

73.437/SZE

A2

KIVONAT

VEGYÜLET VIZSGÁLAT

A jelen találmány vegyületek potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárást biztosít nematoda fonalférgeket alkalmazva, elsősorban, de nem kizárólag *C. elegans* nematodát használva. Részletesebben, a jelen találmány olyan nematódák alkalmazásával kapcsolatos, melyeket úgy módosítottunk, hogy bizonyos tulajdonságokkal rendelkezzenek, mely tulajdonságok előnyt jelentenek a vegyület szkrínelésben, például folyamatos garat pumpálással, fokozott bél permeabilitással vagy megváltozott bél molekuláris transzporttal jellemezhetők. A megfelelően módosított nematódák nematoda populációból való kiválasztására szolgáló módszert is biztosítunk.



2002.06.24.



73.437/SZE

FO 200705

VEGYÜLET VIZSGÁLAT

A jelen találmány a genetikai farmakológia területéhez tartozik, különösen vegyületek potenciális farmakológiai aktivitásának nematódákat alkalmazó szkrínelésével kapcsolatos, a nematóda főként, de nem kizárólagosan *Caenorhabditis elegans*. Részletesen, a jelen találmány olyan nematódák alkalmazásával kapcsolatos, melyeket úgy módosítottunk, hogy olyan tulajdonságokkal rendelkezzenek, mely tulajdonságok a vegyület szkrínelésben felhasználhatók, valamint biztosít egy a megfelelően módosított nematódák nematóda populációból való kiválasztására szolgáló módszert.

A *Caenorhabditis elegans* egy a talajban természetesen előforduló nematóda, mely könnyen tenyészthető laboratóriumban a táplálékát jelentő baktériumokkal, előnyösen *E. coli*-val inokulált tápagon vagy folyékony tápközegben. Minden nematóda körülbelül három nap alatt fejlődik embrió állapotból 1 mm hosszúságú felnőtt fonalféreggé. Miután élete minden fázisában teljesen átlátszó, a sejtosztódás, a migráció és a differenciálódás is látható az élő állatokon. Ezenkívül, bár anatómiája egyszerű, szomatikus sejtjei a leginkább differenciálódott szövet típusokat



képviselik, például az izmokat, neuronokat, belet és az epidermiszt. Ennek megfelelően, a vad típusú nematódákétól eltérő fenotípusos különbségek könnyen megfigyelhetők közvetlen mikroszkópos megfigyeléssel, vagy szelektív festési eljárásokkal. Számos *C. elegans* mutánst azonosítottak és fenotípusaikat leírták, például *C. elegans* II ed. Riddle, Blumenthal, Meyer and Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Ezenkívül, standard eljárások ismertek a mutáns nematódák előállítására, amit a szelektált *C. elegans* gének mutációjával érünk el, lásd például J. Sutton and J. Hodgkin "The Nematode *Caenorhabditis elegans*", ed. William B. Wood and the Community of *C. elegans* Researchers CSHL, 1988, 594-595; Zwaal et al., "Target - Selected Gene Inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a Frozen Transposon Insertion Mutant Bank", 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7431-7435; Fire et al., Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *C. elegans* 1998, Nature 391:860-811.

A *C. elegans* genomot teljesen megszekvenálták és rendelkezésre áll egy nyilvános adatbázisban: http://www.sanger.ac.uk/projects/c_elegans. A *C. elegans* genom szekvenálási projectnek köszönhetően kiderült, hogy a *C. elegans* olyan génekkel rendelkezik, melyek ekvivalensei a legtöbb vagy az összes állatban, ideértve az embert is, megtalálhatók.

Azt a lehetőséget, hogy a *C. elegans* hasznos lehet külső molekulák és specifikus gének közötti kölcsönhatások megállapítására a *C. elegans* fenotípusok - melyeket az adott vegyületeknek való exponálás és a kiválasztott mutációk hoznak létre - összehasonlítása révén Rand és Johnson vette figyelembe (Methods of Cell Biology, Chapter 8., vol. 84, *Caenorhabditis elegans* : Modern Biological analysis of an Organism ed. Epstein and Shakes, Academic Press, 1995 és J. Ahringer in Curr. Op. in Gen. and Dev. 7:410-415, 1997).



Rand és Johnson nevezetesen olyan vegyület szkrínelési eljárásokat írtak le, melyekben a tesztelendő vegyület különböző koncentrációit adták tápagarhoz vagy tápleveshez, melyet azután baktériummal oltottak be, majd a nematódákkal inokulálták. A nematóda a vegyületnek való exponálás eredményeként bekövetkező bármilyen fenotípusos változását megfigyelték.

Bár a nematódák, különösen a *C. elegans* hatékony és eredményes eszközt biztosít a farmakológiai szempontból aktív molekulák azonosításában vagy felfedezésében, a jelenleg ismert vegyület szkrínelési technikáknak vannak hátrányaik is. Egy adott probléma az, hogy a *C. elegans*, a magasabbrendű szervezetekhez hasonlóan olyan fiziológiai korlátokkal van megáldva, amik megakadályozzák vagy minimalizálják az idegen és potenciálisan veszélyes anyagok behatolását. Miután normálisan a pizsokban él, ez a nematóda nagyszámú pgg és mdr gént (2. táblázat) fejlesztett ki magában, ennél fogva magas detoxifikációs kapacitással rendelkezik, ami a laboratóriumi szer feltárási célok szempontjából hátrányos. A múltban ezen akadályok legyőzésének egyetlen módja az volt, hogy a nematódákat a tesztelendő vegyület nagy koncentrációinak tették ki, például millimoláris mennyiségeknek. Ez azért nem megfelelő, mert sok a *C. elegans*-ban szkrínelendő vegyület csak mikromoláris mennyiségben szerezhető be, vagy gazdaságilag nem megvalósítható az ennél magasabb, bármilyen koncentrációban való alkalmazás. Ezenkívül, a vegyületek magasabb koncentrációi a baktériumok elpusztulását és ezen keresztül a nematódák éhezését okozhatják. Azt is megfigyelték, hogy a vegyületek kikristályosodnak, ha nagyobb koncentrációkban alkalmazzák őket.

Ha a vegyület egy adott célt kell elérjen a *C. elegans* -ban, le kell küzdje a garatban, a bélben és/vagy a kutikulában található akadályokat. A *C. elegans* úgy táplálkozik, hogy felveszi a táplálékát (például a baktériumokat) tartalmazó folyadékot. Ezután kiköpi a folyadékot,



összeűzza a tápanyag részecskéket, majd a bélcsatornába továbbítja. Ezt a folyamatot a garat izmai végzik. A folyadék felvételt és az azt követő kiköpést garati pumpálásnak nevezik. Miután ezt a pumpálási folyamatot elsősorban a tápanyag jelenléte serkenti, a garat nem pumpál folyamatosan a vad típusú *C. elegans*-ban. Ennek eredményeként, ha a nematódákat folyadék tenyészetbe helyezzük egy festékanyag jelenlétében, lassú felvételt és nagy eltéréseket találunk az egyes megfigyelt nematódák között.

Ha a teszt vegyület bekerül a bélcsatornába, maga a bél jelenti a következő akadályt, ami megakadályozhatja, hogy a teszt vegyület elérje a nematódán belüli cél helyet. Ez a bélben levő módosító és detoxifikáló enzimeknek köszönhető, például ezek közé tartoznak a multi-szer rezisztencia fehérjék (P-glükoproteinek) és a multi-szer rezisztencia rokon proteinek.

Végül, a *C. elegans* rendelkezik egy a külvilág anyagaival szembeni természetes akadállyal, a kutikulával. Kutikula borítja a nematóda legkülső felszínét és ez borítja a garatot és a végebelet is. Főként kollagéból áll, és lényegében impermeábilis.

A jelen találmány leírói olyan vegyület szkrínelő módszereket fejlesztettek ki, melyekben a vegyület felvétel ezen korlátait eltávolították vagy csökkentették. Ezek a módszerek nagyobb érzékenységű vegyület vizsgálati módszereket biztosítanak, miközben csökkentik a vegyület általában használandó mennyiségét.

Így, a jelen találmány első aspektusával összhangban olyan, a vegyület farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló, módszert biztosítunk, ami a következőkből áll: megfigyeljük a nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotípusos változást, melynek során az említett nematóda folyamatos garati pumpálást mutat.



