

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2001-2943**
(22) Přihlášeno: **17.02.2000**
(30) Právo přednosti: **18.02.1999 AT 1999/270**
(40) Zveřejněno: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)
(47) Uděleno: **13.08.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.09.2008**
(Věstník č. 39/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/AT2000/000040**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/049153**

(11) Číslo dokumentu:

299 622

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Staudacher, E. et al.: „Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha 1,3-fucosyltransferase from mung beans“, Glycoconj. J. 12(6):780-786, 1995; Altmann, F.: „More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins?“ Glycoconj. J. 14:643-646, 1997; Lerouge, P. et al.: „N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends“ Plant. Mol. Biol. 38:31-48, 1998; EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997; EMBL Database ID: AQ158899 AC: AQ158899 Oryza sativa 09/09/1998; EMBL Database ID: AQ328306 AC: AQ328306 Oryza sativa 11/01/1999.

(73) Majitel patentu:

ALTMANN Friedrich, Wien, AT

(72) Původce:

Altmann Friedrich, Wien, AT

(74) Zástupce:

JUDr. Miloš Všečeka, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

Molekula DNA kódující fukosyltransferázu

(57) Anotace:

Řešení se týká molekuly DNA, která obsahuje SEKVENCI ID. Č. 1 s otevřeným čtecím rámcem od páru bází 211 do páru bází 1740, nebo je alespoň z 50 % homologní s touto sekvencí, nebo s ní hybridizuje za stringentních podmínek, nebo obsahuje sekvenci k ní degenerovanou z důvodu degenerace genetického kódu, kterážto sekvence kóduje rostlinný protein s fukosyltransferázovou aktivitou nebo je k této sekvenci komplementární. Dále se týká polynukleotidu kódujícího fukosyltransferázu. Rovněž se týká částečných sekvencí takového polynukleotidu a také vektoru obsahujícího tyto polynukleotidy, rekombinantních hostitelských buněk, rostlin a hmyzu transfekovaných polynukleotidy nebo DNA z nich odvozenou.

CZ 299622 B6

Molekula DNA kódující fukosyltransferázu

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká polynukleotidu kódujícího fukosyltransferázu. Dále se vynález týká částečných sekvencí takového polynukleotidu a také vektoru obsahujícího tyto polynukleotidy, rekombinantních hostitelských buněk, rostlin a hmyzu transfekovaných polynukleotidy podle vynálezu nebo DNA z nich odvozenou.

10

Dosavadní stav techniky

15

Glykoproteiny vykazují značnou různorodost a složitost sacharidových složek, přičemž složení a uspořádání sacharidů je vždy charakteristické pro různé organismy. Oligosacharidové jednotky glykoproteinů mají různé úkoly, jsou např. důležité pro regulaci metabolismu, podílejí se na mezibuněčných interakcích typu buňka–buňka, určují biologický poločas proteinu v oběhu a mají rozhodující význam pro rozpoznávání epitopů v reakci antigenu s protilátkou.

20

Glykosylace glykoproteinu začíná v endoplazmatickém retikulu (ER), kde jsou oligosacharidy navázány buďto na postranní řetězce asparaginu N–glykosidickými vazbami nebo na postranní řetězce serinu nebo threoninu O–glykosidickými vazbami.

25

N–vázané oligosacharidy obsahují společné jádro z pentasacharidové jednotky složené ze tří manózových a dvou N–acetylglukosaminových zbytků. Pro další modifikaci cukerné složky jsou glykoproteiny transportovány z ER do Golgiho komplexu. Struktura N–vázaných oligosacharidových jednotek glykoproteinů je určována jejich konformací a také složením glykosyltransferáz v kompartmentu Golgiho komplexu, kde dochází k vlastnímu „opracování“.

30

Bylo ukázáno, že pentasacharidová jednotka tvořící jádro vyskytující se v Golgiho komplexu některých rostlinných a hmyzích buněk je substituována xylózou a α –1,3 vázanou fukózou (P. Lerouge a kol., 1998, Plant Mol. Biol. 38, 31–48, Rayon a kol., 1998, J. Exp. Bot. 49, 1463–1472). Heptasacharid „MMXF³“ představuje hlavní typ oligosacharidu v rostlinách (Kurosaka a kol., 1991, J. Biol. Chem. 266, 4168–4172). Takže např. peroxidáza křenu, β –fruktosidáza mrkve a Erythrina cristagalli obsahují lektin a fosfolipáza A2 z včelího jedu nebo glykoproteiny membrány neuronů hmyzích embryí α –1,3–fukózové zbytky vázané na glykanové jádro. Tyto struktury se také nazývají komplexní N–glykany nebo manóza–deficitní nebo případně zkrácené N–glykany. α –manosylové zbytky mohou být dále nahrazeny GlcNAc, na který je navázána galaktóza a fukóza, takže se připraví struktura, která odpovídá humánnímu epitopu Lewis–a (Melo a kol., FEBS Lett. 415, 186–191, Fitchette–Laine a kol., 1997, Plant J. 12, 1411–1417).

45

Ani xylóza ani α 1,3–vázaná fukóza se nevyskytují u savců ve formě glykoproteinu. Bylo zjištěno, že α 1,3–fukóza jádra (tj. pentasacharidové jednotky) hraje důležitou roli v rozpoznávání epitopu protilátek namířených proti rostlinným a hmyzím N–vázaným oligosacharidům (I.B.H. Wilson a kol., Glycobiology Vol. 8, No. 7, pp. 651–661, 1998), a tím u člověka nebo zvířete spouští imunitní reakci proti těmto oligosacharidům. α 1,3–fukózový zbytek je zřejmě jednou z hlavních příčin rozšířené alergické zkřížení reaktivity mezi různými rostlinnými a hmyzími alergeny (Tretter a kol., Int. Arch. Allergy Immunol. 1993; 102:259–266) a také proto se nazývá „zkřížené–reaktivní sacharidová determinanta“ (CCD, „cross–reactive carbohydrate determinant“). Ve studii zkoumající epitopy rajčat a pylu trav byly nalezeny zbytky α 1,3–vázané fukózy jako společná determinanta, což se zdá být důvodem, proč se často u pacientů objevují alergie na rajčata a pyl z trav (Petersen a kol., 1996, J. Allergy Clin. Immunol., Vol. 98, 4; 805–814). Vzhledem k častému výskytu imunologických zkřížených reakcí CCD navíc komplikují diagnózu alergií.

50

Imunologické reakce spouštěné v lidském těle rostlinnými proteiny představují hlavní problém při léčebném využití rekombinantních humánních proteinů produkovaných v rostlinách. Aby se zabránilo těmto problémům, musí se zabránit α 1,3-fukosylaci jádra. V předložené studii se ukazuje, že oligosacharidy obsahující L-galaktózu místo L-fukózy (6-deoxy-L-galaktóza) jsou přesto plně biologicky aktivní (E. Zabackis a kol., 1996, Science, Vol. 272). Podle jiné studie byla izolována mutanta *Arabidopsis thaliana*, ve které chybí N-acetyl-glukosaminyltransferáza I, první enzym v biosyntéze komplexních glykanů. Biosyntéza komplexních glykoproteinů v této mutantě je narušena. Nicméně tyto mutované rostliny jsou schopny za jistých podmínek normálního vývoje (A. Schaewen a kol., 1993, Plant Physiol. 102; 1109–1118).

Pro cílené blokování jádro- α 1,3-fukózové vazby v oligosacharidu bez narušení jiných glykosylačních kroků, musí být inaktivován pouze tento enzym, který je přímo zodpovědný za tuto specifickou glykosylaci, tj. enzym jádro- α 1,3-fukosyltransferáza. Byl izolován a charakterizován poprvé z fazolu mungo, a bylo také zjištěno, že aktivita tohoto enzymu je závislá na přítomnosti neredukujících konců GlcNAc (Staudacher a kol., 1995, Glycoconjugate J. 12, 780–786). Tato transferáza, která se vyskytuje pouze v rostlinách a hmyzu, avšak nikoliv v člověku nebo jiných obratlovcích, by musela být cíleně inaktivována nebo potlačena, aby humánní proteiny produkované v rostlinách nebo rostlinných buňkách, případně v hmyzu nebo hmyzích buňkách, již dále neobsahovaly tento epitop vyvolávající imunitní reakci, jako je tomu dosud.

Publikovaný článek John M. Burke „Clearing the way for ribozymes“ (Nature Biotechnology 15:414–415; 1997) se týká obecných funkcí ribozymů.

Článek Pooga a kol., „Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*“ (Nature Biotechnology 16:857–861; 1998) se týká obecně molekul PNA a specificky takové molekuly PNA, která je komplementární k mRNA humánního galaninového receptoru typu 1.

Patent US 5 272 066 se týká způsobu změny eukaryotických a prokaryotických proteinů, která vede k prodloužení doby jejich cirkulace *in vivo*. V tomto případě jsou navázané oligosacharidy změněny pomocí různých enzymů, k nimž patří také např. GlcNAc- α 1 $\rightarrow$ 3(4)-fukosyltransferáza.

Patent EP 0 643 132 A1 se týká klonování α 1,3-fukosyl-transferázy izolované z humánních buněk (THP-1). Sacharidové řetězce popsané v tomto patentu odpovídají humánním sialyl-Lewis x- a sialyl-Lewis a-oligosacharidům. Specifita enzymu z humánních buněk je zcela odlišná od specifity fukosyltransferázy z rostlinných buněk.

Cílem předkládaného vynálezu je klonování a sekvencování genu, který kóduje rostlinnou fukosyltransferázu, a dále příprava vektorů, které obsahují tento gen, jeho DNA fragmenty nebo jeho změněnou DNA nebo DNA z něho odvozenou, pro transfekci rostlin nebo hmyzu nebo jejich buněk, s cílem, aby produkovaly glykoproteiny, které neobsahují normálně se vyskytující α 1,3-jádro-fukózu, a také odpovídající způsoby přípravy.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je molekula DNA obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 1 (v popisu vynálezu je užit kód IUPAC, kde „N“ znamená inosin), s otevřeným čtecím rámcem od párů bází 211 do 1740, nebo je alespoň z 50 % identická s uvedenou sekvencí nebo s ní hybridizuje za stringentních podmínek, nebo obsahuje sekvenci k ní degenerovanou díky degeneraci genetického kódu, přičemž sekvence kóduje rostlinný protein, který má fukosyltransferázovou aktivitu, nebo je k této sekvenci komplementární.

Tato sekvence, která nebyla dosud popsána, je užitečná pro použití v jakémkoliv experimentu, analýze nebo výrobním způsobu, které se týkají rostlinné fukosyltransferázové aktivity. Požadovanými produkty jsou zde sama DNA sekvence a také protein kódovaný touto sekvencí. Avšak také zejména sekvence DNA, která může být použita k inhibici fukosyltransferázové aktivity.

