűrő kevertetett cellát alkalmazva YM 30 membránnal.

C.) Hidrofób kölcsönható kromatográfia

Az anioncserélő gyantáról lejöő koncentrált csúcsfrakciókat Phenyl-Superoze HR 10/10 oszlopra (Pharmacia) visszük fel, amelyet az alábbi oldattal elő-egyensúlyoztunk: 500 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8); 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmazunk és 4 ml-es frakciókat gyűjtünk. Miután az oszlopot átmostuk 120 ml azonos összetételű pufferrel, 120 ml lineáris gradienst alakítunk ki 0,75 ml/perc áramlási sebességgel, 1 rész oszlop-puffert és 1 rész eluciós puffert [50 % etilén-glikol, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8)] alkalmazva. Az oszlop eluátumát 280 nm-es abszorbanciával követjük, és az egyes frakciókból 2,4 ml-es alikvotokat vizsgálunk PLA₂ aktivitásra. A PLA₂ széles csúcsként eluálódik a 15-45 % etilén-glikol tartományból, a 32-52. frakciókból (40 ml). Ezeket a frakciókat összegyűjtjük, először Amicon kevertetett cellákban (YM 30 membránnal), majd Centricon -30 mikrokonzentrátorokban (Amicon) koncentrálnak, újra szuszpendáljuk 15 térfogat alábbi összetételű oldatban: 30 % etilén-glikol, 2 mmól/l 2-ME, 150 mmól/l NaCl, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8), majd újra koncentrálnak 2 ml-re.



D.) Superose 12 gélszűrés

A hidrofób kölcsönható oszlopokból kapott koncentrált csúcsfrakciókat (mintegy 5 mg fehérje) összegyűjtjük és kromatografáljuk egymással sorba kapcsolt Superose 12 oszlopokon (mindegyik 1,6 x 50 cm), amelyeket előzőleg az alábbi oldattal egyensúlyoztunk ki: 30 % etilén-glikol, 2 mmól/l 2-ME, 150 mmól/l NaCl, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8); az áramlási sebesség 0,15 ml/perc, és 1,5 ml-es frakciókat gyűjtünk. Az oszlop-eluátumokat 280 nm-nél mért abszorbanciával követjük, és az egyes frakciókból 2,5 ml-es alikvotokat mérünk PLA₂ aktivitásra. Az enzimaktivitás a 38-47. frakciókban eluálódik (15 ml). Ezeket a frakciókat összegyűjtjük és mikrokonzentrátorokban (Amicon) koncentrálnak. A koncentrált mintákat (mintegy 80 µl koncentrátoronként) egyenként újra szuszpendáljuk 2,5 ml alábbi összetételű oldatban: 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8) (így a végső etilén-glikol koncentráció < 1 %), újra koncentrálnak mintegy 80 µl-re, majd összegyűjtjük, így kapunk < 650 µl végső térfogatot.

E.) Hidrofób kölcsönható kromatográfia

A gélszűrő oszlopból kapott koncentrált mintát (mintegy 1 mg fehérje) 1 ml-re hígítjuk az alábbi oldatot alkalmazva: 150 mmól/l NaCl, 1 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8). A mintát Phenyl-Superose HR 5/5 oszlopra (Pharmacia) visszük fel, amelyet előzőleg ugyanolyan pufferral egyensúlyoztunk ki, mint amelyet a hígításhoz használtunk; 0,25 ml/perc áramlási sebességet alkalmazunk és 0,5 ml-es frakciókat gyűjtünk. Az oszlop mosása után 8 ml ugyanilyen pufferral 10 ml lineáris gradienst alkalmazunk 0,25 ml/perc áramlási sebességgel, ^{felhasználva} egy rész oszlop-puffert és egy rész eluciós puffert [50 % etilén-glikol, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8)]. Amint korábban

tárgyaltuk, elució csak akkor szükséges, ha helyre akarjuk állítani az oszlopot az újabb felhasználáshoz. Az oszlop eluátumot 280 nm-nél mért abszorbanciával követjük, és az egyes frakciókból 2 μ l-es alikvotokat mérünk PLA₂ aktivitásra. A PLA₂ aktivitás a 7-20. frakciókban tűnik fel (7 ml). Ezeket a frakciókat összegyűjtjük, koncentrálnjuk mintegy 60 μ l-re, először Centricon-30 mikrokonzentrátorokat (Amicon), majd Ultrafree-MC 10000 NWWL szűrőegységet (Millipore, Bedford, Massachusetts) alkalmazva. Mintegy 100 μ g fehérjét nyerünk ki.