A "folyamatos garati pumpáláson" azt értjük, hogy folyamatos pumpálás tapasztalható a külső vagy a belső stimulusoktól függetlenül, amik normális esetben indukálnák vagy korlátoznák az ilyen pumpálást.

A nematóda esetleg folyamatos garati pumpálást mutat a megfelelő génben való, mutáció eredményeként, vagy másik lehetőségként tartalmazhat egy transzgént, ami elősegíti ezt a fenotípusos hatást. Ezenkívül, a nematóda rendelkezhet más mutációkkal vagy transzgénekkkel, ami más fenotípusos jellemző manifesztálódását eredményezheti, amire a tesztelendő vegyület lehet hatással.

A *Caenorhabditis elegans* a legelőnyösebb nematóda a jelen találmány módszerében való alkalmazáshoz. Azonban el kell fogadni, hogy a módszer elvégezhető más nematódákkal is, különösen más mikroszkópikus nematódákkal, előnyösen a *Caenorhabditis* nemzetségbe tartozó mikroszkópikus nematódákkal. A találmány szerinti használatban a "mikroszkópikus" nematóda olyan nematódákat jelent, melyek megközelítően *C. elegans* méretűek, melyek felnőtt állapotukban körülbelül 1 mm hosszúságúak. A körülbelül ilyen méretű mikroszkópikus nematódák kiválóan alkalmasak a közepes- nagy léptékű szkrínelésekben, miután ezek könnyen szaporíthatók az ilyen szkrínelés során a tudomány e területén alkalmazott típusú, több-üregű lemez üregeiben.

Ahogy korábban említettük, a garat pumpálást a *C. elegans* -ban a garat izmok segítik elő és ezen izmok összehúzódását egy sor neuron szabályozza.

A garattal és a garat pumpálással kapcsolatban álló 37 neuron és/vagy strukturális sejt listáját a 4. táblázatban mutatjuk be. Egy az ezen neuronok vagy sejtek egyikében vagy többjében megváltozott funkciót - ami folyamatos garat pumpálást eredményez - mutató nematóda előnyösen alkalmazható a jelen találmány módszereiben. Ezen módszer bizonyos kiviteli alakjaiban olyan nematódák használatát részesítjük

előnyben, melyben egy vagy több neuron megváltozott funkcióval rendelkezik, melyek jele a *C. elegans* nomenklatúrája szerint MC, M3, M4 és az NSM. Ezekről a sejtekről kimutattuk, hogy sorrendben a pumpálási sebességet, az izom relaxáció időzítését, a szűkületi perisztaltikát és a tápanyag észlelést szabályozzák.

A garat jeladásban részt vevő fő neurotranszmittereket acetilkoliniként és szerotoninként azonosították, melyek sorrendben az MC és az NSM neuronokban funkcionálnak. Más neurotranszmitterekről, mint például a glutamátról, az oktopaminról, a dopaminról, a γ -aminobutirátról (GABA) és az FMRF-ről szintén kimutatták, hogy szerepet játszanak a pumpálásban. Ennek megfelelően, az ezen neurotranszmitterek egyikének vagy többjének megváltozott szintjeit mutató bármely mutáns vagy transzgenikus nematóda alkalmas a jelen találmány szkrínelési módszerében való alkalmazásra. Például, a szerotonin megnövekedett szintjeiről tudott, hogy fokozza a garat pumpálást.

A folyamatos garat pumpálást mutató nematóda alkalmazásának alternatívájaként a vegyület szkrínelési vizsgálatok elvégezhetőek úgy, hogy a garat pumpálás szempontjából vad típusú nematódát a tesztelendő vegyületnek és egy olyan vegyületnek tesszük ki, mely indukálja vagy fokozza a garat pumpálást. Egy a garat pumpálást indukáló vagy fokozó vegyület lehet egy a fenti listán szereplő neurotranszmitter vagy ezen neurotranszmitterek bármely agonistája vagy antagonistája, például egy szerotonin agonista.

A folyamatos garat pumpálást mutató nematóda, vagy az olyan nematóda, mely további indukált garat pumpálást mutat, vegyület szkrínelési vizsgálatban való alkalmazásának előnye az, hogy a nematóda több tápközeget vesz fel a bélcsatornájába az idő függvényében, a tápközegben levő tápanyag jelenlététől függetlenül. Sőt, a tápközegben oldott vegyületből több kerül majd be a bélcsatornába. Így nagyobb koncentráció áll rendelkezésre ezen a területen a fent tárgyalt

bél korlátok legyőzésére. További előny, hogy a folyamatosan pumpáló garattal rendelkező *C. elegans* populáció sokkal inkább szinkronban fejlődik a tápközegben, mivel tápanyag felvételük sokkal szabályozottabb. Ez egyszerűbbé teszi a vegyület szkrínelés miatt elvégzendő fenotípusos megfigyelést.

A jelen találmány egy második aspektusával összhangban, egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló módszert biztosítunk, melynek során megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotípusos változást, ahol az említett nematóda fokozott bél permeabilitást vagy a bélfalon keresztüli fokozott idegen molekula felvételt mutat. A nematóda előnyösen egy mikroszkópikus nematóda, ahogy korábban meghatároztuk, még előnyösebben egy *Caenorhabditis* faj és lehet egy mutáns vagy egy transzgenikus nematóda, ami egy vagy több olyan mutációval vagy transzgénnel rendelkezik, ami fokozza a bél permeabilitást vagy felvételt, és felelős lehet egy a tesztelendő vegyület céljával összefüggésben levő, másik fenotípusos jellemző manifesztálódásáért is.

Léteznek többszörös tényezők, melyek hatással vannak a bélcsatornából a környező szövetbe történő vegyület felvételre. Ezek közé tartoznak a multi-szer rezisztencia proteinek (a P-proteinek) és a multi-szer rezisztencia rokon proteinek (MRP-k), valamint más enzimek és mechanizmusok is rendelkezésre állnak a bél falon keresztüli molekula transzporthoz. Mivel a teszt vegyületek csak a bélcsatornát érik el a garaton keresztül, előnyös, ha az idegen vegyületekkel szemben fokozott bél permeabilitást vagy fokozott bél transzportot mutató nematódák folyamatos garat pumpálást is mutatnak, így a teszt vegyület megnövekedett mennyisége kerül be a bélcsatornába és transzportálódik a környező szövetkebe.



Az idegen vegyületekkel szemben fokozott bél permeabilitást vagy fokozott bél transzportot mutató nematódák alternatív alkalmazásaként a vegyület szkrínelési vizsgálat elvégezhető úgy, hogy a bél permeabilitás és felvétel szempontjából vad típusú nematódát kiteszük a tesztelendő vegyület hatásának és egy olyan vegyületnek, mely indukálja vagy fokozza a bél permeabilitást vagy a bél felvételt. Egy ilyen vegyület olyan vegyület lehet, mely gátolja vagy csökkenti a multi-szer rezisztencia proteinek vagy multi-szer rezisztencia rokon proteinek vagy a detoxifikációs proteinek aktivitását. Ezekre példa a ciklosporin A, ami gátolja a multi-szer rezisztencia proteinek aktivitását.

Az olyan nematódák, különösen a mikroszkópikus nematódák, mint például a *C. elegans*, melyet úgy módosítottunk, hogy fokozzuk a külső kutikula permeabilitását, szintén hasznosak a vegyület szkrínelési vizsgálatokban. A fokozott kutikula permeabilitás lehet olyan nematódákban manifesztálódott tulajdonság, mely nematódák folyamatos garat pumpálást és fokozott bél permeabilitást vagy az idegen molekulák megnövekedett bél felvételét is mutatják. A fokozott kutikula permeabilitással rendelkező nematódák lehetnek transzgenikus vagy mutált nematódák, melyeket a korábban említett módon nyerünk, vagy hozunk létre, vagy másik lehetőségként úgy hozhatók létre, hogy a nematódák külső kutikuláját azzal az anyaggal kezeljük, ami kutikula permeabilitást indukál, például kollagenázzal vagy fehérítőszerrel.

Egy kiviteli alakban a vizsgálatok elvégezhetők úgy, hogy a vad típusú nematódát a tesztelendő vegyület és egy olyan enzim vagy egy másik megfelelő vegyület hatásának tesszük ki, amikutikula permeabilitást hoz létre, vagy indukál.

EI kell fogadni, hogy a fent leírt módosításokkal rendelkező nematódák szignifikáns előnyt jelentenek a vegyület szkrínelési vizsgálatokban, mivel ezek több vegyületet tudnak felvenni, így fokozzák



a vizsgálat érzékenységet, miközben csökkentik a vegyület felhasználható mennyiségét, így a költséget.