5

Otevřený čtecí rámec SEKVENCE ID. Č. 1 kóduje protein s 510 aminokyselinami s teoretickou molekulovou hmotností 56 800 (Da), s předpokládanou transmembránovou doménou v úseku mezi Asn36 a Gly54. Vypočtená hodnota pI proteinu kódovaného SEKVENCÍ ID. Č. 1 je 7,51.

10 Aktivita rostlinné fukosyltransferázy se detekuje a měří tak, že se fukosyltransferáza přidá ke vzorku obsahujícímu značenou fukózu a akceptor (např. glykoprotein) navázaný na nosič jako je např. Sepharose. Po reakční době je vzorek promyt a měří se obsah navázané značené fukózy. Aktivita fukosyltransferázy je v takovém případě pozitivní, pokud je měřená aktivita alespoň o 10 až 20 %, zejména o alespoň 30 až 50 %, vyšší než aktivita změřená v negativní kontrole. Struktura glykoproteinu může být navíc verifikována užitím HPLC. Takové postupy jsou známy ze stavu techniky (Staudacher a kol. 1998, Anal. Biochem. 246, 96–101; Staudacher a kol. 1991, Eur. J. Biochem. 199, 745751).

20 Např. fukosyltransferáza se smíchá se vzorkem obsahujícím radioaktivně značenou fukózu a akceptor, např. GlcNAc β 1–2Man α 1–3(GlcNAc β 1–2Man α 1–6)Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1–Asn. Po reakci je vzorek purifikován aniontovou iontoměničovou chromatografií a měří se obsah navázané fukózy. Z rozdílu naměřené radioaktivity vzorku s akceptorem a negativní kontroly bez akceptoru může být vypočtena aktivita. Aktivita fukosyltransferázy je hodnocen jako pozitivní, když je naměřená radioaktivita alespoň o 30 až 40 % vyšší než radioaktivita změřená u negativního vzorku.

30 Párování (hybridizace) dvou DNA molekul se může měnit výběrem teploty a iontové síly vzorku. Stringentními podmínkami se podle vynálezu rozumí podmínky, které dovolují přesnou, stringentní vazbu (hybridizaci). Např. DNA molekuly jsou hybridizovány v roztoku 7% dodecylulfátu sodného (SDS), 0,5M NaPO₄, pH 7,0, 1Mm EDTA při 50 °C, a promývány v 1 % SDS při 42 °C.

Zda má sekvence alespoň 50% homologii se SEKVENCÍ ID. Č. 1 může být určeno např. pomocí programu FastDB z genové databanky EMBL nebo SWISSPROT.

35 Výhodně sekvence DNA molekuly podle vynálezu kóduje protein s aktivitou GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy, zejména s aktivitou jádro– α 1,3–fukosyltransferázy.

40 Jak již bylo zmíněno výše, jádro α 1,3–fukosyltransferázy je přítomné v rostlinách a hmyzu, avšak nevyskytuje se v lidském těle, takže sekvence DNA podle vynálezu je zejména užitečná pro experimenty a analýzy, a také pro způsoby výroby týkající se fukosyltransferázy.

Termínem jádro– α 1,3–fukosyltransferáza je v předkládaném vynálezu označována zejména GDP–L–Fuc:Asn–vázaná GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferáza. Ve smyslu předkládaného vynálezu termín α 1,3–fukosyltransferáza vždy znamená jádro– α 1,3 fukosyl–transferáza. Pro výše zmíněná měření aktivity se užívají zejména akceptory mající neredukující GlcNAc konec. K takovým akceptorům patří např. GlcNAc β 1–2Man α 1–3(GlcNAc β 1–2Man α 1–6)Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1–Asn, GlcNAc β 1–2Man α 1–3(GlcNAc β 1–2Man α 1–6)Man β 1–4GlcNAc β 1–4(Fuc α 1–6)GlcNAc β 1–Asn a GlcNAc β 1–2Man α 1–3[Man α 1–3(Man α 1–6)Man α 1–6]Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1–Asn. Zda je fukóza navázána nebo ne může být dále stanoveno měřením necitlivosti vůči N–glykosidáze F, kterou je možné detekovat hmotovou spektrometrií.

Výhodně molekula DNA podle vynálezu obsahuje alespoň 70 až 80%, zvláště výhodně alespoň 95%, identitu se SEKVENCÍ ID. Č. 1. Tato sekvence kóduje zvláště aktivní GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázu.

Jelikož sekvence DNA může být více či méně změněna v závislosti na rostlině nebo hmyzu, sekvence podle vynálezu mající např. 70% identitu se SEKVENCÍ ID. Č. 1 má také fukosyltransferázovou aktivitu, která je dostatečná pro použití v analýzách, experimentech nebo způsobech podle vynálezu.

V dalším výhodném provedení molekula DNA podle vynálezu obsahuje 2 150 až 2 250, zejména 2 198 párů bází. Tato DNA molekula obsahuje 100 až 300, výhodně 210, párů bází ve směru „upstream“ (proti směru transkripce) před startovacím kodonem, a také 350 až 440, zejména 458, párů bází ve směru „downstream“ (po směru transkripce) za stop kodonem otevřeného čtecího rámce, přičemž koncový úsek DNA molekuly výhodně obsahuje 3'-poly(A) úsek. Tímto způsobem je zajištěna bezchybná regulace translace a je tak poskytnuta DNA molekula, která je zvláště účinná a bezproblémová pro kódování aktivní GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy.

Předkládaný vynález se dále týká molekuly DNA, která obsahuje SEKVENCÍ ID. Č. 3 nebo obsahuje sekvenci, která má alespoň 85%, výhodně alespoň 95%, zvláště vhodně alespoň 99%, identitu s výše uvedenou sekvencí, nebo která za stringentních podmínek hybridizuje s výše uvedenou sekvencí, nebo která je, díky degeneraci genetického kódu, degenerovanou sekvencí vzhledem k sekvenci výše uvedené. Identita se výhodně určuje pomocí počítačového programu, který rozpoznává inserce a delece a neuvažuje je při výpočtu identity. Tato nukleotidová sekvence kóduje konzervativní (kanonický) peptidový motiv, což znamená, že všechny aktivní a funkční GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy obsahují aminokyselinovou sekvenci kódovanou touto nukleotidovou sekvencí. V takovém případě má sekvence buďto stejnou velikost jako SEKVENCE ID. Č. 3, nebo může být, přirozeně, delší. Tato sekvence je kratší než sekvence kódující celý protein, a tudíž je méně náchylná k rekombinaci, delecím nebo jiným typům mutací. Vzhledem ke konzervativnosti motivu a vyšší stabilitě sekvence je tato sekvence zvláště výhodná pro testy rozpoznávání sekvence.

SEKVENCE ID. Č. 3 obsahuje následující sekvenci:

5'GAAGCCCTGAAGCACTACAAATTTAGCTTAGCGTTTGAAAATTCTGA
ATGAGGAAGATTATGTAACTGAAAAATTCTTCCAATCCCTTGTGCT
GGAAGTGTCCCT-3'

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká molekuly DNA, která obsahuje část sekvence výše uvedené molekuly DNA a má velikost 20 až 200, výhodně 30 až 50, párů bází. Tato molekula DNA může být využita, např. jako sonda vázající se na komplementární sekvenci GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy, aby mohla být identifikována ve vzorku. Takto je možné najít, identifikovat a pak izolovat další GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy z mnoha různých druhů rostlin a hmyzu. Jakákoliv požadovaná část nebo také několik různých částí sekvence se může užít, zejména části sekvence výše zmíněného konzervativního motivu.

Při takovém postupu je zvláště výhodné, když jedna z výše uvedených molekul DNA je kovalentně navázaná na detekovatelnou značící látku. Jako značící látka se může užít jakýkoliv obecně známý marker (značka), jako např. fluorescenční nebo luminiscenční marker, radioaktivní markery nebo neizotopové markery jako je např. biotin atd. Takto se tedy připraví činidla vhodná pro detekci, selekci a kvantifikaci odpovídajících molekul DNA ve vzorcích pevné tkáně (např. rostlinného pletiva) nebo v tekutých metodou hybridizace.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká biologicky funkčního vektoru, který obsahuje jednu z výše uvedených molekul DNA nebo její část různých délek alespoň však 20 párů bází. Pro transfekci do hostitelské buňky je nutný nezávislý vektor schopný amplifikace, přičemž vhodný vektor se vybere v závislosti na hostitelské buňce, mechanismu transfekce, funkci a velikosti

molekuly DNA. Jelikož je známo velké množství vektorů, jejich výčet by přesahoval nutný rámec popisu vynálezu, mj. také proto, že tyto vektory jsou odborníkům dobře známy (pokud jde o vektory a také metody molekulární biologie a termíny užívané v této přihlášce, které jsou odborníkům známy, viz laboratorní příručka Sambrook a Maniatis). V ideálním případě je vektor molekula malé relativní molekulové hmotnosti a obsahuje selektovatelné geny, které by vedly ke snadno rozpoznatelnému fenotypu buňky, aby bylo možné snadno odlišit hostitelské buňky obsahující vektor a buňky, které vektor neobsahují. Aby bylo dosaženo vysokého výtěžku DNA a odpovídajícího genového produktu, vektor by měl obsahovat silný promotor, a také enhancer (zesilovač), signál pro amplifikaci genu a regulační sekvence. Kvůli autonomní replikaci vektoru je dále důležitý replikační počátek. Polyadenylační místa jsou zodpovědná za správné zpracování mRNA a sestříhové signály za RNA transkripty. Když jsou jako vektor užity fágy, víry nebo virové částice, sbalovací (pakážovací) signály řídí sbalování vektorové DNA. Např. pro transkripci v rostlinách jsou vhodnými vektory Ti plazmidy, pro transkripci v hmyzích buňkách bakuloviry, a v hmyzu transposony jako např. P element.

Jestliže je výše popsany vektor podle vynálezu vnesen do rostliny nebo rostlinné buňky, dosáhne se post-transkripční suprese (potlačení) genové exprese endogenního genu $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy transkripční transgenu homologního k tomuto genu nebo jeho části v „senze“ orientaci. Tato technika „senze“ potlačení exprese byla popsána např. v publikacích Baucombe 1996, *Plant. Mol. Biol.*, 9:373–382 a Brigneti a kol., 1998, *EMBO J.* 17:6 739–6 746. Tato strategie umlčení genu je účinným způsobem utlumení exprese genu $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy, viz také např. Waterhouse a kol., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13 959–13 964.

Předkládaný vynález se dále týká biologicky funkčního vektoru obsahujícího DNA molekulu podle některého z výše uvedených aspektů vynálezu nebo její části různé délky, a sice v opačné orientaci vzhledem k promotoru. Když je takový vektor transfekován do hostitelské buňky, dojde ke transkripci „antisenze mRNA“, která je komplementární k mRNA GlcNAc- $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy a vytváří s ní komplex. Tato vazba pak buďto zabrání správnému zpracování, transportu mRNA nebo poškodí její stabilitu nebo zabrání nasednutí ribozómů a tím zabrání translaci a tudíž normální expresi genu GlcNAc- $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy.