F.) Eredmények

Az 1. táblázat összefoglalja a találmány szerinti 1. és 2. példákban ismertetett eljárás eredményeit. Az adatokat kombinált tisztításokból alakítottuk ki, két 40 literes készítményt tisztítva az f.) lépésig, majd ezeket egyesítve a g.) és h.) lépésekhez.

1. TÁBLÁZAT

Az 1. igénypont lépései		Fehérje (mg összes)	Fajlagos (mE/mg)	összes kiter- melés PLA ₂ (mE)	tisztítás (%)	tisztítás (hányszoros)
a)	N ₂ kavitáció	15621	0.05	748	-	-
b)	UC 150,000xg	6066	0.31	1882	100	3
c)és d)	Q-SEpharose	293	3.74	1095	58	31
e)és f)	Phenyl-Superose	6.3	76.0	529	29	630
g)	Superose 12	0.5	517	265	14	4289
h)	Phenyl-Superose	< 0.1	> 1722	172	9	> 14278

Az 1. ábra egy 12 %-os, redukáló körülmények közt végzett SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) futtatás reprodukciója Laemmli szerint [Laemmli: Nature 227, 680 (1970)]. A gél egyes vonalai azokat a fehérjemintákat mutatják, amelyeket a találmány szerinti egyes tisztítási lépések eredményeként izoláltunk. A 7. vonal azt mutatja, hogy a találmány szerinti eljárás eredményeképpen izolált PLA₂ lényegében tiszta, és molekulatömege mintegy 100 kD.

A 2. ábra a találmány szerint tisztított PLA₂ nem-denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisét mutatja be. Egy párhuzamos, fészetlen PLA₂ vonalat 20 szeletre hasítunk és az egyes hasítékok tartalmát eluáljuk a gélről 4⁰C hőmérsékleten egy éjszakán át az alábbi oldatban: 1 % CHAPS, 150 mmól/l NaCl, 2 mmól/l 2-ME, 1 mmól/l EGTA, 25 mmól/l trisz.HCl(pH 8) + 2 mg/ml szarvasmarha szérum albumin. Az eluátumokat PLA₂ aktivitásmérésnek vetjük alá, hogy a találmány szerinti eljárással tisztított fehérje valóban a PLA₂ enzim. A 2. ábra bemutatja, hogy a primer fehérje-csík a gélen világosan egybevágha a PLA₂ csúcs aktivitásával.

A 3. ábra a PLA₂ aktivitás-vizsgálat eredményeit ábrázolja, ahol vizsgáljuk az izolált termék Ca²⁺ igényét. A függvénygörbe két különböző vizsgálatot képvisel, amelyek világosan mutatják, hogy a találmány szerinti PLA₂ Ca²⁺-t igényel az aktivitáshoz, és maximumát mintegy 800 nmól/l Ca²⁺ koncentrációnál éri el. Ez az észlelés egyedi a találmány szerinti PLA₂-ről leírták, hogy maximális aktivitása 1 mmól/l Ca²⁺ koncentráció fölött van.

3. PÉLDA

Aminosav szekvenciaelemzés

Egy modellkísérlet megállapította, hogy az izolált PLA₂ aminoterminálisa blokkolva van, és ez nem teszi lehetővé az N-termi-

nális aminosav-szekvenciaelemzést. Ez az észlelés nem váratlan, mivel jól ismert, hogy a citoplazmás fehérjék gyakran el vannak zárva az ilyen típusú elemzéstől. Részleges aminosav-szekvenciákat kapunk olyan módon, hogy az enzimet SDS-PAGE után cianogénbromiddal (CNBr) hasítjuk. A hasított PLA₂-t azután újból futtatjuk SDS-PAGE-on, elektromos úton át visszük a foltokat fehérjekötő membránra, majd aminosav szekvenciaelemzésnek vetjük alá.