A "vegyület" kifejezésen bármilyen olyan idegen molekulát értünk, ami normálisan nem található meg a nematódákban, vagy, amivel a nematódák normálisan életciklusuk során nem találkoznak. Például, a nematódák kitehetők egy a gyógyszerkönyvben felsorolt, ismert farmakológiai aktivitású vegyület hatásának. Másik lehetőségként, a vegyület lehet olyan anyag, melyről tudott, hogy kölcsönhatásba lép egy adott biokémiai reakcióúttal vagy génnel. További alternatív lehetőség a nem ismert biológiai aktivitású, ismert molekulák, vagy a teljesen új molekulák, vagy molekula könyvtárak, melyek például létrehozhatók kombinatorikai vegyészettel, tesztelés. Nincsenek kizárva az olyan vegyületek sem, mint a DNS, RNS, PNS, polipeptidok vagy proteinek sem. A vegyületnek való kitétel hatására megváltozott fenotípussal rendelkező nematódák fénymikroszkóppal, fluoreszcensz mikroszkóp differenciáló interferencia kontraszt optikájával detektálható. Ezenkívül immunokémiai detektálás, kalorimetriás detektálás vagy fluoreszcensz, lumineszcensz vagy radioaktív jelölés detektálása is alkalmazható. Bizonyos esetekben a megváltozott tulajdonságok esetleg csak biokémiai változásokat jelentenek, és például a szaporító tápközeg pH értékében való változással vagy az elektromos potenciál változásaival detektálhatók. A különböző tulajdonságokat esetleg a nematóda fejlődési ciklusának különböző időpontjaiban kell meghatározni.

A fent leírtak szerint a fokozott vegyület felvételhez megfelelő tulajdonságokkal rendelkező *C. elegans* mutánsok a *C. elegans* mutáns gyűjteményből szerezhetők be a *C. elegans* Genetic Center-től, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, de előállíthatók standard módszerekkel is. Ilyen módszereket írt le Anderson a *Methods in Cell Biology*-ban (vol. 48, "*C. elegans*: Modern biological analysis of an organism" p:31-58). A PCR technika számos szelekciós lépése hajtható végre egy kívánt



génben delécióval rendelkező mutáns nematóda szelektálására. A célzott defektes gén expresszióval jellemezhető mutáns más előállítási módszereit Sutton és Hodgkin, Zwaal és munkatársai és Fire és munkatársai írták le, ahogy azt korábban említettük.

Ahogy korábban említettük, a bélen keresztüli fokozott vegyület felvétellel jellemezhető nematódák előállításához a mutáció, deléció vagy az egyéb módon történő kiiktatás céljait jelentő bizonyos gének, olyan gének, melyek multi-szer rezisztencia proteineket és multi-szer rezisztencia rokon proteineket kódolnak.

A folyamatos garat pumpálást mutató mutáns nematódák létrehozását illetően a módosításhoz való célzott gén olyan gén, ami az acetilkolin, szerotonin, glutamát, oktopamin, dopamin, GABA vagy FMRF neurotranszmitterek egyikének vagy akár több neurotranszmitter feldolgozásával kapcsolatos reakcióútban szerepet játszó proteint kódol, ezek szintjeinek megváltoztatása céljából.

A "feldolgozás" kifejezésen a felsorolt neurotranszmitterek szintézisét, transzportját, tárolását, felszabadítását, újra felvételét vagy lebontását értjük.

A mutáció alternatívájaként, megfelelő tulajdonságokkal rendelkező transzgenikus nematódák is létrehozhatók. A transzgenikus nematódák létrehozásához való módszerek jól ismertek a tudomány e területén, és főként Craig Mello és Andrew Fire írták le (Methods in Cell Biology, Vol. 48. Ed., H.F. Epstein and D.C. Shakes, Academic Press, 452-480).

A fent leírtak szerinti vegyület felvétel fokozását célzó vonatkozó módosítások létrehozásához a nematódán való beavatkozások után szükség van arra, hogy a kívánt tulajdonságú, különösen a kívánt tulajdonságot a legerősebben mutató, nematódákat könnyen azonosítani lehessen. A tudomány e területén rendelkezésre állnak a mutáns nematódák azonosítására szolgáló módszerek, például azok, amelyeket már felsoroltunk. Másik lehetőségként, genetikai analízis is alkalmazható.

Azonban különösen kívánatos egy a fokozott vegyület felvételt mutató nematódák detektálására specifikus módszer a.

A jelen találmány leírói kifejlesztettek egy gyorsabb és sokkal érzékenyebb módszert a kívánt mértékű garat pumpálást, fokozott bél vagy kutikula permeabilitást vagy vegyület felvételt demonstráló, módosított nematódák detektálására.

Így, a jelen találmány egy harmadik aspektusával összhangban módszert biztosít az olyan mutáns vagy transzgenikus nematódák azonosítására, melyek a potenciális farmakológiai aktivitásra tesztelendő vegyületek garaton és/vagy bélen és/vagy kutikulán keresztüli fokozott felvételét mutatják, a módszer abból áll, hogy az említett nematódát kitesszük egy a nematóda általi felvétel hatására detektálható jelet biztosító marker molekulát magába foglaló vegyület hatásának, és összehasonlítjuk az említett jel erősségét a vad típusú, és az említett marker molekulának kitett nematódából kapott jel erősségével.

Előnyösen, a marker molekulát magába foglaló vegyület olyan vegyületet jelent, ami akkor bocsát ki detektálható jelet, ha már bekerült a nematódába, például ha egy nematóda enzim hasította vagy ha olyan környezetbe kerül, ami csak a nematódán belül található.

Egy különös kiviteli alakban a jelen találmány leírói azt találták, hogy a Molecular Probes Europe BV-től (The Netherlands) beszerezhető fluoreszcens festék prekursor kalcein-AM a garaton keresztül kerül a nematódába és ezt követően, az AM egység lehasítása után, a bélcsatornában és/vagy a környező sejtekben fluoreszkál, ha átjut a bél korlátán. A fokozott garat pumpálás miatt több festéket felvenni képes nematódák nagyon erősen fluoreszkálnak az ilyen tulajdonsággal nem rendelkező nematóda populációban és ezért könnyen azonosíthatók. Ezenkívül, a fluoreszcencia szintje a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára ismert módszerekkel határozható meg, így a legerősebb garat pumpálást mutató nematódák azonosíthatók.

Miután a kalcein olyan erősen fluoreszkál, nehéz megmondani, hogy az összes fluoreszkáló anyag a bélcsatornában marad-e, vagy valamennyi átkerül-e a környező sejtekbe, tehát átkerült a bélfalon. Egy másik kiviteli alakban a találmány leírói egy eltérő fluoreszcens próbát, a Molecular Probes-tól (Europe BV, The Netherlands) beszerezhető BCECF-AM-et, használnak. Ez a festék csak akkor válik fluoreszkálóvá, ha az észterázok hasítják és 6 pH érték felett tartják. A bélcsatorna pH értéke általában 5 vagy ez alatti. Így a garaton át a bélcsatornába került bármely BCECF-AM nem fluoreszkál addig, míg nem hasítódnak és a hasított rész be nem kerül a bélcsatornát körülvevő sejtekbe, ahol a pH érték magasabb. Így ez a festék szintén gyorsan azonosíthatja azokat a mutánsokat vagy a másként módosított nematódákat, melyek fokozott bél transzporttal vagy permeabilitással rendelkeznek. A belet körülvevő szövetekben a fluoreszcencia fokozatosan nő, miközben a bélcsatorna sötét marad. A fluoreszkálás 485 nm gerjesztési és 530 nm emissziós hullámhosszon detektálható.

A fluoreszkáló jelet adó, markert vagy jelet adó molekulákat magába foglaló más vegyületek közé tartoznak a fluoreszcein-difoszfát (FDP) és a CMB-leu, melyek sorrendben az alkalikus foszfát és az endoproteázok szubsztrátjai.

Másik lehetőségként a marker molekula lehet lumineszcensz, mint például az AMPPD vagy egy színes jelet adó glükuronidáz szubsztrát, például az 5-bromo-4-kloro-3-indolil glükuronsav (X-gluc). A marker molekulákat magába foglaló összes ilyen vegyület beszerezhető a Molecular Probes Europe BV-től (The Netherlands).