Ačkoliv může být do vektoru vložena celá molekula DNA, vzhledem k menší velikosti je pro určité účely vhodné vložit jen část její sekvence. Pokud jde o antisenze účinek, je důležité, aby molekula byla dostatečně dlouhá na to, aby vytvořila dostatečně dlouhou antisenze mRNA, která se bude vázat na mRNA transferázy. Vhodná antisenze RNA molekula obsahuje např. 50 až 200 nukleotidů, jelikož mnoho známých přirozeně se vyskytujících antisenze RNA molekul obsahuje přibližně 100 nukleotidů.

Pro zvláště účinnou inhibici exprese aktivní $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy je vhodná kombinace senze a antisenze techniky (Waterhouse a kol., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 95:13 959–13 964).

Výhodně se užívají rychle hybridizující RNA molekuly. Účinnost antisenze RNA molekul, které mají velikost délku větší než 50 nukleotidů, závisí na kinetice nasedání (annealing) *in vitro*. Tudíž např. rychle nasedající antisenze RNA molekuly vykazují větší inhibici exprese proteinu než pomalu hybridizující RNA molekuly (Wagner a kol., 1994, *Annu. Rev. Microbiol.*, 48:713–742; Rittner a kol., 1993, *Nucl. Acids Res.*, 21:1381–1387). Takové rychle hybridizující antisenze RNA molekuly zvláště obsahují velký počet externích bází (volné konce a spojovací sekvence), velký počet strukturních subdomén (složek) a současně malý počet smyček (Patzel a kol. 1998; *Nature Biotechnology*, 16; 64–68). Hypotetické sekundární struktury antisenze RNA molekul mohou být např. určeny pomocí počítačového programu, který umožní vybrat vhodnou DNA sekvenci pro antisenze RNA.

Různé úseky sekvencí DNA molekul mohou být vloženy do vektoru. Jednou možností je vložit do vektoru pouze takovou část, která je zodpovědná za nasednutí ribozómu. Blokování v tomto

úseku mRNA je dostatečné k zastavení celé translace. Zvláště vysokou účinnost mají antisenze molekuly pro 5'- a 3'-netranslatované úseky genu.

Výhodně molekuly DNA podle vynálezu obsahují sekvence obsahující mutace typu delece, inserce a/nebo substituce. Počet mutovaných nukleotidů je proměnlivý a může se jednat o deleci inserci nebo substituci jednoho až několika nukleotidů. Je také možné, že mutací dojde k posunu čtecího rámce. V takovém „knock-out“ genu (gen s vyřazenou funkcí) je důležité jen to, že exprese GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy je narušena, a je tudíž zabráněno vytváření aktivního funkčního enzymu. Při takovém postupu je místo mutace v podstatě kdekoliv, pokud zabraňuje expresi enzymaticky aktivního proteinu. Výhodná je mutace v katalytickém úseku enzymu, který je lokalizován v C-koncovém úseku. Způsoby vnášení mutací do sekvencí DNA jsou odborníkům dobře známy a proto různé způsoby mutagenese nejsou podrobněji popisovány v přihlášce. V tomto případě se může užít náhodná nebo cílená mutagenese, zejména místně cílená mutagenese, oligonukleotidem řízená mutagenese, nebo mutagenese pomocí restričních enzymů.

Předkládaný vynález dále poskytuje molekulu DNA, která kóduje ribozym, který obsahuje dvě sekvenční části každou velikosti alespoň 10 až 15 párů bází, které jsou komplementární se částmi sekvenční molekuly DNA podle vynálezu, takže ribozym vytváří komplex s a štěpí mRNA, která je transkribována z přírodní DNA molekuly kódující GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu. Ribozym rozpoznává mRNA GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy prostřednictvím komplementárního párování bází s mRNA. Tudíž ribozym štěpí a zcela destrukuje RNA sekvenčně specifickým způsobem před tím, než dojde k translaci enzymu. Po dizociaci od naštěpeného substrátu ribozym opakovaně hybridizuje s molekulou RNA a působí jako specifická endonukleáza. Obecně řečeno, ribozymy mohou být specificky připravovány pro inaktivaci určitých mRNA, dokonce i v případě, kdy není známa celá DNA sekvenční kódující protein. Ribozymy jsou zvláště účinné, když se ribozomy pohybují pomalu podél mRNA. V takovém případě je pro ribozym snazší najít místo na mRNA bez ribozómu. Z tohoto důvodu jsou některé mutanty s pomalými ribozomy také vhodné jako systémy pro ribozymy (J. Burke, 1997, Nature Biotechnology; 15, 414–415). Tato DNA molekula je zvláště výhodná pro snížení a případně inhibici exprese rostlinné GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy.

Jednou možností je také užít různé formy ribozymů, např. minizym. Minizymy jsou zvláště účinné pro štěpení delších molekul mRNA. Minizym je „kladívkovitý“ ribozym, který má krátký oligonukleotidový linker (spojku) místo stonku/smyčky II. Dimerní minizymy jsou zvláště účinné (Kuwabara a kol., 1998, Nature Biotechnology, 16; 961–965). Tudíž se předkládaný vynález týká také biologicky funkčního vektoru, který obsahuje jednu ze dvou výše zmíněných molekul DNA (mutovanou DNA molekulu nebo ribozym–DNA molekulu). Co bylo řečeno výše pokud jde o vektory platí také v tomto případě. Takový vektor může být např. vnesen do mikroorganismu a může být využit pro výrobu vysoké koncentrace výše popsaných molekul DNA. Dále je takový vektor zvláště vhodný pro vkládání specifické molekuly DNA do rostliny nebo do hmyzího organismu, aby se snížila nebo úplně inhibovala tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy v těchto organizmech.

Předkládaný vynález poskytuje způsob přípravy cDNA obsahující molekulu DNA podle vynálezu, kdy se z hmyzí nebo rostlinné buňky, zejména z buněk hypokotylu, izoluje RNA, jejíž pomocí se po přidání reverzní transkriptázy a primerů provede reverzní transkripce. Jednotlivé kroky této metody jsou samy o sobě odborníkům známy. Reverzní transkripcí je možné na jedné straně připravit cDNA z celé mRNA pomocí oligo(dT) primerů, pak provést PCR reakci pomocí vybraných primerů, čímž se připraví molekula DNA obsahující gen GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy. Na druhé straně vybrané primery mohou být přímo užity pro reverzní transkripci, aby se získaly krátké specifické úseky cDNA. Vhodné primery se připraví synteticky, např. syntézou podle vzorce cDNA sekvencí transferázy. Využitím této metody mohou být rychle jednoduše připravena velká množství molekul cDNA podle vynálezu, sice jen s málo chybami.

Vynález se dále týká způsobu klonování GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy, při kterém je molekula DNA podle vynálezu klonována do vektoru, který je po té transfekován do hostitelské buňky nebo hostitele, přičemž selekci a amplifikaci transfekovaných hostitelských buněk se získají buněčné linie, které exprimují aktivní GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, molekula DNA se vloží do vektoru pomocí restričních endonukleáz. Pro vektor platí, co již bylo uvedeno výše. Co je důležité při této metodě je to, aby byl vybrán účinný systém hostitel vektor. Pro získání aktivního enzymu jsou zvláště vhodné eukaryotické hostitelské buňky. Jednou z možností je transfekovat vektor do hmyzích buněk. Při této metodě musí být jako vektor užit hmyzí virus, např. bakulovirus.

Samozřejmě také humánní buňky a jiné buňky obratlovců mohou být transfekovány, přičemž v druhém případě pak buňky exprimují cizorodý enzym.

Výhodně vynález poskytuje způsob přípravy rekombinantních hostitelských buněk, zejména rostlinných nebo hmyzích buněk, nebo popřípadě rostlin nebo hmyzu, s potlačenou nebo úplně zastavenou tvorbou GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy, kterýžto způsob je charakterizován tím, že alespoň jeden z vektorů podle vynálezu, tj. vektor obsahující molekulu DNA podle vynálezu, molekulu mutované DNA nebo DNA molekulu kódující ribozymy nebo vektor obsahující DNA molekulu v inverzní orientaci vzhledem k promotoru, je vložena do hostitelské buňky nebo do rostliny nebo do hmyzu. Co bylo výše řečeno o transfekci je aplikovatelné také v tomto případě.

Jako hostitelské buňky se mohou např. užít rostlinné buňky, kde je využitelný Ti plazmid se systémem agrobaktéria (*Agrobacterium*). Pomocí *Agrobacterium* je možné přímo transfekovat rostliny: *Agrobacterium* způsobuje vznik kořenových hlízek (nádorů) u rostlin. Když *Agrobacterium* infikuje poraněnou rostlinu, pak samotné *Agrobacterium* nevstupuje do rostliny, ale přenáší do rostlinné buňky úsek rekombinantní DNA, tzv. T-DNA, z kruhového extrachromozomálního Ti-plazmidu, který indukuje tvorbu nádoru. T-DNA, a také molekula DNA do ní vložená, je vložena do chromozomální DNA buňky stabilním způsobem, takže geny z T-DNA jsou exprimovány v rostlině.

Existuje celá řada známých účinných transfekčních mechanismů pro různé hostitelské systémy. K příkladům patří elektroporace, kalciumfosfátová precipitace, mikroinjekce, využití liposomů apod.

Následně se transfekované buňky selektují, např. na základě rezistence k antibiotiku, jejíž gen je vložen také do vektoru, nebo pomocí jiného markerového genu. Pak se transfekované buněčné linie namnoží, buďto v malém množství např. na Petriho miskách, nebo ve velkých množstvích, např. ve fermentorech. Rostliny mají výjimečnou vlastnost, jsou totiž schopné nového vývoje z jediné (transfekované) buňky nebo případně z protoplastu, na celou rostlinu, která může být dále pěstována.

V závislosti na použitém vektoru dojde v hostiteli k tomu, že exprese enzymu bude potlačena nebo zcela zablokována:

Jestliže je transfekován vektor obsahující DNA molekulu s deleční, inzerční nebo substituční mutací, dojde k homologní rekombinaci: mutovaná molekula DNA rozpozná identickou sekvenci v genomu hostitelské buňky, přestože obsahuje mutaci, a bude vložena přesně na shodné místo, takže vznikne „knock-out“ gen (nefunkční gen). Tímto způsobem se vnese mutace do genu pro GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, která je schopná inhibovat bezchybnou expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy. Jak bylo již vysvětleno výše, při tomto způsobu je důležité, aby mutace dostatečně blokovala expresi aktivního proteinu. Po selekci a amplifikaci je možné gen sekvencovat jakožto dodatečnou kontrolu toho, že došlo úspěšně k homologní rekombinaci nebo požadovanému stupni mutace.

Jestliže je transfekován vektor kódující ribozym, je v hostitelských buňkách exprimován aktivní ribozym. Ribozym vytváří komplexy s komplementární mRNA sekvencí GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy alespoň v určitých místech a štěpí tato místa, a tímto způsobem může inhibovat translaci enzymu. V takových hostitelských buňkách nebo buněčných liniích nebo z nich případně získaných rostlin není GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáza exprimována.