A. SDS-PAGE

20 μ l koncentrált (4x) minta puffert [8 % SDS, 40 % glicerin, 20 % 2-ME és 400 mmól/l trisz.HCl(pH 8)] összekeverünk 60 μ l, a Phenyl-Superose 5/5 oszlopról származó koncentrált frakcióval, és inkubáljuk 60°C hőmérsékleten 20 percen át, majd a mintákat SDS-PAGE-nak vetjük alá Laemmli szerint. 20 μ l-es alikvotokat (mintegy 25 g fehérje) viszünk fel 9 % SDS poliakrilamid szeparáló gélt és 5 % szálas gélt tartalmazó minigélre (5x7 cm), és elektroforézist végzünk 20 mA konstans áramerősségnél 90 percen át. Az elektroforézis után a PLA₂ csíkot láthatóvá tesszük egy lépéses, gyenge háttérű Coomassie festési eljárással [Zehr B.D., Savin T.J. és Hall R.E.: Anal. Biochem. 182, 157(1989)], és ki-metsszük a gélből. Az egyes gélseleteket kétszer mossuk 1 ml oldattal, amely 10 % ecetsavat és 5 % metanolt tartalmaz, és Eppendorf csövekben tároljuk -20°C hőmérsékleten.

B. Cianogén-bromidos hasítás

Az egyes poliakrilamid gélseleteket, amelyek találmány szerinti PLA₂-t tartalmaznak, 10 percig mossuk 1 ml vízzel, majd CNBr-nek tesszük ki (100 mg/ml) 1 ml 0,1 n HCl-ben, amely 20 % hangyasavat is tartalmaz. A CNBr-t 500 mg/ml-es, 90 % hangyasavban levő, frissen készített, 500 mg/ml-es törzsoldatból hígítjuk. Az el nem reagált CNBr-t többszöri erőteljes mosással távolítjuk

el. Egy 5 perces inkubálás 1 ml vízzel, két öt perces inkubálás 1 ml 100 mmól/l-es trisz.HCl-lel (pH 8,8), egy öt perces inkubálás 1 ml 100 mmól/l-es trisz.HCl-lel (pH 6,8), és egy 10 perces inkubálás 37°C hőmérsékleten 400 μ l minta-pufferral [2 % SDS, 10 % glicerin, 5 % 2-ME és 100 mmól/l trisz.HCl (pH 6,8), az oldat 0,002 % brómfenolkéket is tartalmaz] eltávolítja a CNBr-t a gél-szeletekből. A szeleteket -70°C hőmérsékleten tároljuk, amíg ezeket elektroforézisnek vethetjük alá.

C. SDS poliakrilamid gélelektroforézis és fehérje-átvitel

A gél-szeletekről származó fehérjéket elektroforézisnek vethetjük alá 5 % szálaló gélt és 14 % szeparáló gélt tartalmazó SDS poliakrilamid gélen. Az elektroforézis után a gélt transzfer pufferekben [10 mmól/l 3-(ciklohexil-amino)-1-propánszulfonsav, 10 % metanol (pH 11)] áztatjuk 5 percig és elektromos foltátvitelt végzünk 4°C hőmérsékleten polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (Immobilon; 45 μ m pórusméret, Millipore, Bedford, Massachusetts) 2 órán át 250 mA áramerősséggel [Matsudaira P.: J. Biol. Chem. 262, 10035 (1987)]. A CNBr peptideket a PVDF membrán Coomassie Blue-250-nel végzett festésével tesszük láthatóvá. A membránt erőteljesen leöblítjük ionmentesített vízzel, megszárítjuk és -20°C hőmérsékleten tároljuk. A 4. ábra mutatja be az átvitt hasítási termékeket és a molekulatömeg-standardokat. Hét elkülönült csík látható a PLA₂ vonalban, jelezve, hogy a találmány szerinti PLA₂-t a CNBr kezelés csak részben hasítja.