A fokozott bél felvételt mutató mutáns *C. elegans* törzsek (a későbbiekben *gun* mutáns törzsként hivatkozunk rájuk) BCECF-AM marker festéket használó izolálási módszerét a csatolt példákban írjuk le. Az ezen eljárást használva izolált specifikus *gun* mutáns törzset, a *bg85*-öt 1999 december 23-án deponálták a Mikroorganizmusok

deponálásának nemzetközi elismerésére vonatkozó Budapesti Szerződés rendelkezéseivel összhangban a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms-BCCM LMBP-Collection-nél (Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000, Gent, Belgium) az LMBP 5334CB katalógusszámon.

Egy folyamatos garat pumpálást mutató *C. elegans* törzset, a HD8 vagy *bg46* vagy *hdr(bg46)* jelölésű törzset, lásd az 1. példában lent, 2000 február 9-én deponálták a Mikroorganizmusok deponálásának nemzetközi elismerésére vonatkozó Budapesti Szerződés rendelkezéseivel összhangban a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms-BCCM LMBP-Collection-nél (Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000, Gent, Belgium) az LMBP 5447CB katalógusszámon.

A jelen találmány negyedik aspektusával összhangban fokozott vegyület felvételt mutató *C. elegans* mutáns létrehozására szolgáló módszert biztosítunk, ami a következő lépésekből áll:

- (a) egy olyan mutáns nematódát biztosítunk, melyben az anabolikus reakcióútban részt vevő enzimet expresszáló gén defektes és ez jellemezhető fenotípust eredményez
- (b) az említett mutánst egy a fenotípus kivédésére képes vegyületet tartalmazó tápközegben szaporítjuk, olyan koncentrációban, ami nem elegendő a mutáns fenotípus kivédéséhez
- (c) mutagenézist alkalmazunk az említett mutánsok egy populációján, és
- (d) kiválogatjuk azokat a mutánsokat, melyek lényegében visszaálltak a vad típusú fenotípusra.

Az itt leírt felvételi vizsgálatokat használó további jellemzések felhasználhatók annak eldöntésére, hogy vajon a szenzitivitás növekedése általános, a megnövekedett vegyület felvételnek köszönhető tulajdonság-e, vagy a kérdéses neurotranszmitter jellemzője.



Egy speciális kiviteli alakban a találmány leírói a cha-1 (cn101ts) *C. elegans* mutánst használják, mely a kolin acetiltransferázt kódoló génben rendelkezik mutációval. Egy hő szenzitív mutáció lassú pumpálást, gyengült mozgást és lassú növekedést mutat. A hatás kivédhető, ha a nematódákat acetilkolin hatásának tesszük ki a tápközegben. Ez a mutáns az acetilkolin védő mennyiségei alatti koncentráció mellett szaporítható, azaz olyan koncentrációban, ami csak kevéssé alacsonyabb, mint a védő koncentráció. Bármilyen további mutáció, amit a tudomány állása szerinti hagyományos mutagenézissel indukálunk, fokozhatja a cha-1 mutáció, a tápközegben alacsony koncentrációban levő acetilkolinnal szembeni érzékenységet, és így jelentősen fokozza a szaporodási rátát. Ily módon, a neurotranszmitterrel szemben érzékeny mutáns nematódák szelektálhatók.

Egy utolsó aspektusban a jelen találmány továbbá biztosítja az olyan *C. elegans* törzsek toxicitási szkrínelésben való alkalmazását, melyekre fokozott garat pumpálás és/vagy fokozott bél felvétel és/vagy csökkent szer metabolizmus jellemző, ahogy azt korábban leírtuk. Részletesen, a jelen találmány potenciális toxicitással rendelkező vegyületek tesztelésére szolgáló módszereket biztosít, melynek során megfigyeljük a fenotípusos változást egy nematódában, ha azt az említett vegyület hatásának tesszük ki, és ahol a nematóda fokozott vagy folyamatos garat pumpálást, fokozott bél permeabilitást vagy bél molekuláris transzportot vagy fokozott kutikula permeabilitást mutat.

A megnövekedett permeabilitású (azaz defektes a kutikula vagy a bél gát), fokozott garat pumpálási aktivitású, vagy a xenobiotikumok intracelluláris részecskékből a bélcsatornába történő eltávolítására vagy metabolizmusára, a vad típusú nematódákhoz képest, csökkent képességű nematódák általában nagyobb érzékenységet mutatnának a toxikus vegyületekkel szemben. Az ilyen "szenzitizált" nematódáknak



nevezett nematódákat vegyületek toxicitásának szkrínelésére használhatjuk.

A kételyek eloszlatására, ahol a nematódák speciális jellemzőit vagy tulajdonságait viszonylagos fogalmakkal írjuk le, például "fokozott" vagy "megnövekedett" vagy "csökkent", ezt úgy kell értelmezni, hogy a vad típushoz képest fokozott, megnövekedett vagy csökkent. A *C. elegans* esetében, a vad típust az N2 törzsként határozzuk meg, amit a *C. elegans* Genetic Center-től szerezhetünk be (University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA).

A vad típusú nematódák természetes környezetükben szoros kapcsolatban élnek a talajban levő gombák, baktériumok és növények által szintetizált és/vagy szekretált xenobiotikumokkal, éppen ezért hatékonyan képesek védekezni a különböző kémiai szerkezetű, potenciálisan toxikus vegyületek széles skálájával szemben, így azok nem jutnak be a nematóda test belső alkotórészeibe. Így, a széleskörű védekezés (szerkezetileg értelmezve) ezen mechanizmusainak kiiktatásával lehetőség van a nematódák teste belső részeinek (ahol a toxin molekuláris céljai találhatóak) kémiai szerkezetek széles skálája előtti megnyitására.

A szer felfedezési folyamatban az in vitro farmakológiai szkrínelés után szelektált vegyületeket általában széleskörű szekunder vizsgálatoknak vetjük alá. Ezek a vizsgálatok azt célozzák, hogy ne csupán a farmakokinetikai paramétereket határozzuk meg, de (1) értékeljük ezek farmakológiai specifitását és (2) bizonyítsuk a toxicitás hiányát is. Ezek a tesztek általában in vitro citotoxicitási vizsgálatok, ahol a sejtek éltebenmaradását értékeljük, vagy a sejt életképességgel - például az apoptózis, a nekrozis, a DNS szintézis, a protein szintézis, a szabad gyökök keletkezése vagy a redox szint - kapcsolatos specifikus mechanizmusait határozzuk meg még pontosabban. A szintetizált nematódák multicelluláris élő modelleként használhatók az olyan aktív



vegyületek széles körének tesztelésében, melyek a bármilyen toxicitás metabolikus vagy farmakológiai, primer teszteléséből már kikerültek. Sőt, a toxikus vegyületek által létrehozott fenotípus specifikus metabolikus vagy farmakológiai reakcióúttal kapcsolható össze, így bepillantást engednek a toxicitás mechanizmusába.

A *Caenorhabditis elegans* az előnyben részesített nematóda a jelen találmány toxicitást tesztelő módszereiben. Azonban el kell fogadni, hogy a toxicitási tesztelés elvégezhető más nematódákkal is, különösen más mikroszkópikus nematódákkal, előnyösen a *Caenorhabditis* nemzetségbe tartozó mikroszkópos nematódákkal. A találmány szerinti használatban a "mikroszkópos" nematóda megközelítően a *C. elegans* méretű nematódákat foglalja magába, melyek a felnőtt állapotban 1 mm hosszúságúak. Az ilyen megközelítő méretű mikroszkópos nematódák kiemelkedően alkalmasak a közepes és nagy teljesítményű szkríneléshez, mivel könnyen szaporíthatók az olyan soküregű lemez üregeiben, mely lemezeket az ilyen szkrínelések alkalmazásában használ a tudomány.

A nematódák előnyösen mutáns nematódák, vagy transzgenikus nematódák, melyek a kívánt tulajdonságokkal rendelkeznek, például fokozott vagy folyamatos garat pumpálással, fokozott bél permeabilitással, stb. A jelen találmányban korábban leírt ilyen mutánsokra és transzgenikus nematódákra specifikus példák, amik például a vegyület szkrínelésben használhatók, hasznosak a toxicitási tesztelésben is.

A toxicitási tesztelési célokhoz, a tesztelt vegyületet előnyösen 0,1 - 100 μM koncentrációban vizsgáljuk. Tipikusan a vegyületet számos különböző koncentrációkban teszteljük ezen a határon belül, az előnyös határ 1 - 10 μM .