V případě, že vektor obsahuje molekulu DNA podle vynálezu v sense orientaci nebo v inverzní orientaci vzhledem k promotoru, je v transfekovaných buňkách (případně rostlinách) exprimována sense mRNA nebo antisense mRNA. Antisense mRNA je komplementární alespoň k části sekvence mRNA GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy a může podobně inhibovat translaci enzymu. Pro příklad způsobu potlačení exprese genu antisense technikou odkazujeme na publikaci Smith a kol., 1990, Mol. Gen. Genet. 224:477–481, kde je popsána inhibice exprese genů zúčastněných v dozrávání rajčat.

Ve všech systémech je exprese GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy alespoň utlumena, výhodně je dokonce zcela zablokována. Stupeň narušení genové exprese je závislý na míře komplexace, homologní rekombinace, na možných následných náhodných mutacích a na dalších procesech probíhajících v genomu. Transfekované buňky jsou testovány na přítomnost GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázové aktivity a selektovány.

Navíc je možné ještě dále zesílit výše popsané potlačení (supresi) exprese α 1,3-fukosyltransferázy tím, že se do hostitele vnese vektor obsahující gen kódující savčí protein, např. β 1,4-galaktosyltransferázu, navíc k výše popsanému vektoru. Fukosylace může být redukována působením jiných savčích enzymů, kombinace inhibice exprese aktivní α 1,3-fukosyltransferázy pomocí vektorů podle vynálezu a použitím vektorů pro savčí enzym je zvláště účinná.

Pro transfekci může být užit jakýkoliv druh rostlin, např. fazol mungo, tabák, rajče a/nebo brambor.

Další výhodný způsob přípravy rekombinantních hostitelských buněk, zejména rostlinných nebo hmyzích buněk, spočívá v tom, že molekula DNA obsahující mutaci se vnese do genomu hostitelské buňky, nebo případně rostliny či hmyzu, na místo nemutované homologní sekvence (Schaefer a kol., 1997, Plant J.; 11(6): 1195–1206). Tato metoda tedy nepracuje s vektorem, ale s čistou molekulou DNA. Molekula DNA je vnesena do hostitele např. ostřelováním, mikroinjekcí nebo elektroporací, abychom uvedli alespoň tři příklady. Jak již bylo vysvětleno, molekula DNA se váže na homologní sekvenci v genomu hostitele, takže v genomu dojde k homologní rekombinaci a výsledkem je, že do genomu je vložena deleční, inserční nebo substituční mutace: exprese GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy může být utlumena nebo úplně zablokována.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká rostlin nebo rostlinných buněk, a také hmyzu nebo hmyzích buněk, jejichž GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázová aktivita je nižší než 50 %, zejména nižší než 20 %, zvláště výhodně je 0 % GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázové aktivity v přírodních rostlinných buňkách nebo rostlinách a přírodních hmyzích buňkách nebo hmyzu. Výhodou takových rostlin nebo rostlinných buněk je to, že v nich vytvářené glykoproteiny neobsahují žádný nebo jen nepatrné množství α 1,3-vázané fukózy. Pokud produkty z těchto rostlin nebo hmyzu vstoupí do těla člověkem nebo jiného obratlovce, nedojde k žádné imunitní reakci na α 1,3-fukózový epitop.

Výhodně vynález poskytuje rekombinantní rostliny nebo rostlinné buňky, které byly připraveny jedním z výše uvedených způsobů, a u nichž byla tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy utlumena nebo zcela blokována.

Předkládaný vynález se dále týká rekombinantního hmyzu nebo hmyzích buněk, které byly připraveny jednou z výše popsaných metod, a ve kterých je tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy utlumena nebo zcela zablokována. Také v tomto případě se netvoří žádné glykoproteiny mající α 1,3-vázané fukózové zbytky, takže nedojde k imunitní reakci na α 1,3-fukózový epitop.

5

Předkládaný vynález se dále týká molekul PNA, které obsahují sekvenci bází komplementární k sekvenci molekul DNA podle vynálezu nebo její částečné sekvenci. PNA (peptidová nukleová kyselina) je sekvence podobná DNA, kde jsou nukleobáze vázané na pseudopeptidovou kostru. PNA obecně hybridizuje s komplementárními DNN-, RNN- nebo PNN-oligomery na principu Watson-Crickova párování bází a vytváření šroubovice. Peptidová kostra zajišťuje větší odolnost vůči enzymatické degradaci. Molekuly PNA jsou proto zlepšenými antisense činidly. Ani nukleázy ani proteázy nejsou schopné napadat molekuly PNA. Stabilita molekul PNA, jestliže jsou navázány na komplementární sekvenci, je založena na dostatečném sterickém blokování DNA a RNA polymerázy, reverzní transkriptázy, telomerázy a ribozomů.

15

Když molekula PNA obsahuje výše uvedené sekvence, váže se na DNA nebo případně na místa v DNA, kódující GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, a takovým způsobem je tato molekula schopna inhibovat transkripci tohoto enzymu. Jelikož není ani transkribována ani translatována, molekula PNA se připravuje synteticky, tj. postupem založeným na t-Boc. Výhodně je připravena molekula PNA, která obsahuje sekvenci bází, odpovídající sekvenci molekuly DNA podle vynálezu nebo její částečné sekvenci. Molekula PNA vytváří komplex s mRNA nebo místem v mRNA pro GlcNAc- α 1,2-fukosyltransferázu, takže translace enzymu je inhibována. Argumenty podobné těm uvedeným pro antisense RNA platí i v tomto případě. Tudíž zvláště účinným úsekem pro vytvoření komplexu je úsek translačního počátku nebo také 5'-netranslatovaný úsek mRNA.

25

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu přípravy rostlin nebo hmyzu, nebo jejich buněk, zejména rostlinných nebo hmyzích buněk, u kterých je blokována expres GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy na úrovni transkripce nebo translace, který je charakterizován tím, že molekuly PNA podle vynálezu jsou vloženy do buňky. Pro vnesení molekuly nebo molekul PNA do buňky lze opět využít obvyklých postupů, které jsou odborníkovi známy, jako je např. elektroporace nebo mikroinjekce. Zvláště účinné je vnesení PNA oligomerů navázaných na peptidy penetrující do buňky, jako je např. transportan nebo pAntp (Pooga a kol., 1998, Nature Biotechnology, 16; 857-861).

35

Předkládaný vynález umožňuje přípravu rekombinantních glykoproteinů tak, že rekombinantní rostliny nebo rostlinné buňky podle vynálezu, nebo rekombinantní hmyz nebo hmyzí buňky, u nichž byla tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy utlumena nebo zcela zablokována, nebo rostliny nebo hmyz, případně jejich buňky, do kterých byly vneseny molekuly PNA způsobem podle vynálezu, jsou transfekovány genem, který exprimuje glykoprotein, takže dochází k expresi rekombinantního glykoproteinu. Při tomto postupu, jak již bylo popsáno výše, vektory obsahující geny pro požadovaný protein jsou transfekovány do hostitele nebo hostitelských buněk, jak již bylo také výše popsáno. Transfekované rostlinné nebo hmyzí buňky pak exprimují požadovaný protein a přitom nemají žádnou nebo mají jen nepatrné množství α 1,3-vázané fukózy. Takže nevyvolávají imunitní reakce u člověka nebo obratlovce, jak již bylo uvedeno výše. V takových systémech může být produkován jakýkoliv protein.

45

Výhodně vynález umožňuje přípravu rekombinantních humánních glykoproteinů tak, že rekombinantní rostliny nebo rostlinné buňky, případně rekombinantní hmyz nebo hmyzí buňky, jejichž tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy je potlačena nebo zcela zablokována, nebo rostliny nebo hmyz, nebo jejich buňky, do kterých byly vneseny molekuly PNA podle vynálezu, jsou transfekovány genem, který exprimuje glykoprotein, takže je exprimován rekombinantní glykoprotein. Tento způsob umožňuje produkovat v rostlinách (rostlinných buňkách) humánní proteiny, které po vstupu do lidského těla nevyvolávají žádnou imunitní reakci namířenou proti α 1,3-

50

vázaným fukózovým zbytkům. Takže je možné užívat k produkci rekombinantních glykoproteinů různé typy rostlin, které slouží např. jako potraviny, jako např. banány, brambory a/nebo rajčata. Pletiva těchto rostlin obsahují rekombinantní glykoprotein, takže tento rekombinantní glykoprotein je buďto z pletiv extrahován a následně podáván do lidského organismu, nebo je podáván přímo konzumací rostlinných pletiv.

Výhodně vynález umožňuje přípravu rekombinantních humánních glykoproteinů pro farmaceutické/lékařské využití, kdy rekombinantní rostliny nebo rostlinné buňky podle vynálezu, nebo rekombinantní hmyz nebo hmyzí buňky podle vynálezu, jejichž tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy je potlačena nebo zcela zablokována, nebo rostliny nebo hmyz, nebo jejich buňky, do kterých byly vneseny molekuly PNA podle vynálezu, jsou transfekovány genem, který exprimuje glykoprotein, takže je exprimován rekombinantní glykoprotein. Takto může být připraven jakýkoliv farmaceuticky/lékařsky zajímavý protein.

Další aspekt podle vynálezu se týká farmaceutického přípravku, který obsahuje glykoproteiny podle vynálezu. Kromě glykoproteinů podle vynálezu tento farmaceutický přípravek obsahuje další aditiva typická pro obdobné přípravky. Patří k nim např. vhodná ředidla s obsahem pH pufrujících látek (např. Tris-HCl, acetát, fosfát), látky ovlivňující iontovou sílu jako jsou tenzidy a solubilizační činidla (např. Tween 80, Polysorbate 80), konzervační látky (např. Thimerosal, benzylalkohol), adjuvans, antioxidanty (např. kyselina askorbová, siřičitan sodný), emulgátory a plnidla (např. laktóza, manitol). Účinná látka může být v přípravku kovalentně vázaná na polymery, jako např. polyethylenglykol, na protein, vložena do částicového (partikulárního) přípravku polymerních sloučenin jako je např. kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová atd., nebo do lipozomů. Přípravek dále může obsahovat pomocné látky a/nebo nosiče vhodné pro požadované léčení. Formulace do takových přípravků ovlivní fyzikální vlastnosti, stabilitu, *in vivo* rychlost uvolňování (liberaci) glykoproteinu podle vynálezu a *in vivo* exkreci.