C. Aminosav szekvenciaelemzés

Három fő csíkot (2., 3. és 4. peptidek), amelyek az elektroforézis és elektromos folt átvitel után láthatóvá váltak, kimentszünk és automatizált Edman lebontásnak vethetjük alá, Applied Biosystems 477A Pulsed Liquid Sequencer berendezést alkalmazva, amely



fel van szerelve 900 A típusú adatrendszerrel [Hewick R.M. és munkatársai: J. Biol. Chem. 256, 7990 (1981)]. A foltokban átvitt CNBr peptidet (amely a teljes PLA₂ készítményből származik) tartalmazó PVDF membránokat polibren-nel kondicionált szűrő tetejére helyezzük, amint ezt a fehérje szekvenciaelemző készülék gyártója javasolja. Az így kapott fenil-tio-hidantoin aminosavakat on-line elemezzük, Applied Biosystems 120A PTH aminosav elemző berendezésen, amely PTH-C18 oszloppal (2,1x220 mm) van felszerelve. A 4. peptid 26 amino-terminális aminosava Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Thr-Ile-Ile-Tyr-Phe-Val-Leu-Ala-Asn-Ile-Asn-Phe-Arg-Lys-Tyr-Lys-Ala-Pro-Gly-Val-Pro. A 3. peptid kísérleti szekvenciája az alábbiak adható meg: Leu-Lys-Leu-Pro-Phe-Pro-Tyr-Val-Glu-Leu-Phe-Ile-Glu-Lys-Ile-Pro-Arg. A 2. peptidnek, úgy tűnik, azonos a szekvenciája, mint a 4. peptidnek.

4. PÉLDA

PLA₂ aktivitásmérés

A szubsztrátumot, az 1-palmitoil-2-[¹⁴C] arachidonoil-sn-glicero-3-foszfokolint ([¹⁴C]PC; 55 mCi/mmól; NEN Research Products) és sn-1,2-dioleoglicerint (DG, Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama) 2:1 mólarányban tartalmazó liposzómákat, az alábbiak szerint állítjuk elő. A [¹⁴C]PC-t (20 nmól, 1.10⁶ dpm, 100 μ Ci/ml toluol/etanolban) és DG-t (10 nmól, 100 μ g/ml kloroformban) nitrogén alatt szárítjuk. A lipideket 1 ml alábbi összetételű oldatban diszpergáljuk: 150 mmól/l NaCl, 50 mmól/l HEPES (pH 5) (vizsgálati puffer), a diszpergálást 4⁰C hőmérsékleten Microson vizsgáló ultrahangberendezésen (Heat-systems, Ultrasonics) ultrahang-kezeléssel végezve 4x15 másodpercig, 45 másodperces intervallumokkal. Szarvasmarha szérum albumint

(lényegében zsírsavmentes, 100 mg/ml-es vizes törzsoldatból; Sigma) adunk hozzá 4 mg/ml végső koncentrációig. A PLA₂ aktivitásra vizsgálandó mintákat 50 μ l liposzómával (0,5 nmól [¹⁴C]PC, 50 000 cpm, amely 0,25 nmól DG-t tartalmaz) inkubáljuk 0,2 ml teljes térfogatban, 1 mmól/l CaCl₂-t és 1 mmól/l 2-ME-t is tartalmazó vizsgálati pufferban, 37⁰C hőmérsékleten inkubálunk 15 percen át, és a reakciót 2 ml Dole-reagens hozzáadásával állítjuk le (2-propánol/heptán/0,5 mól/l kénsav 40:10:1, és 10 μ g/ml sztearinsavat is tartalmaz). Ezután hozzákeverünk 1,2 ml heptánt, majd 1 ml vizet. A keverékeket rövid ideig Vortex-kezelésnek vetjük alá, és a felső fázist 2 ml heptánt és 150 mg, használat előtt 130⁰C hőmérsékleten aktivált Bio-Silt (BioRad Laboratories) tartalmazó csőbe visszük át. A csöveket alaposan átkeverjük Vortexen, majd centrifugáljuk (1000xg 5 percen át). A felülúszót szcintillációs csövekbe dekantáljuk. 10 ml folyadékszscintillációs koktélt (Ready Protein⁺, Beckman) adunk hozzá, majd mérjük a radioaktivitást Packard 150 modell folyadékszscintillációs számlálón. A nagy radioaktivitás érték korrelációban van az enzimaktivitással.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1.) Eljárás lényegében tiszta formájú citoszól foszfolipáz A_2 izolálására biológiai sejtekből, azzal jellemezve, hogy