A toxicitási vizsgálat leolvasási vagy végpontja a szaporodás leállása vagy a letalitás lehet, vagy lehet egy specifikus fenotípus, ami a



nematóda toxikus vegyületnek való kitevésével kapcsolatos. A toxikus vegyületnek való kitételrel kapcsolatos fenotípusok megállapíthatók, ha a nematódát egy ismert toxikus aktivitású vegyület hatásának tesszük ki és feljegyezzük a nematóda fenotípusos változásait. Ez a fenotípus azután felhasználható a toxicitási vizsgálat végpontjaként.

A jelen találmányt a következőkben az alábbi ábrákra és példákra való hivatkozással írjuk le:

Az 1. ábra a *C. elegans* fényképe, ami kalcein-AM-mel való bélcsatorna festődését mutatja.

A 2. ábra a *C. elegans* fényképe, a belet körülvevő sejtek és nem a bélcsatorna festődését mutatja, BCECF-AM használata mellett.

A 3. ábra számos *C. elegans gun* mutáns törzs fokozott szerzenzitivitását mutatja. Az X tengely a chloroquine koncentrációt (mM), az Y-tengely a %-os túlélést mutatja (n=8).

A 4. ábra a fokozott garat pumpálást mutatja különböző "folyasztó" mutáns *C. elegans* törzsek esetében, standard garat pumpálási vizsgálatban kalcein-AM-et használva. A fluoreszcencia intenzitást az Y tengelyen mutatjuk be. A vizsgálat elvégzéséhez M9 tápközegben levő 50 nematódát adunk egy 96 üregű lemez üregeihez, háromszoros ismétlésben, és a nematódákat két és fél órán keresztül inkubáljuk 5 μ M kalcein-AM-mel. A fluoreszcencia méréseket 1 másodpercig végezzük kalcein standardekkel használva. A kalcein fluoreszcencia mérhető standard fluoreszcenz sok-üreges lemez leolvasóban Ex/Em =485/530 értékeken. Bár a vad típusú kontrollt (N2 törzs) nem mutatjuk be, az értékeket a vad típus feletti értékeként kell értelmezni.

Általános módszerek

A *C. elegans* nematódák manipulálása elvégezhető a *Methods in Cell Biology*-ban (vol. 84., *Caenorhabditis elegans: modern biological*



analysis of an organism, ed. Epstein and Shakes, Academic Press, 1995) leírt technikákat használva, vagy a jelen találmányban leírt módszereket használatával kisebb módosításokkal.

1. példa

Körülbelül 2000 késői, negyedik lárvaállapotú (L4) *C. elegans* (N2 törzs) hermafrodita nematódát mutagenézisnek vetünk alá 50 nM EMS-nek való 4 óráig, 20 °C hőmérsékleten, rázatás mellett való kitevéssel. A mutagenézisen átesett nematódákkal ezután 10 cm-es tápközeg agar lemezeket inokulálunk. Az F1 utódokból petéket gyűjtünk és ezeket hagyjuk kikelni az agarlemezeken. A fiatal F2 felnőtt hermafrodita nematódákat ezután arra szkrínéljük, hogy képesek-e kalcein-AM-mel megfestődni. Azokat az egyedeket, melyeknél a bél 15 percen belül megfestődött, szelektáljuk. Ezek a nematódák folyamatos garat pumpálást mutató mutáns nematódák, és egy példát mutatunk be az 1. ábrán. Azoknál a nematódáknál, ahol a test teljes egészében megfestődik, kimutattuk, hogy defektesek vagy a kutikula permeabilizálódott. Az eredményeket az alábbi 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

<i>C. elegans</i> nematóda	folyamatos garat pumpálás	koordinálatlan mozgás	egyéb megfigyelések	a testüreg teljes festődése
N2 (vad típus)	-	-	-	-
Unc-31 (e928) (gyűjteményi törzs)	+++	++	-	-
Lon-1 (gyűjteményi törzs)	+	-	-	-

9B2 (bg44)	+	-	peték, termékenység+	-
3D5	+	+	-	-/+
HD8 (bg46)	+++	-	peték, termékenység-	-
9BR2	+	-	-	++
3D5.FB	+	+	-	++
Srf-3 (gyűjteményi törzs)	-	-	-	++



2. példa

A *C. elegans* bél korlát genetikája és a detoxifikációs mechanizmus

1. P-glükoproteinek

A Pgp-k szer rezisztenciát közvetítenek azáltal, hogy ATP-függő kiáramló pumpaként működnek, eltávolítva különböző lipofil citotoxikus vegyületeket, az alábbi jellemzőkkel (nem számítva a nehézfém specifikus Pgp-eket):

- legalább egy, előnyösen több egy síkban fekvő aromás gyűrűs szerkezet
- kationos töltés fiziológiai pH mellett, és
- a molekulatömeg körülbelül 400, vagy magasabb.

Míg emberekben két Pgp-t kódoló kódoló gén ismert, közülük az MDR1 a multi-szer rezisztenciában vesz részt, a *C. elegans* szekvenciája 15 Pgp gént fed fel, sok közülük klaszterben helyezkedik el az X kromoszómán.

2. táblázat

Gén	Elhelyezkedés	Expresszió	Mutáció	Funkció
Pgp-3	X 3,3 ZK 455,7 F42E11	a bélsejtek és kiválasztó sejt apikális membránja	pk18	multi-szer rezisztencia: a deléciós mutáció 8-szorosára fokozza a kolchicinnel szembeni érzékenységet, 3-szorosra a chloroquine-nel szembeni érzékenységet, az emetin nem nő, az ivermectine nem nő
Pgp-4	X 3,3 F42E11	kiválasztó sejt		
Pgp-1	IV 6,0 K08E7	bél sejtek	pk17	nehézfém rezisztencia
Pgp-2	I 0,4 C34G6			
Pgp-5	X 7,6 F22E10			
Pgp-6	X 7,6 F22E10			
Pgp-7	X 7,6 F22E10			
Pgp-8	X 7,6 F22E10			
Pgp-9	II 0,6 DH11			
Pgp-10	X -2 C54D1,1			
Pgp-11	X 2,3 T21E8			
Pgp-12	X2,3 T21E8			
Pgp-13	X 2,3 T21E8			
Pgp-14	X 2,3 T21E8			
Pgp-15	V 15 C47A10			

Az in vivo expresszió festéssel felfedte a C219 monoklonális antitesttel rendelkező transzgenek túlexpresszálását
Mutáció transzpozonos inzertációval és deléciós szkrínelés

2. Multi-szer rezisztencia rokon protein

Az MRP-k szer rezisztenciát közvetítenek oly módon, hogy a glutation kapcsolt vegyületeket (GSH-konjugátumok) ATP-függő módon transzportálják. A szubsztrát specifitás a következőket foglalja magába:

- Pgp-kként némelyikük nehézfém specifikus
- csupán alacsony szintű Pgp specifikus szubsztrátok, mint a kolhicin, a paklitaxel, taxol, mitoxantron
- hidrofób anionos szubsztrátok széles spektruma
- a humán MRP-hez való legismertebb szubsztrát a leukotrién, négy szénatomos (LTC₄), egy endogén módon aktív glutation-S-konjugátum

3. táblázat

Gén	Elhelyezkedés	Expresszió	Mutáció	Funkció
mrp-1	X-19,4 F57C12,5	garat, garat-bél szelep, előbél, vulva, bél-végbél szelep	pk89	nehézfém rezisztencia
mrp-2	X F57C12,4			
mrp-3	X 22,4 E03G2			
mrp-4	X 1,23 F21G4			
mrp-5	X 19 F14F4			
mrp-6	X -8 F20B6			
mrp-7	V 21,9 Y43F8			
mrp-8	III 16,2 Y75B8			

4. táblázat:

A garat izom funkciók (pumpálás) szabályozásában szerepet játszó neuronok (22) és szerkezeti sejtek (15)

Garat neuronok (20, a garatban helyezkednek el)

garati szenzoros interneuronok, I1 macula communicans-ok (gap junctions) az extragarati RIP-hez

I1L, I1R, I2L, I2R, I3, I4, I5, I6

garati motoros neuronok, az M3 relaxációt szabályoz, az M4 a szükületi perisztaltikát szabályozza, az M3 glutamát transzmitterként funkcionál, mások kolinerg hatásúak

M1, M2L, M2R, M3L, M3R, M4, M5

garati motoros neuronok, melyek a marginális sejtekhez kapcsolódnak, a pumpálás sebességét szabályozzák

MCL, MCR

garati motoros/interneuron

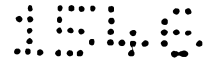
MI

garati neuroszekréciós motoros neuron, a tápanyag jelenlétét érzékeli, szerotonerg

NSML, NSMR

Garati struktúr sejtek (15), (elektromos kapcsolatok)

garati marginális sejtek (9), melyek szinaptikus inputtal rendelkeznek az MC motoros neuronoktól és macula communicans-okkal a garat izmokhoz. Feltehetően az izgatást elektromosan vezetik a garat izmokhoz, mint a Purkinje rosetok a gerinces szívben.



mc1DL, mc1DR, mc1V, mc2DL, mc2DR, mc2V, mc3DL, mc3DR, mc3V

Garati lemezes sejtek (6), melyek vékony hengeres lemezt képeznek a garat és a központi ideg gyűrű között. Macula communicans-ok az izomkarokkal és az RME testi idegi motoros neuronokkal, nyúlványokat küldenek a fej csúcsába.