Předkládaný vynález poskytuje dále způsob selekce molekul DNA, které kódují GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, ve vzorku, kdy se smíchají se vzorkem značené molekuly DNA podle vynálezu, které se váží na molekuly DNA kódují GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu. Hybridizované molekuly DNA mohou pak být snadno detekovány, kvantifikovány a selektovány. V případě vzorku, který obsahuje jednořetězcovou molekulu DNA, se kterou může značená molekula DNA hybridizovat, se vzorek denaturuje např. zahřátím. Jednou možností je separovat testovanou DNA, případně po přidání endonukleáz, gelovou elektroforézou na agarózovém gelu. Po přenesení na nitrocelulózovou membránu značené molekuly DNA podle vynálezu, které byly přidány, hybridizují s odpovídajícími homologními molekulami DNA („Southern blotting“).

Další možná cesta spočívá v nalezení homologních genů jiných biologických druhů pomocí metod užívajících PCR pomocí specifických a/nebo degenerovaných primerů, navržených na základě sekvence molekuly DNA podle vynálezu.

Výhodně pro způsob identifikace podle vynálezu obsahuje genomovou DNA rostlinného nebo hmyzího organismu. Tímto způsobem lze testovat velmi rychle a účinně velký počet rostlin a hmyzu na přítomnost GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázového genu. Takto je také možné provádět selekci rostlin a hmyzu, které neobsahují tento gen, nebo utlumit či zcela zablokovat expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy v takových rostlinách nebo hmyzu, které obsahují tento gen, a sice výše popsaným způsobem podle vynálezu, takže se následně mohou užít pro transfekci a produkci (humánních) glykoproteinů.

Předkládaný vynález se dále týká molekul DNA kódujících GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, které byly selektovány jednou ze dvou výše zmíněných metod podle vynálezu a pak byly ze vzorku izolovány. Tyto molekuly mohou být užity pro další testování. Lze je sekvencovat a případně dále využít jako DNA sondy při hledání GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáz. Tyto značené

molekuly DNA budou fungovat v organizmech, které jsou příbuzné s organizmy, ze kterých byly izolovány, mnohem účinněji než vlastní molekuly DNA podle vynálezu.

5 Další aspekt vynálezu se týká přípravy klonované GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy podle vynálezu, která obsahuje izoformy mající hodnotu pI mezi 6,0 a 9,0, zejména 6,8 až 8,2. pI hodnota proteinu je taková hodnota pH, kdy čistý náboj proteinu je nulový, a je závislá na aminokyselinové sekvenci, glykosylačnímu profilu a také na prostorové struktuře proteinu. GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáza obsahuje alespoň 7 izoform, které mají hodnotu pI v tomto rozmezí. Důvodem výskytu různých izoform transferázy jsou např. různé glykosylace a také omezená
10 proteolýza. Testy ukázaly, že různé semenáčky fazolu mungo mají různé profily izozymů. pI hodnota proteinu může být určena izoelektrickým fokusováním, což je odborníkům známo. Hlavní izoforma enzymu má zjevnou molekulovou hmotnost 54 000 (Da).

Preparát podle vynálezu zejména obsahuje izoformy mající hodnoty pI 6,8, 7,1 a 7,6.

15 Předkládaný vynález se dále týká způsobu přípravy cukerných jednotek rostlinného typu („rostlinifikovaných“) humánních glykoproteinů či glykoproteinů jiných obratlovců, kdy se fukózové jednotky a GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáza kódovaná výše popsanou molekulou DNA přidají ke vzorku, který obsahuje cukerné jednotky, případně glykoproteiny, takže fukóza je navázána
20 GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázou na sacharidovou jednotku nebo glykoprotein v pozici α 1,3. Způsobem klonování GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy podle vynálezu je možné produkovat velká množství purifikovaného enzymu. Vynález poskytuje vhodné reakční podmínky pro získání plně aktivní transferázy. Bylo ukázáno, že transferáza má zvláště vysokou aktivitu při pH přibližně 7, jestliže je jako pufr užita 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina/HCl. V přítomnosti bivalentních kationtů, zejména Mn^{2+} , je aktivita rekombinantní transferázy zvýšena. Sacharidové jednotky se smíchají se vzorkem buďto v nenavázané formě nebo vázané na protein. Rekombinantní transferáza je aktivní vůči oběma formám.

30 Předkládaný vynález je dále podrobněji vysvětlen pomocí ilustrativních příkladů a obrázků, které však vynález nijak neomezuji.

Popis obrázků

35 Obr. 1a a 1b ukazují, ve formě křivek, měřená množství proteinu a měřenou enzymatickou aktivitu v jednotlivých frakcích eluátu.

Obr. 2 ukazuje analýzu GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy gelovou elektroforézou.

40 Obr. 3 ukazuje výsledek izoelektrického fokusingu a měřenou transferázovou aktivitu jednotlivých izoform.

Obr. 4 ukazuje N-koncové sekvence 4 tryptických peptidů 1 až 4 a DNA sekvence tří primerů S1, A2 a A3.

45 Obr. 5a a 5b ukazují cDNA sekvence α 1,3-fukosyltransferáz.

Obr. 6a a 6b ukazují aminokyselinové sekvence odpovídajících α 1,3-fukosyltransferáz.

50 Obr. 7 je schematické znázornění α 1,3-fukosyltransferázy a hydrofobicity aminokyselinových zbytků.

Obr. 8 ukazuje srovnání konzervativních motivů různých fukosyltransferáz.

Obr. 9 ukazuje srovnání fukosyltransferázové aktivity hmyzích buněk transfekovaných genem $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy a negativní kontrolou.

Obr. 10a a 10b ukazují struktury různých akceptorů $\alpha 1,3$ -fukosyltransferáz.

Obr. 11 a 12 ukazují hmotnostní spektra.

Obr. 13 ukazuje výsledek analýzy HPLC.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace jádro- $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy

Všechny kroky byly provedeny ve 4 °C. Semenáčky fazolu mungo byly homogenizovány v mixéru, na každý kg bylo přidáno 0,75 objemu extrakčního pufru. Pak byl homogenát filtrován přes dvě vrstvy bavlněné tkaniny a filtrát byl centrifugován 40 minut při 30 000 g. Supernatant byl slit a pelet byl extrahován rozpouštěcím pufrem přes noc za stálého míchání. Následná centrifugace 40 minut při 30 000 g poskytla tritonový extrakt.

Tritonový extrakt byl purifikován následovně:

Krok 1: Tritonový extrakt byl nanesen na mikrogranulární diethylaminoethylcelulózovou ionto-měničovou kolonu (5x28 cm) Whatman, která byla před tím ekvilibrována pufrem A. Nenavázaná frakce byla dále zpracována v kroku 2.

Krok 2: vzorek byl nanesen na kolonu Affi-Gel Blue (2,5x32) ekvilibrovanou pufrem A. Po promytí kolony tímto pufrem byl adsorbovaný protein eluován pufrem obsahujícím 0,5M NaCl.

Krok 3: Po dialýze eluátu z kroku 2 proti pufru B, byl nanesen na kolonu se S-Sepharose ekvilibrovanou stejným pufrem. Navázaný protein byl eluován lineárním gradientem od 0 do 0,5M NaCl v pufru B. Frakce s GlcNAc- $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázou byly sloučeny a dialyzovány proti pufru C.

Krok 4: dialyzovaný vzorek byl nanesen na kolonu GnGn-Sepharose ekvilibrovanou pufrem C. Navázaný protein byl eluován pufrem C obsahujícím 1M NaCl místo $MnCl_2$.

Krok 5: Poté byl enzym dialyzován proti pufru D a nanesen na kolonu GDP-Hexanolamin-Sepharose. Po promytí kolony pufrem D byla transferáza eluována nahrazením $MgCl_2$ a NaCl pomocí 0,5mM GDP. Aktivní frakce byly sloučeny, dialyzovány proti pufru 20mM Tris-HCl, pH 7,3, a nakonec lyofilizovány.

Enzymatická aktivita GlcNAc- $\alpha 1,3$ -fukosyltransferázy byla stanovena užitím peptidu GnGn a GDP-L-[U- ^{14}C]-fukózy při koncentracích substrátu 0,5 a 0,25 každého, za přítomnosti pufru 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina/HCl, Triton X-100, $MnCl_2$, GlcNAc a AMP (podle Staudacher a kol., 1998, Glycoconjugate J. 15, 355-360; Staudacher a kol., 1991, Eur. J. Biochem. 199, 745-751).

Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí metody s bicinchinonovou kyselinou (Pierce), nebo v posledním kroku purifikace enzymu pomocí analýzy aminokyselin (Altmann 1992, Anal. Biochem. 204, 215-219).

Na obr. 1a a 1b jsou ukázána měřená množství proteinu a měřené enzymatické aktivity jednotlivých frakcí eluátu jakožto křivky. Obr. 1a ukazuje výše popsanou separaci na koloně S-Sepharose, obr. 1b ukazuje separaci na koloně GnGn-Sepharose, kroužky reprezentují protein, černě vyplněná kolečka reprezentují GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu, a čtverečky reprezentují N-acetyl- β -glukosaminidázu. Jedna jednotka (U) je definována jako takové množství enzymu, které přenesne 1 mmol fukózy na akceptor za 1 minutu.

Tabulka 1 ukazuje jednotlivé kroky purifikace transferázy.

Tabulka 1

	Celkový protein	Celková aktivita	Specifická aktivita	Purifikační faktor	Výtěžek
Purifikační krok	mg	mU	mU/mg	násobek	%
extrakt Triton X-100	91500	4846	0,05	1	100
DE52	43700	4750	0,10	2	98,0
Affigel Blue	180,5	4134	23	460	85,3
S-Sepharose	8,4	3251	390	7800	67,1
GnGn-Sepharose	0,13 ¹	1044	8030	160000	21,5
GDP-Hexanolamin-Sepharose	0,02 ¹	867	43350	867000	17,9

¹ stanoveno aminokyselinovou analýzou

Extrakční pufr:

0,5 mM dithiothreitol

1 mM EDTA

0,5% polyvinylpolypyrrolidon

0,25 M sacharóza

50 mM Tris-HCl, pH 7,3

Roztokový pufr:

0,5 mM dithiothreitol

1 mM EDTA

1,5 % Triton X-100

50 mM Tris-HCl, pH 7,3

Pufr A:

25 mM Tris-HCl pufr, pH 7,3, obsahující:

0,1 % Triton X-100 a

0,02 % NaN₃

Pufr B:

5 mM Na-citrátový pufr, pH 5,3, obsahující:

0,1 % Triton X-100 a

0,02 % NaN_3

5

Pufr C:

25 mM Tris-HCl buffer, pH 7,3, obsahující:

5 mM MnCl_2 a

0,02 % NaN_3

10

Pufr D:

25 mM Tris-HCl pufr, pH 7,3, obsahující:

10 mM MgCl_2

0,1M NaCl a

15

0,02 % NaN_3

Příklad 2

20 Analýza SDS-PAGE a izoelektrickou fokusací

SDS-PAGE byla provedena na zařízení Biorad Mini-protean cell na gelech obsahujících 12,5% akrylamid a 1 % bisakrylamid. Gely byly obarveny buďto Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo stříbrem. Izoelektrická fokusace fukosyltransferáz byla provedena na připravených
25 gelech s rozmezím pI 6 až 9 (Servalyt precotes 6-9, Serva). Gely byly barveny stříbrem podle návodu výrobce. Pro dvojrozměrnou elektroforézu byly dráhy vyřezány z fokusačního gelu, podrobeny působení S-alkylačního činidla a SDS a pak analyzovány na SDS-PAGE, jak bylo popsáno výše.