a.) az említett sejteket lizáljuk;

b.) a sejtlizátumot frakcionáljuk, így sejttörmeléktől, organelumoktól és membránoktól lényegében mentes, fehérjeszerű oldatot kapunk;

c.) az említett fehérjeszerű oldatot olyan anioncserélő gyantával hozzuk érintkezésbe, amely a fehérjeszerű oldatban levő foszfolipáz megkötésére képes;

d.) az említett foszfolipáz A_2 -t eluáljuk az említett anioncserélő gyantáról;

e.) a d.) lépésben kapott, foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot érintkezésbe hozzuk olyan hidrofób kölcsönható gyantával, amely az említett foszfolipáz A_2 megkötésére képes;

f.) az említett foszfolipáz A_2 -t eluáljuk az említett hidrofób kölcsönható gyantáról;

g.) a foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot molekulaméret szerinti kromatografálással elkülönítjük az együtt eluálódó szennyeződésektől; és

h.) a g.) lépésben kapott, foszfolipáz A_2 -t tartalmazó oldatot érintkezésbe hozzuk valamely hidrofób kölcsönható gyantával olyan körülmények között, amely csak gyenge kölcsönhatást tesz lehetővé a PLA_2 és a gyanta között.

2.) Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy biológiai sejtként U937 humán leukémia monoblasztoid sejtet alkalmazunk.

3.) Eljárás citoszól PLA_2 inhibitorok átvizsgálására azzal jellemezve, hogy

- a.) a vélt citoszól PLA_2 inhibitort jelzett citoszól PLA_2 -liposzóma szubsztrátum vizes szuszpenziójába helyezzük;
- b.) a jelzett citoszól PLA_2 -liposzóma szubsztrátumot a vizes fázisból elkülönítjük; és
- c.) a jelzés meglétét vagy távollétét kimutatjuk.
- 4.) Polipeptid azzal jellemezve, hogy Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Thr-Ile-Ile-Tyr-Phe-Val-Leu-Ala-Asn-Ile-Asn-Phe-Arg-Lys-Tyr-Lys-Ala-Pro-Gly-Val-Pro aminosavszekvenciát foglal magában, PLA_2 aktivitással bír, molekulatömege mintegy 100 kilodalton, és maximális enzimaktivitását 1 mikromól/l értéknél kisebb kalcium-koncentrációnál éri el.
- 5.) Polipeptid azzal jellemezve, hogy Leu-Lys-Leu-Pro-Phe-Pro-Tyr-Val-Glu-Leu-Phe-Ile-Glu-Lys-Ile-Pro-Arg aminosavszekvenciát foglal magában, PLA_2 aktivitással bír, molekulatömege mintegy 100 kilodalton, és maximális enzimaktivitását 1 mikromól/l értéknél kisebb kalcium-koncentrációnál éri el.
- 6.) Polipeptid azzal jellemezve, hogy Leu-Lys-Leu-Asn-Pro-Thr-Ile-Ile-Tyr-Phe-Val-Leu-Ala-Asn-Ile-Asn-Phe-Arg-Lys-Tyr-Lys-Ala-Pro-Gly-Val-Pro és Leu-Lys-Leu-Pro-Phe-Pro-Tyr-Val-Glu-Leu-Phe-Ile-Glu-Lys-Ile-Pro-Arg aminosavszekvenciákat foglal magában, PLA_2 aktivitással bír, molekulatömege mintegy 100 kilodalton, és maximális enzimaktivitását 1 mikromól/l értéknél kisebb kalcium-koncentrációnál éri el.