GLRDL, GLRDR, GLRL, GLRR, GLRVL, GLRVR

neuronok (2) melyek a központi ideg gyűrűtől a garathoz kapcsolódnak

macula communicans-ok az I1-hez

RIPL, RIPR

jelmagyarázat:

D dorzális

V ventrális

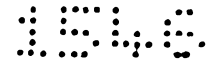
L bal

R jobb

3. példa

A *C. elegans* mutánsok fokozott bél felvételre (*gun*) való szelektálása a BCECF-AM marker festék és háttérként az *unc-31* használatával.

A szkrínelést *unc-31* (*e928*) mutáns háttérben végezzük el, hogy a festéket nagy mennyiségben biztosítsuk a bélcsatornában, mivel az *unc-31* mutációk folyamatos garat pumpálást mutatnak. A Molecular Probes-től kapott festéket (BCECF-Am-et: 2',7' bisz(2-karboxi-etil)-5-(és-6)-karboxi-fluoreszcein, acetoxi-metil-észter) az intracelluláris észterázok hasítják. A fluoreszcencia akkumulálódik a bél sejtekben az apikális bél membránon való áthaladás következtében.



Mutagenesis

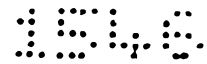
1. nap: unc-31 L4 állapotú nematódákat mutagenesisnek vetünk alá EMS-sel (a végső koncentráció 50 mM), 4 órán keresztül
2. nap: a P0-t számos nagy agar lemezre osztjuk szét
6. nap: az F1-eket összegyűjtjük és nagy lemezekre cseppentjük. Az F1-ek által rakott peték számát minden órában ellenőrizzük és az F1-eket eltávolítjuk, amikor F1-enként 10-20 petét számolunk meg
10. nap: F2 felnőtt egyedeket gyűjtünk össze és szkrinélünk BCECF-AM-mel. A mutációkat a bél sejtek 15-30 percig végzett fokozott festésével szelektáljuk és kis agar lemezekre helyezük egyesével.

Körülbelül 50 kezdeti pozitív egyed eredményez utódokat, melyeket újra tesztelünk BCECF-AM-mel (2x) és leucin CMB-vel (1x), az 50 törzsből 9-et tartunk meg (2 törzs: 3-szor pozitív, 7 másik törzs: kétszer pozitív)

5. táblázat

A mutációk izolálása a BCECF-AM-mel történt fokozott festésre

Teljes P0	Teljes F1	Teljes F2	szkrinelt kromoszómák	az izolált törzsek száma
(számolt)	(becsült)	(számított)	(becsült)	(számolt)
2251	55618	222472	100000	9



Keresztezés, visszakeresztezés és kétszeres szerkesztés

1. visszakeresztező *unc-31; gun* --> *unc-31; gun*

- *unc-31; gun* x WT hímek
- egyedüli 2 x 5 WT hermafroditák F1-ek (*unc-31/+;gun/+*)
- egyedüli 50 WT hermafroditák F2-ők (1/4 homozigóta)
- az 1/4 *unc* szegregálódó törzsek szelekciója
- az *unc* törzseket BCECF-AM-mel festjük
- a pozitív törzsekből izoláljuk az *unc* homozigótákat
- a maradék 100 % *unc* törzseket BCECF-AM-mel újra teszteljük
- 1 törzset megtartunk (visszakeresztezett)

2. az *unc-31* hátteret keresztezzük-->+; *gun*

- *unc-31; gun* x WT hímek
- egyedüli 2 x 5 WT hermafroditák F1-ek (*unc-31/+;gun/+*)
- egyedüli 50 WT hermafroditák F2-ők (1/4 homozigóta)
- a többet nem szegregálódó *unc* F3 törzseket szelektáljuk
- a nem *unc* törzseket BCECF-AM-mel festjük
- 7 pozitív törzset újra tesztelünk BCECF-AM-mel és végül 1 törzset szelektálunk és tartunk meg (keresztezett)

3. +; *gun* (1x keresztezett) kétszer visszakeresztezett-->+; *gun* (3x visszakeresztezett)

- *gun* x WT hímek
- WT hermafroditák x F1 hímek (*gun/+*)
- egyedüli 10 WT hermafroditák F2-ők (1/2 heterozigóta)
- egyedüli 50 WT hermafroditák F3-ak (1/8 homozigóta)
- a törzseket BCECF-AM-mel festjük, a pozitívakat újra teszteljük BCECF-AM-mel, és végül 1 törzset szelektálunk és tartunk meg.

4. a *gun*-t (3x visszakeresztezett) *nuc-1(X)* mutánszal keresztezzük--> *gun; nuc-1*

- *gun* x WT hímek

- *nuc-1* x *gun/+* hímek

- *nuc-1* x *gun/+; nuc-1/0* vagy *+/+; nuc-1/0* hímek

- egyedüli 10 WT hermafrodita utód (*nuc-1* homozigóta, 1/2 heterozigóta *gun*)

- egyedüli 40 WT hermafrodita utód (1/8 homozigóta *gun*)

- a törzseket megfestjük BCECF-AM-mel

- újratesteljük a pozitívakat BCECF-AM-mel és végül 1 törzset kiválasztunk és megtartunk.



6. táblázat

A gun mutációkból származó törzsek

gun	<i>unc-31; gun</i>		<i>unc-31;gun</i>		<i>+</i> ;gun			<i>gun;</i> <i>nuc-1</i>
	eredeti izolátum		visszakeresztezett (1x)		kikersztezett (1x)		3xb.c.	a 3xb.c. -ből
allél szám	I szám	T szám	I szám	T szám	I szám	T szám	T szám	T szám
bg77	31,4	UG 510	31.4.46.1	UG 556	31.4.34	UG 563	UG 674	UG 777
bg78	37,5	UG 511	37.5.46.4	UG 557	37.5.15	UG 564	UG 675	-
bg83	10,2	UG 543	10.2.11	UG 600	10.2.21	UG 586	UG 676	-
bg84	7,2	UG 544	7.2.10	UG 601	7.2.15	UG 589	UG 677	UG 774
bg85	11,5	UG 545	11.5.29.2	UG 602	2xb.c.	UG 717		UG 775
bg86	42,1	UG 546	42.1.4.5	UG 603	42.1.18	UG 587	UG 678	UG 776
bg87	7,1	UG 547	7.1.8.3	UG 604	7.1.22	UG 585	UG 679	-
bg88	5,3	UG 548	5.3.9	UG 605	5.3.18	UG 584	UG 680	-
bg89	23,4	UG 549	23.4.13.5	UG 606	23.4.3	UG 588	UG 671	-

A gun mutánsok szer szenzitivitása

Cél: teszt, hogy meglássuk, hogy a gun mutánsok érzékenyebbek-e a szerekkel szemben, mint a vad típus. Chloroquine-t (C-6628, Sigma) használunk szerként és NL131-et (pgp-3 "knockout") használunk kontrollként (EMBO J. 1995 május 1; 14(9):1858-66).