30 Obr. 2 ilustruje elektroforetický gel GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy, dvojrozměrná elektroforéza je ukázána v levé části a jednorozměrná SDS-PAGE je ukázána v pravé části. Dráha označená A je standard, dráha označená B je GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáza z GnGn-Sephrose a dráha označená C je „purifikovaná“ GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferáza, tj. frakce z kolony GDP-hexanolamin-Sephrose. Dva pásy odpovídající velikostem 54 000 a 56 000 (Da) představují
35 izoformy transferáz.

Obr. 3 ukazuje výsledek izoelektrické fokusace. Dráhy byly obarveny stříbrem a na dráze B byla testována aktivita izoform transferázy. Aktivita je vyjádřena jako % fukózy, které bylo přeneseno z GDP-fukózy na substrát.

40

Příklad 3

Sekvencování peptidu

45

Pro sekvencování proteinu byly pásy vyřezány z SDS-polyakrylamidového gelu obarveného Coomassie modří, karboxyamidomethylovány a pak štěpeny trypsinem podle publikace Garg a kol. 1988, Electrophoresis, 9, 681-692. Tryptické peptidy byly separovány HPLC s reverzní fází na koloně 1,0 x 250 mM Vydac C18 při 40 °C a průtoku 0,05 ml/min, užitím zařízení HP 1100
50 (Hewlett Packard). Izolované peptidy byly separovány na zařízení pro sekvencování Hewlett-Packard G 1005 Protein Sequencing System podle návodu výrobce. Dále pak byla směs peptidů analyzována naštěpením v gelu pomocí MALDI-TOF MS (viz níže).

Obr. 4 ukazuje N-koncovou sekvenci 4 tryptických peptidů 1 až 4 (SEKVENCE ID. Č. 5 až 8). Na základě prvních třech peptidů byly připraveny primery S1, A2 a A3 (SEKVENCE ID. Č. 9 až 11).

Příklad 4

RT-PCR a klonování cDNA

Celková RNA byla izolována z hypokotylů 3 dny starých semenáčků fazolu mungo užitím soupravy SV Total RNA Isolating System od firmy Promega. Pro přípravu prvního řetězce cDNA byla celková RNA inkubována 1 hodinu ve 48 °C s AMV reverzní transkriptázou a oligo(dT) primery, přičemž byla užitá souprava Reverse Transcription System od firmy Promega. Na jednořetězcové cDNA byla provedena PCR s kombinací senze a antisenze primerů. k 10 µl směsi pro reverzní transkripci bylo přidáno 50 µl roztoku obsahujícího: 0,1 mmol každého primeru, 0,1 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pufr, pH 9,0, 50 mM KCl a 0,1 % Triton X-100. Po prvním denaturačním kroku v 95 °C po 2 minuty proběhlo 40 cyklů po 1 minutě v 95 °C, 1 minutě ve 49 °C a 2 minutách v 72 °C. Poslední krok extenze v 72 °C byl prodloužen na 8 minut. PCR produkty byly subklonovány do vektoru pCR2.1 pomocí soupravy TA Cloning Kit od firmy Invitrogen, a pak byl sekvencován. Produkty této PCR byly dva fragmenty DNA délky 744 bp a 780 bp, přičemž oba fragmenty měly shodný 5'-konec (viz obr. 7). Použitím těchto DNA fragmentů jako výchozího materiálu byly získány chybějící 5' a 3' úseky cDNA užitím metody rychlé amplifikace 5' a 3' konců cDNA (RACE), přičemž byla užitá souprava RACE Kit od firmy Gibco-BRL. Jako antisenze primer byl užit univerzální primer ze soupravy a jako senze primer byl užit buďto primer 5'-CTGGAAGTGTCCCTGTGGTT3' (SEKVENCE ID. Č. 12) nebo 5'-AGTGCACTAGAGGGCCAGAA-3' (SEKVENCE ID. Č. 13). Byly také užity zkrácené kotvicí primer ze soupravy jako senze primer a jako antisenze primer buďto 5'-TTCGAGCACCACAATTGGAAAT-3', (SEKVENCE ID. Č. 14) nebo 5'-GAATGCAAAGACGGCACGATGAAT-3' (SEKVENCE ID. Č. 15).

PCR probíhala s teplotou nasednutí primerů („annealing“) 55 °C za jinak stejných podmínek jak bylo popsáno výše. Produkty získané metodou 5'- a 3'-RACE byly subklonovány do vektoru pCR2.1 a sekvencovány.

Sekvence subklonovaných fragmentů byly určeny metodou dideoxynukleotidového sekvencování na zařízení ABI PRISM 310 Genetic analyser užitím soupravy ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, vše od firmy Perkin Elmer. T7 a M13 „forward“ primery byly užity pro sekvencování produktů klonovaných do vektoru pCR2.1. Oba řetězce kódující oblasti byly sekvencovány v servisním středisku VBC Genomics Sequencing Service ve Vídni na zařízení LI-COR Long Read IR 4200 Sequencer (Lincoln, NE) užitím infračerveně značených primerů (IRD700 and IRD800).

Obr. 5a a 5b ukazují celou cDNA velikosti 2 198 bp a otevřený čtecí rámec velikosti 1530 bp (SEKVENCE ID. Č. 1). Otevřený čtecí rámec (start kodon tvoří páry bází 211 až 213, stop kodon 1740 až 1743) kóduje protein obsahující 510 aminokyselin s molekulovou hmotností 56 800 (DA) a teoretickou hodnotou pI 7,51.

Obr. 6a a 6b ukazují aminokyselinovou sekvenci GlcNAc-α1,3-fukosyltransferázy (SEKVENCE ID. Č. 2) odvozenou z cDNA sekvence. Místa glykosylace vázaného asparaginu jsou Asn346 a Asn429.

Obr. 7 schématicky ilustruje cDNA GlcNAc-α1,3-fukosyltransferázy (dole) a odvozený index hydrofobicity kódovaného proteinu (dole), kde pozitivní index hydrofobicity znamená zvýšenou hydrofobicitu. Ve středu jsou ukázány velikosti výše zmíněných PCR produktů ve vztahu k úplné

cDNA. Kódující úsek je vyznačen obdélníkem, kde „C“ označuje postulovaný cytoplazmatický úsek, „T“ označuje postulovaný transmembránový úsek a „G“ označuje postulovaný katalytický úsek transferázy v lumen Golgiho aparátu. Analýza sekvence DNA programem „TMPred“ (od firmy EMBnet, Switzerland) vedla k předpokladu transmembránového úseku mezi Asn36 aGly54. C–koncový úsek enzymu pravděpodobně obsahuje katalytický úsek a tudíž by měl vyčnívat do lumen Golgiho aparátu. Podle toho se zdá, že se jedná o transferázu typu II transmembránového proteinu stejně jako jsou všechny dosud analyzované glykosyltransferázy, které se podílejí na biosyntéze glykoproteinů (Joziasse, 1992, Glycobiology 2, 271–277). Šedé úseky představují čtyři tryptické peptidy, šestiúhelníky představují potenciální N–glykosylační místa. Prohledávání genových databází pomocí programu BLASTP přístupný prostřednictvím NCBI ukázalo podobnost mezi GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázou a ostatními α 1,3/4–fukosyltransferázami, např. humánní fukosyltransferázou VI. Při 18 až 21 % (vyšetřeno programem SIM-LALN VIEW, Expase, Switzerland), byla celková podobnost nevýznamná. Nicméně úsek 35 aminokyselin (SEKVENCE ID. Č. 4) vykazoval překvapivě vysokou homologii s ostatními α 1,3/4–fukosyltransferázami (obr. 8). Tento sekvenční úsek je lokalizován mezi Glu267 a Pro301 v SEKVENCI ID. Č. 2.

Příklad 5

Exprese rekombinantní GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy v hmyzích buňkách

Kódující úsek předpokládané GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy obsahující cytoplazmatický a transmembránový úsek byl amplifikován pomocí přímého („forward“) primeru 5'–CGGCGGAT-CCGCAATTGAATGATG–3' (SEKVENCE ID. Č. 16) a zpětného („reverse“) primeru 5'CCGG-CTGCAGTACCATTCTAGCGCAT–3' (SEKVENCE ID. Č. 17) užitím soupravy pro polymerázovou řetězovou reakci „Expand High Fidelity PCR System“ od firmy Boehringer Mannheim. PCR produkt byl dvojité naštěpen PstI a BamHI a subklonován do bakulovirového transferového vektoru pVL1393 ošetřeného alkalickou fosfatázou, který byl předtím také naštěpen PstI a BamHI. Pro zajištění homologní rekombinace byl transferový vektor kotransfekován s virovou DNA „Baculo Gold“ (PharMingen, Sand Diego, CA) do hmyzích buněk Sf9 v médiu IPL–41 s lipofektinem. Po inkubaci 5 dnů v 27 °C byly různé objemy supernatantu s rekombinantním virem použity pro infekci hmyzích buněk Sf21. Po inkubaci 4 dny ve 27 °C v médiu IPL–41 s 5 % FCS byly buňky Sf1 sklizeny a dvakrát opláchnuty solným roztokem pufovaným fosfátem (PBS). Pak byly buňky resuspendovány v 25 mM Tris–HCl, pH 7,4, s 2 % Triton X–100 a „rozbity“ sonikací na ledu.

Příklad 6

Test GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázové aktivity

Homogenát a buněčný supernatant byly testovány na GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázu. „Slepé“ vzorky byly provedeny s rekombinantním bakulovirem, který kódoval GlcNAc–transferázu I z tabáku (Strasser a kol., 1999, Glycobiology, v tisku).

Obr. 9 ukazuje naměřenou enzymatickou aktivitu rekombinantní GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy a negativní kontroly. V nejlepším případě byla enzymatická aktivita kotransfekovaných buněk a jejich supernatantu 30x vyšší než u negativní kontroly. Endogenní aktivita, která je měřitelná v nepřítomnosti rekombinantní transferázy pochází v podstatě z hmyzí α 1,6–fukosyltransferázy a pouze v nízkém procentu pochází z GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy. Tudíž zvýšení GlcNAc– α 1,3–fukosyltransferázy způsobené rekombinantním bakulovirem je více než 100násobné. Enzym vykazuje široké maximum aktivity kolem pH 7,0, pokud je aktivita měřena v pufru 2–(N–morfolino)–ethansulfonová kyselina/HCl. Jak je patrné z tabulky 2, přídavek bivalentního kationtu, zejména Mn^{2+} , zvyšuje aktivitu rekombinantní transferázy.