17. oldal
+ 18. oldal

18. oldal
19. oldal
20. oldal

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1051 BUDAPEST, DÁNYI UTCA U. 10.
TELEFON: 153-3733

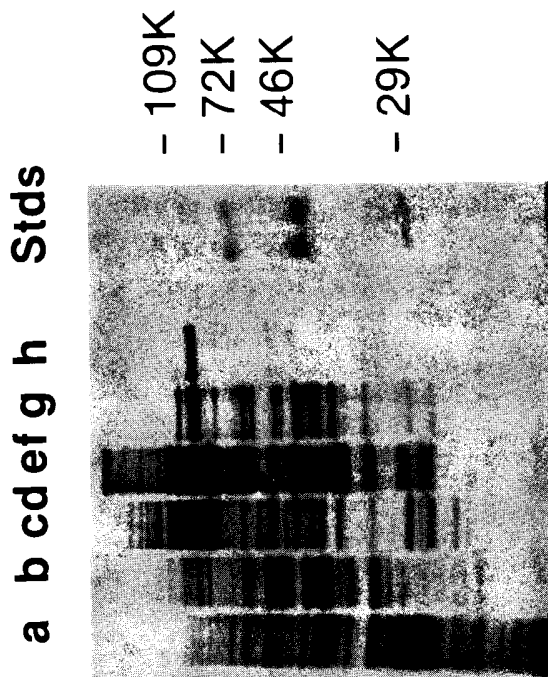
2778/94

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY HUNGARY

20032