Chloroquine szenzitivitási vizsgálat:

- vastag törzslémezekre van szükség 3 nappal az L1-ek előtt

- S-pufferben összegyűjtjük a nematódákat
- centrifugáljuk a nematóda szuszpenziót 1300 rpm értéken, 3 percig
- összeállítjuk a szűrő berendezést (11 μm -es szűrőt használunk)
- a nematóda szuszpenziót a szűrőre tesszük és néhányszor S-pufferrel átmoszuk
- az L1-ek átmennek a szűrőn
- lecentrifugáljuk az L1 szuszpenziót 1300 rpm értéken, 3 perc alatt
- eltávolítjuk a felülúszót, amíg ± 2 ml nematóda szuszpenzió marad
- hozzáadunk üregenként 30 L1-t egy 96 üregű lemezhez, nematóda adagoló készüléket használva (például a készülék beszerezhető az Union Biometrica-tól, Inc. Somerville, MA, USA, melynek az áramlási citométerekkel, például a fluoreszcenz aktivált sejt szkennelő és osztályozó készülékekkel (FACS), analóg tulajdonságai vannak)
- S-puffert adunk hozzá, hogy a teljes térfogat 100 μl legyen
- az oszlopokhoz hozzáadunk chloroquine hígításokat (8 ismétlés az egyes koncentrációkhoz)
- hozzáadunk 1 μl *E. coli* -t, a HB101-et, (bakteriális tápanyag forrás)
- a lemezeket 20°C hőmérsékleten inkubáljuk 3 napig és megszámloljuk a felnőttek számát

7. táblázat

A *gun* törzsek megnövekedett szer szenzitivitása

Törzs	genotípus	a szenzitivitás növekedése a WT-hez viszonyítva
NL131	<i>pqp-3 (pk18)</i>	3,9
CB928	<i>unc-31 (e928)</i>	2,0
UG588	<i>gun (bg89)</i>	1,6
UG606	<i>unc-31; gun(bg89)</i>	10,3
UG585	<i>gun (bg87)</i>	1
UG604	<i>unc-31;gun(bg87)</i>	4,5



A 3. ábra egy sor *gun* mutáns törzs megnövekedett szenzitivitását mutatja, a vad típusú, N2 nematódákhoz viszonyítva. Általában megfigyeltük, hogy a *gun* mutánsok sokkal érzékenyebbek a chloroquine vegyülettel szemben, ami toxikus a nematódákra. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy a *gun* mutánsok sokkal érzékenyebbek a vegyületekkel szemben, ami a jobb vegyület felvétel elvét bizonyítja. A toxikus vegyületekkel szembeni, megnövekedett érzékenyséjük miatt a *gun* mutánsok hasznos eszközt jelentenek a teljes szervezeten in vivo toxicitási vizsgálatok elvégzéséhez.

A meghatalmazott

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotipusos változást, ahol az említett nematóda folyamatos garat pumpálást mutat.

2. Egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy egy nematódát az említett szkrínelendő vegyület hatásának és egy olyan vegyületnek tesszük ki, ami az említett nematódában indukálja vagy fokozza a garat pumpálását, és az említett nematódán a fokozott garat pumpáláson kívüli bármilyen fenotipusos vagy fiziológiai változást megfigyeljük.

3. Egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotipusos változást, ahol az említett nematóda fokozott bél permeabilitást vagy megváltozott bél molekuláris transzportot mutat.

4. Egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy egy nematódát az említett szkrínelendő vegyület hatásának, valamint egy második, a bél permeabilitást vagy a bélen keresztüli felszívódást fokozó, vegyület hatásának tesszük ki, és az említett nematódában a fokozott bél permeabilitástól eltérő bármilyen fenotipusos vagy fiziológiai változást megfigyelünk.

5. Egy vegyület potenciális toxicitásának tesztelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotipusos változást, ahol az említett nematóda fokozott garat pumpálást mutat.

6. Egy vegyület potenciális toxicitásának tesztelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotipusos változást, ahol az említett nematóda fokozott bél permeabilitást vagy megnövekedett bél molekuláris transzportot mutat.

7. Az 1 - 6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett nematóda fokozott cutikula permeabilitást is mutat.

8. Egy vegyület potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy egy nematódát az említett szkrínelendő vegyület hatásának, valamint egy második, kutikula permeabilitást fokozó vegyület hatásának tesszük ki, és az említett nematódában a fokozott kutikula permeabilitástól eltérő bármilyen fenotipusos vagy fiziológiai változást megfigyelünk.

9. Egy vegyület potenciális toxicitásának tesztelésére szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy megfigyeljük egy nematódában az említett vegyületnek való kitétel hatására bekövetkező fenotipusos változást, ahol az említett nematóda fokozott kutikula permeabilitást mutat.

10. Az 1 - 9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett nematóda egy mutáns, transzgenikus nematódát jelent.

11. Az 1 - 10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett nematóda egy mikroszkopikus nematódát jelent.

12. A 15. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a mikroszkopikus nematóda a *C. elegans*-ot jelenti.

13. Egy potenciális terápiás hatásra tesztelendő vegyület a garaton és/vagy a bélen és/vagy a kutikulán keresztüli fokozott felvételét mutató mutáns vagy transzgenikus nematóda azonosítására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy az említett nematódát kitesszük egy olyan vegyület hatásának, mely magába foglal egy marker molekulát, mely detektálható jelet biztosít, ha a nematóda felveszi, és az említett jel erősségét az említett marker molekulát tartalmazó említett vegyületnek kitett vad típusú nematódából származó jel erősségével összehasonlítjuk.

14. Egy folyamatos garat pumpálást mutató mutáns *C. elegans* létrehozására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy a neurotranszmitterek, például az acetilkolin, a szerotonin, a glutamát, az oktopamin, a dopamin, a GABA és az FMRF, egyikének vagy többjének feldolgozásával kapcsolatos reakcióútban szerepet játszó proteint kódoló gént módosítunk oly módon, hogy annak szintjeit megváltoztassuk.

15. Fokozott bél permeabilitással vagy fokozott bél molekuláris transzporttal jellemzett mutáns *C. elegans* létrehozására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy egy multi-szer rezisztencia proteint vagy egy multi-szer rezisztencia rokon proteint kódoló génben defektet hozunk létre.

16. A potenciális farmakológiai aktivitásra tesztelendő vegyületek hatására fokozott kutikula permeabilitást mutató *C. elegans* létrehozására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy az említett *C. elegans*-t a kutikula permeabilitást növelő anyagok hatásának kitesszük.

17. Fokozott vegyület felvételt mutató *C. elegans* mutáns létrehozására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy

a) egy olyan mutáns nematódát biztosítunk, mely defekttel rendelkezik egy anabolikus reakcióútban részt vevő enzimet expresszáló génben, ami jellemezhető fenotípust eredményez,

b) az említett mutánst olyan tápközegben szaporítjuk, ami olyan koncentrációban tartalmazza a fenotípust megmenteni képes említett vegyületet, mely koncentráció nem elegendő ahhoz, hogy a mutáns fenotípust megmentse,

c) az említett mutánsok populációját mutagenézisnek vetjük alá, és

d) a lényegében a vad-típus fenotípusára visszaállított mutánsokat kiválasztjuk.

18. Egy nematóda alkalmazása azzal jellemezve, hogy a nematódák folyamatos garat pumpálást mutatnak vegyületek potenciális farmakológiai aktivitásának szkrínelési módszerében.

19. A 18. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a vegyületek szkrínelési módszerét automatizált módon végezzük.

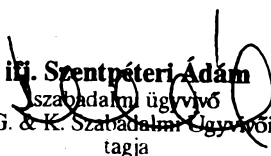
20. A 18. vagy a 19. igénypontok szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy vegyületek szkrínelési módszerét egy sok-üreges formában végezzük.

21. A 18 - 20. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a vegyületek szkrínelési módszerét folyékony tápközegben végezzük.

22. A 18 - 21. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a nematóda *C. elegans*-t jelent.

23. A 18 - 21. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a nematóda vad-típusú *C. elegans*-t, vagy egy mutáns vagy transzgenikus *C. elegans*-t jelent.

A meghatalmazott


Ádám Szentpéteri
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvédi Iroda
tagja
H-1069 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: +61-1000 Fax: 461-1099

3 J + 4 = 39 old

 2002.06.29.