Tabulka 2

<u>Přídavek</u> <u>(konc. 10 mM)</u>	<u>Relativní aktivita</u> <u>(Akceptor: GnGn-peptid)</u> %
žádný	21
EDTA	18
MnCl ₂	100
CaCl ₂	82
MgCl ₂	52
CdCl ₂	44
CoCl ₂	35
CuCl ₂	3
NiCl ₂	24
ZnCl ₂	0,6

- 5 Tabulka 3 ukazuje, že z použitých akceptorů GnGn-peptid vykazuje nejvyšší míru inkorporace při standardním testu, pak těsně následuje GnGnF⁶-peptid a MSGn-Asn. Žádný přenos na mM peptid nebyl zjištěn, neboť mM peptid neobsahuje redukující GlcNAc-konec na 3-vázané manóze. Tato struktura se zdá být nezbytnou pro jádro-fukosyltransferázu. Rekombinantní transferáza byla navíc inaktivní vzhledem k všeobecně užívanému akceptoru, a sice α,3/4-fukosyltransferáze
- 10 užívané ke stanovení krevních skupin, která přenáší fukózu na GlcNAc na neredukujících koncích oligosacharidů. Hodnoty zjevné K_m pro akceptorový substrát GnGn peptid, GnGnF⁶-peptid, MSGn-Asn, a pro donorový substrát GDP-fukózu, byly stanoveny na 0,19, 0,13, 0,23 a 0,11, v uvedeném pořadí. Struktury molekul jsou ilustrovány na obr. 10a a 10b.

15

Tabulka 3

<u>Akceptorový substrát</u>	<u>Relativní aktivita (%)</u>	<u>K_m (mM)</u>
GnGn-peptid	100	0,19
GnGnF ⁶ -peptid	87	0,13
MSGn-Asn	71	0,23
MM-peptid	0	
Galβ-4GlcNAc	0	
Galβ1-3GlcNAc	0	
Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	0	

Příklad 7

Hmotnostní spektroskopie produktů fukosyltransferázy

Dabsylovaný GnGn hexapeptid (2 nmol) byl inkubován s homogenátem hmyzích buněk obsahujících rekombinantní GlcNAc- α ,3-fukosyltransferázu (0,08 mU) v přítomnosti ne-radioaktivní GDP-L-fukózy (10 nmol), pufru 2(N-morfolino)ethansulfonová kyselina/HCl, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc a AMP. Jako negativní kontrola sloužil homogenát hmyzích buněk infikovaných jak „slepý“ vzorek. Vzorky byly inkubovány 16 hodin ve 37 °C a pak byly analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI TOF. Hmotnostní spektrometrie se prováděla na zařízení DYNAMO (Thermo BioAnalysis, Santa Fe, NM), což je zařízení MALDI-TOF MS schopné dynamické extrakce (synonymum pro pozdní extrakci). Byly užity dva typy přípravy matrice vzorků: peptidy a dabsylované glykopeptidy byly rozpuštěny v 5% kyselině mravenčí a alikvoty byly naneseny na cíl, usušeny na vzduchu a překryty 1 % α -kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinou. Pyridylaminované glykany, redukované oligosacharidy a nederivatizované glykopeptidy byly naředěny vodou, naneseny na cíl a usušeny ve vzduchu. Po přidání 2% 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny byly vzorky okamžitě usušeny aplikací vakua.

Obr. 11 ukazuje hmotnostní spektrum těchto vzorků: A je negativní kontrola, hlavní vrchol (S) vykazuje substrát Dabsyl-Val-GlyGlu-(GlcNAc₄Man₃)Asn-Arg-Thr, vypočtená hodnota $[M+H]^+$ je 2 262,3. Tento substrát se vyskytuje také jako sodná adiční sůl a také jako menší ion, který vznikl fragmentací azoskupiny Dabsylové skupiny v (S*). Množství malých produktů (P, $[M+H]^+ = 2\ 408,4$) je důsledkem endogenní α 1,6-fukosyltransferázy. Vrchol při $m/z = 2\ 424,0$ ukazuje na neúplnou degalaktosylaci substrátu. Hmotnostní spektrum B ukazuje vzorek s rekombinantní α 1,3-fukosyltransferázou. Hlavní vrchol (P) reprezentuje fukosylovaný produkt, (P*) jeho fragmentovaný ion.

Navíc byly alikvoty obou vzorků navzájem smíchány, aby se získaly podobné koncentrace substrátu a produktu (vzorek A). Tato směs byla naředěna 0,1 M octanem amonným pH 4,0, obsahujícím 10 mU N-glykosidázy (vzorek B), nebo 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, obsahujícím 100 mU (1 U hydrolyzuje 1 mmol substrátu za 1 minutu) N-glykosidázy F (vzorek C). Po 2 a 20 hodinách byly odebrány malé alikvoty těchto vzorků a analyzovány metodou MALDI-TOF MS.

Na obr. 12 jsou ukázána tři hmotnostní spektra vzorků A, B a C. Nenaštěpený vzorek A vykazuje dva hlavní vrcholy: substrát při 2 261,4 m/z , a fukosylovaný produkt při 2 407,7 m/z . Střední křivka ukazuje hmotnostní spektrum vzorku B, ošetřeného N-glykosidázou A, která hydrolyzuje oba glykopeptidy. Vrchol v 963,32 představuje deglykosylovaný produkt. Spodní křivka je spektrum vzorku C. N-glykosidáza F není schopna hydrolyzovat α 1,3-fukosylované substráty, takže spektrum má vrchol v 2 406,7 m/z fukosylovaného produktu, přičemž vrchol hydrolyzovaného substrátu se objevuje při 963,08 m/z .

Příklad 8

HPLC-analýza pyridil-aminovaného produktu fukosyltransferázy

Dva výše zmíněné vzorky (fukosylovaný produkt a negativní kontrola) byly naštěpeny N-glykosidázou A. Oligosacharidy takto získané byly pyridylaminovány a analyzovány užitím HPLC s reverzní fází (Wilson a kol., 1998, Glycobiology 8, 651-661; Kubelka a kol., 1994, Arch. Biochem. Biophys. 308, 148-157; Hase a kol., 1984, J. Biochem. 95, 197-203).

Na obr. 13 horní diagram B představuje negativní kontrolu, kde je kromě reziduálního substrátu (GnGn-peptid) viditelný i 1,6-fukosylovaný produkt. A má vrchol při podstatně kratším retenčním čase, což je specifické pro redukci fukózy navázané na GlcNAc- α 1,3. Na spodním diagramu je srovnán izolovaný produkt transferázy před (křivka A) a po štěpení (křivka B) N-acetyl- β glukosaminidázou s fosfolipázou A2 včel mMF3 (křivka C).

Seznam sekvencí

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> rostlina

<400> 1

```

actaactcaa acgctgcatt ttcttttttc ttccaggga ccatccaccc ataacaacaa 60
aaaaaacaac agcaagctgt gtttttttta tcgttctttt tctttaaaca agcaccocca 120
tcatggaatc gtgctcataa cgccaaaatt ttccatttcc ctttgatttt tagtttattt 180
tgcggaattg gcagttgggg gcgcaattga atgatgggtc tgttgacgaa tcttcgaggc 240
tcgagaacag atggtgcccc acaagacagc ttacccgttt tggctccggg aggcaacca 300
aagaggaaat ggagcaatct aatgcctctt gttgttgccc ttgtggtcat cgcgagatc 360
gcgtttcttg gtaggttga tatggccaaa aacgccgcca tgggtgactc cctcgctgac 420
ttcttctacc gctctcgagc ggtcgttgaa ggtgacgatt tggggttggg tttggtggct 480
tctgatcgga attctgaatc gtatagttgt gaggaatggt tggagaggga ggatgctgtc 540
acgtattcga ggggcttttc caaagagcct atttttgttt ctggagctga tcaggagtgg 600
aagtcgtgtt cgggttgatg taaatttggg tttagtgggg atagaaagcc agatgccgca 660
tttgggttac ctcaaccaag tggaacagct agcattctgc gatcaatgga atcagcagaa 720
tactatgctg agaacaatat tgccatggca agacggaggg gatataacat cgtaatgaca 780
accagtctat cttcgatgt tctgttgga tatttttcat gggctgagta tgatatgatg 840
gcaccagtgc agccgaaaac tgaagctgct cttgcagctg ctttcatttc caattgtggt 900
gctcgaaatt tccggttgca agctcttgag gcccttgaaa aatcaaacat caaattgat 960
tcttatggtg gttgtcacag gaaccgtgat ggaagagtga acaaagtgga agccctgaag 1020
cactacaaat ttagcttagc gtttgaaaat tcgaatgagg aagattatgt aactgaaaaa 1080
ttcttccaat cccttggtgc tggaaactgtc cctgtggttg ttggtgctcc aaatattcag 1140
gactttgctc cttctcctgg ttcaatttta catattaaag agatagagga tgttgagtct 1200
gttgcaaaaga ccatgagata tctagcagaa aatcccgaag catataatca atcattgagg 1260
tggaagtatg aggggtccatc tgactccttc aaggcccttg tggatatggc agctgtgcat 1320
tcacgtgcc gtctttgcat tcacttgcc acagtgagta gagagaagga agaaaataat 1380
ccaagcctta agagacgtcc ttgcaagtgc actagagggc cagaaaccgt atatcatatc 1440
tatgtcagag aaaggggaag gtttgagatg gagtccattt acctgaggtc tagcaattta 1500
actctgaatg ctgtgaaggc tgctgttgtt ttgaagttca catccctgaa tcttgtgcct 1560
gtatggaaga ctgaaaggcc tgaagttata agagggggga gtgctttaaa actctacaaa 1620

```

atatacccaa ttggcttgac acagagacaa gctctttata ccttcagett caaaggtgat 1680
 gctgatttca ggagtcactt ggagaacaat ccttggtgcca agtttgaagt catttttgtg 1740
 tagcatgcgc taaatggtac ctctgctcta cctgaattag cttcacttag ctgagcacta 1800
 gctagagttt taggaatgag tatggcagtg aatatggcat ggctttatatt atgcctagtt 1860
 tcttggccaa ctcatgatg ttttgtataa gacatcacac ttttaatttta aacttgtttc 1920
 tgtagaagtg caaatccata tttaatgctt agtttttagtg ctcttatctg atcatctaga 1980
 agtcacagtt cttgtatatt gtgagtgaat actgaaatct aatagaagga tcagatgttt 2040
 cactcaagac acattattac ttcattgttg tttgatgatc tcgagctttt ttagtggtctg 2100
 gaactgtccc tgtggtttga gcacctgtta ttgcttcagt gttactgtcc agtgggttatc 2160
 gtttttgacc tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2198