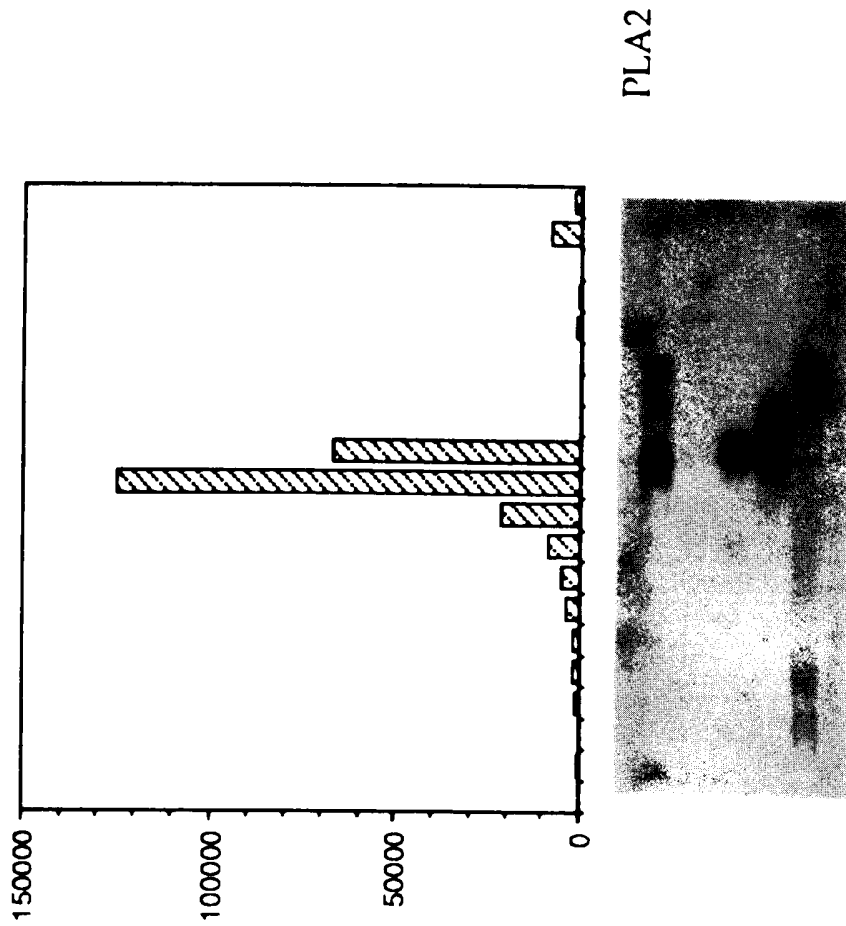
1993

FIG. I



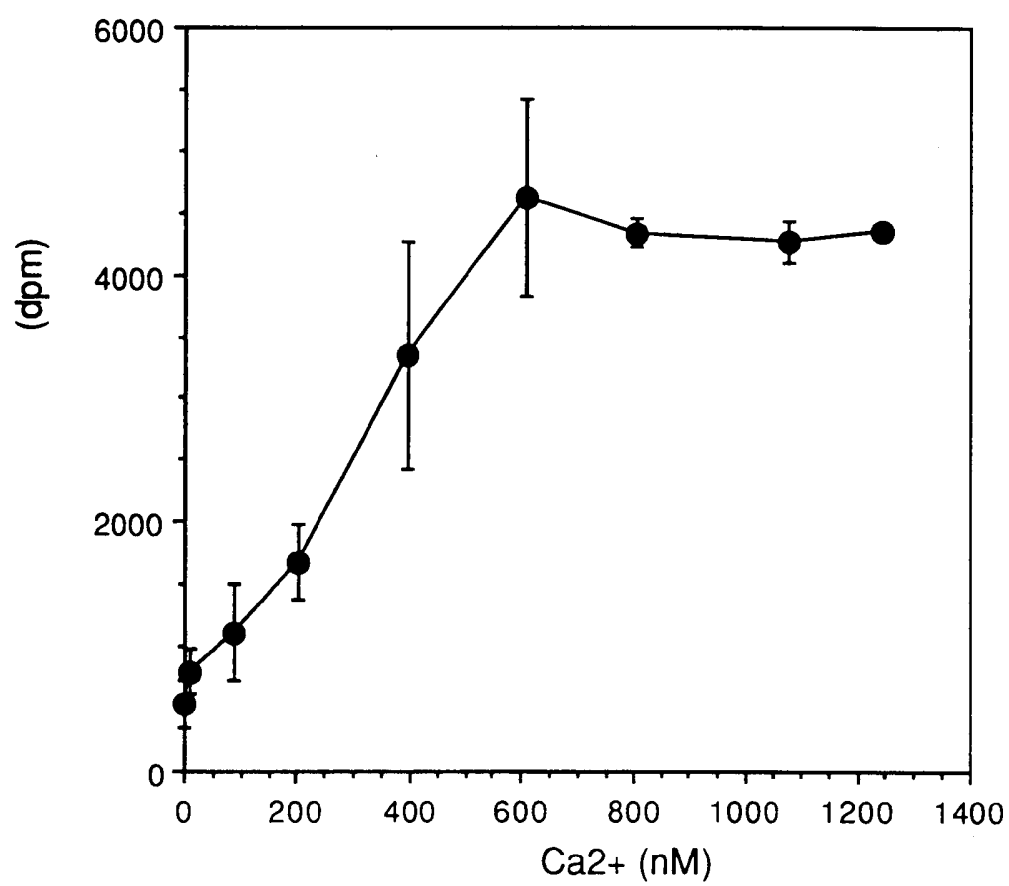
BUDAPESTI
1061 BUDAPEST
TITEL 13-2003

FIG. 2



BUDAPESTI MUNKÁSIKÖZVETŐ
KÖZVETŐI
1061 BUDAPEST
ATTENTION: [Signature]

FIG. 3



S.R.G. 247
BUDAPESTI KÖZLEKESZÉSI VÁLLALAT
1061 BUDAPEST
TELEFON: 1-23-11

FIG. 4