WO 00/63425

P0201705

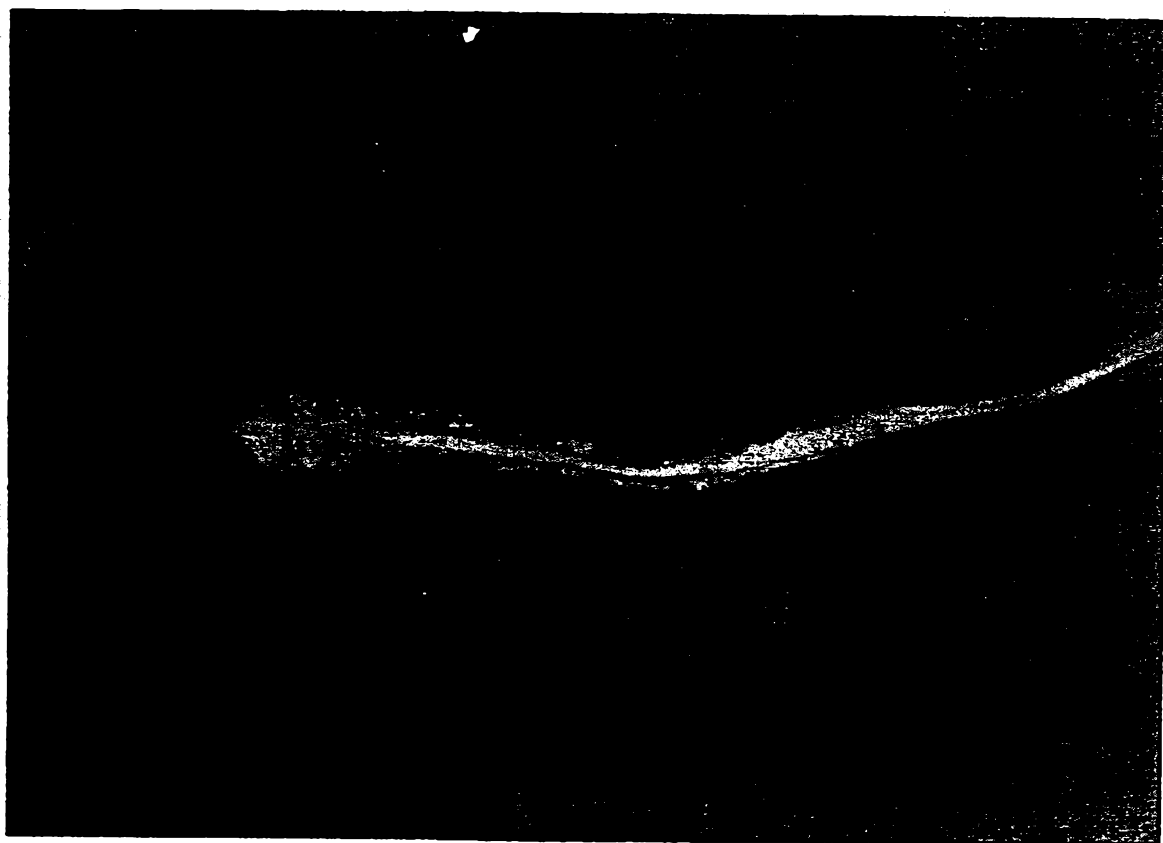
37/SL

PCT/IB00/00557

1/A

1. ábra

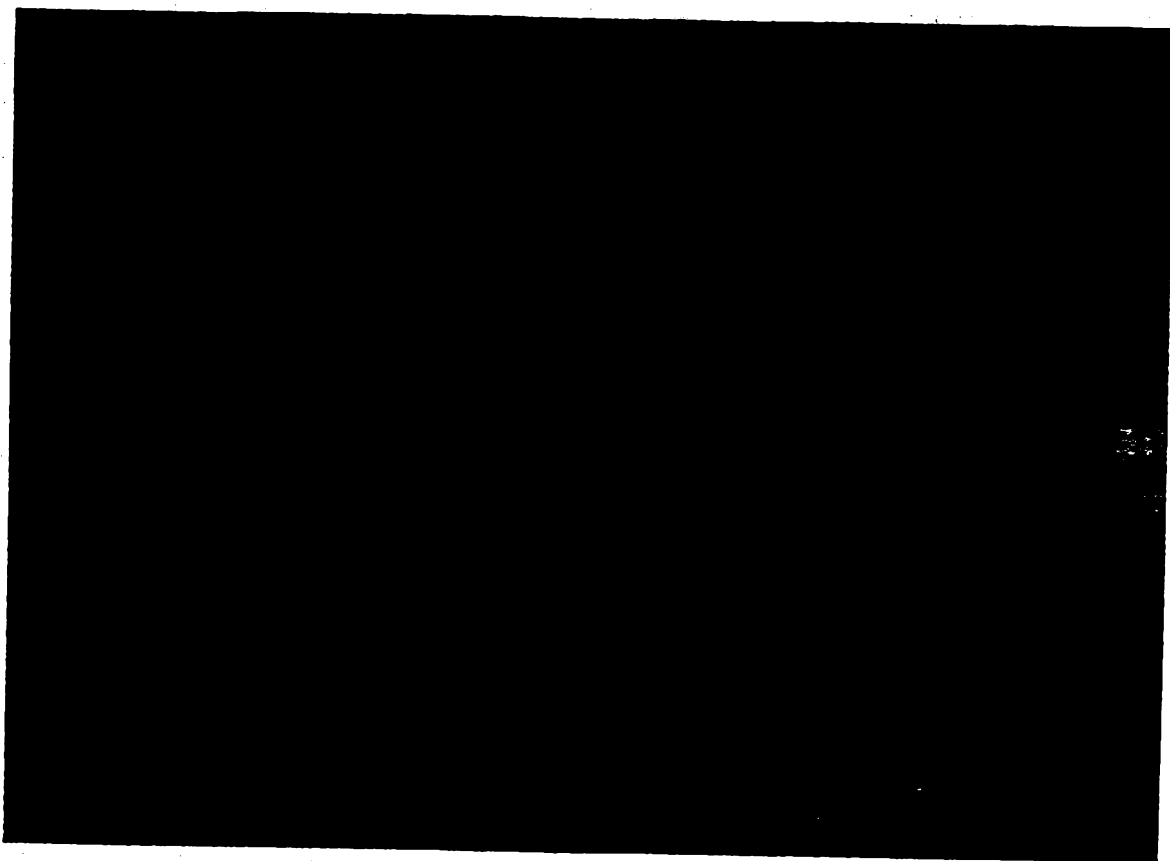
Bél lumen megfestés



2/4

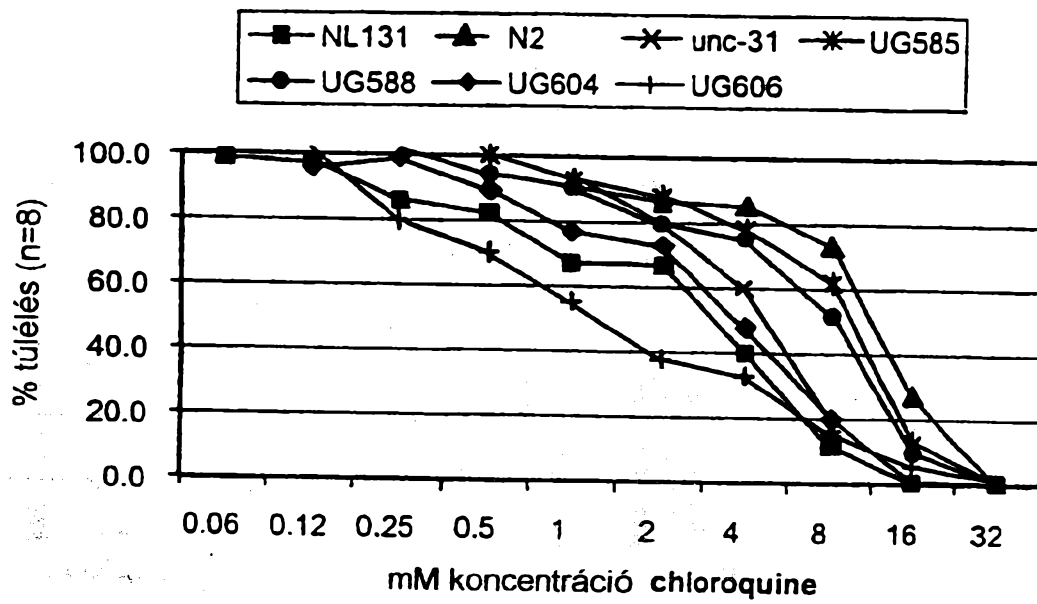
2. ábra

A bél sejtek és nem a bél lumen megfestése



3/1

3. ábra
A gun mutációk megnövekedett szer érzékenysége



4/4

4. ábra Ivási vizsgálat: nagy fogyasztók