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> rostlina

<400> 2

Met	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Ala
1				5					10					15	
Gln	Gln	Asp	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Asn	Pro	Lys	Arg
			20					25					30		
Lys	Trp	Ser	Asn	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Ala
		35					40					45			
Glu	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Met	Ala	Lys	Asn	Ala	Ala	Met
	50					55					60				
Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Glu
65				70					75					80	
Gly	Asp	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Asp	Arg	Asn	Ser	Glu
			85					90					95		
Ser	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Trp	Leu	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr
			100				105					110			
Ser	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Glu	Pro	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Gln
		115				120					125				
Glu	Trp	Lys	Ser	Cys	Ser	Val	Gly	Cys	Lys	Phe	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp
	130					135				140					
Arg	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala
145				150					155					160	
Ser	Ile	Leu	Arg	Ser	Met	Glu	Ser	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Asn	Asn

165	170	175
Ile Ala Met Ala Arg Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser		
180	185	190
Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp		
195	200	205
Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala		
210	215	220
Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu		
225	230	235 240
Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His		
245	250	255
Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr		
260	265	270
Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr		
275	280	285
Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val		
290	295	300
Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu		
305	310	315 320
His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg		
325	330	335
Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys		
340	345	350
Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala		
355	360	365
Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg		
370	375	380
Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys		
385	390	395 400
Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly		
405	410	415
Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu		

420	425	430
Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu		
435	440	445
Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser		
450	455	460
Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln		
465	470	475 480
Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His		
485	490	495
Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val		
500	505	510

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: cDNA

<400> 3

gaagccctga agcactacaa atttagctta gcgtttgaaa attcgaatga ggaagattat 60
 gtaactgaaa aattcttcca atoccttggt gctggaactg tccct 105

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: peptid

<400> 4

Glu Ala Leu Lys His Tyr Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn
1 5 10 15

Glu Glu Asp Tyr Val Thr Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly
20 25 30

Thr Val Pro

35

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: peptid

<400> 5

Lys Pro Asp Ala Xaa Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Thr Ala Ser

1

5

10

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: peptid

<400> 6

Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg

1

5

10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 7

Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn Ile Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: peptid

<400> 8
 Gly Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu
 1 5 10

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 9
 gcngartayt aygcngaraa yaayathgc 29

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 10
 crtadatrtg rtanacngty tc 22

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 11
 tadatnswyt ccatytcraa 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 12
 ctggaactgt ccctgtggtt 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 13
agtgcactag agggccagaa 20

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 14
ttcgagcacc acaattggaa at 22

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 15
gaatgcaaag acggcacgat gaat 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 16
cggcggatcc gcaattgaat gatg 24

<210> 17
<211> 25
<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: DNA

<400> 17

cgggctgcag taccatttag cgcac

25

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Molekula DNA, která obsahuje SEKVENCI ID. Č. 1 s otevřeným čtecím rámcem od páru bází 211 do páru bází 1740, nebo je alespoň z 50 % identická s touto sekvencí, nebo s ní hybridizuje za stringentních podmínek, nebo obsahuje sekvenci k ní degenerovanou z důvodu degenerace genetického kódu, přičemž sekvence kóduje rostlinný protein s fukosyltransferázovou aktivitou, nebo sekvenci k ní komplementární.
2. Molekula DNA podle nároku 1, která kóduje protein mající GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázovou aktivitu, zejména jádro- α 1,3-fukosyltransferázovou aktivitu.
3. Molekula DNA podle nároku 1 nebo 2, která že má alespoň 70 až 80%, zvláště výhodně alespoň 95% identitu se SEKVENCÍ ID. Č. 1.
4. Molekula DNA podle některého z nároků 1 až 3, která obsahuje 2150 až 2250, zvláště 2198 párů bází.
5. Molekula DNA, která obsahuje SEKVENCI ID. Č. 3 nebo obsahuje sekvenci alespoň z 85 %, zvláště z 95 % s ní identickou nebo sekvenci s ní hybridizující za stringentních podmínek nebo sekvenci k ní degenerovanou z důvodu degenerace genetického kódu.
6. Molekula DNA, která obsahuje částečnou sekvenci molekuly DNA podle některého z nároků 1 až 4 a má identitu z alespoň 80 % k SEKVENCI ID Č. 1 a má velikost 20 až 200, výhodně 30 až 50 párů bází.
7. Molekula DNA podle některého z nároků 1 až 6, která je kovalentně asociována s detekovatelnou markerovou substancí.
8. Biologicky funkční vektor, který obsahuje molekulu DNA podle některého z nároků 1 až 7.
9. Biologicky funkční vektor, který obsahuje molekulu DNA podle některého z nároků 1 až 7, která je opačně orientována vzhledem k promotoru.
10. Molekula DNA kódující ribozym, která má dva sekvenční úseky, každý délky alespoň 10 až 15 párů bází, které jsou komplementární s úseky sekvencí molekuly DNA podle některého z nároků 1 až 7, takže ribozym komplexuje a štěpí mRNA transkribovanou z přírodní molekuly DNA kódující GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu.
11. Biologicky funkční vektor, který obsahuje molekulu DNA podle nároku 10.

12. Způsob přípravy cDNA obsahující molekulu DNA podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že RNA se izoluje z rostlinných buněk, zvláště z buněk hypokotylu, nebo hmyzích buněk a s touto RNA se po přidání reverzní transkriptázy a primeru provede reverzní transkripce.
13. Způsob klonování GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy, **vyznačující se tím**, že molekula DNA podle některého z nároků 1 až 5 se klonuje do vektoru, který se pak transfekcí vnese do hostitelské buňky nebo hostitele, přičemž selekcí a amplifikací se získají linie transfe-kovaných hostitelských buněk, které exprimují aktivní GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu.
14. Způsob přípravy rekombinantních hostitelských buněk, zejména rostlinných nebo hmyzích buněk, nebo rostlin nebo hmyzu, ve kterých je tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy utlume-na nebo zcela zastavena, **vyznačující se tím**, že se do hostitelských buněk nebo rost-liny nebo hmyzu vnese alespoň jeden vektor podle nároků 9 nebo 11, nebo vektor obsahující molekulu DNA podle některého z nároků 1 až 7, přičemž sekvence DNA obsahuje deleční, inserční a/nebo substituční mutaci.
15. Způsob přípravy rekombinantních hostitelských buněk, zejména rostlinných buněk, nebo rostlin, **vyznačující se tím**, že do genomu hostitelských buněk nebo rostliny se vloží molekula DNA podle některého z nároků 1 až 7, přičemž DNA sekvence obsahuje deleční, inserční a/nebo substituční mutaci, do pozice nemutované homologní sekvence.
16. Rekombinantní rostlina, rostlinná buňka nebo rostlinná tkáň, do které je vložen alespoň jeden z vektorů podle nároků 8, 9 nebo 11, nebo vektor obsahující molekulu DNA podle někte-rého z nároků 1 až 7, přičemž DNA sekvence obsahuje deleční, inserční a/nebo substituční mutaci a ve kterých je tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyl-transferázy utlumena nebo zcela zastavena.
17. Rekombinantní rostlina, rostlinná buňka nebo rostlinná tkáň, u které je do genomu buňky, rostliny nebo rostlinné tkáně na místo nemutované homologní sekvence vložena molekula DNA podle některého z nároků 1 až 7, přičemž DNA sekvence obsahuje deleční, inserční a/nebo sub-stituční mutaci a ve kterých je endogenní tvorba GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy utlumena nebo zcela zastavena.
18. Molekula peptidnukleové kyseliny (PNA), která obsahuje sekvenci bází komplementární k sekvenci DNA molekuly podle některého z nároků 1 až 6, která kóduje GlcNAc- α 1,3-fukosy-ltransferázu.
19. Molekula peptidnukleové kyseliny (PNA), která obsahuje sekvenci bází odpovídající sek-venci molekuly DNA podle některého z nároků 1 až 6, která kóduje GlcNAc- α 1,3-fukosyltrans-ferázu.
20. Způsob přípravy rostlin, popřípadě buněk, zejména rostlinných buněk, které mají blokova-nou expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy na úrovni transkripce nebo translace, **vyzna-čující se tím**, že se do buněk vloží molekula PNA podle nároku 18 nebo 19.
21. Způsob přípravy rekombinantních glykoproteinů, **vyznačující se tím**, že se do rekombinantní rostliny, rostlinné buňky nebo rostlinné tkáně podle nároku 16 nebo 17, nebo rostliny, rostlinné tkáně nebo buňky, do kterých je vnesena molekula PNA podle nároku 18 nebo 19 a které mají blokovanou expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy na úrovni transkripce nebo translace, transfekcí vnese gen, který je kódován pro glykoprotein, takže je tento rekombinantní glykoprotein exprimován.
22. Způsob přípravy rekombinantních humánních glykoproteinů, **vyznačující se tím**, že se do rekombinantní rostliny, rostlinné buňky nebo rostlinné tkáně podle nároku 16 nebo 17,

nebo rostliny, rostlinné tkáně nebo buňky, do kterých je vnesena molekula PNA podle nároku 18 nebo 19 a které mají blokovanou expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázy na úrovni transkripce nebo translace, transfekcí vnese gen, který je kódován pro glykoprotein, takže je tento rekombinantní glykoprotein exprimován.

5

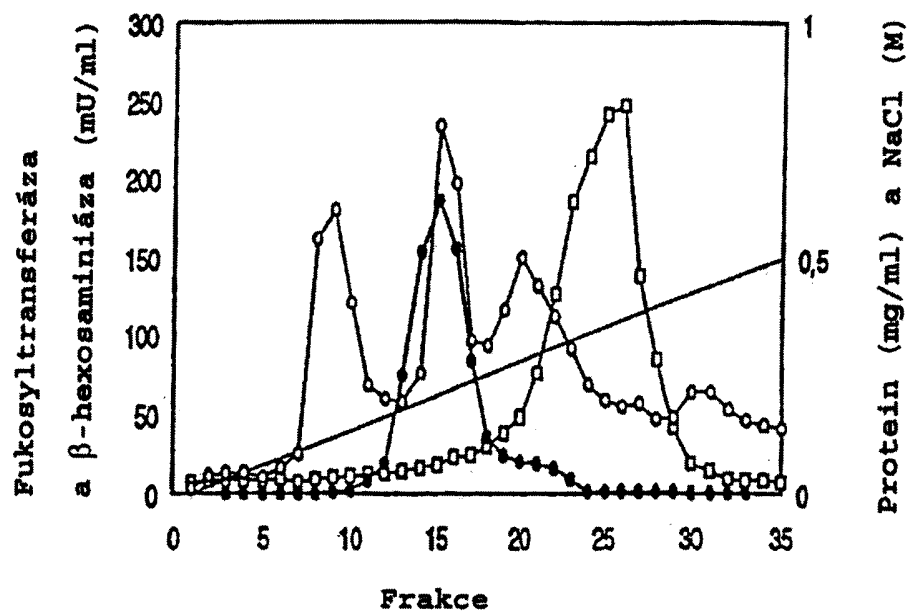
23. Způsob přípravy rekombinantních humánních glykoproteinů pro léčebné použití, **v y z n a -**
č u j í c í s e t í m, že se do rekombinantní rostliny, rostlinné buňky nebo rostlinné tkáně podle
 nároku 16 nebo 17, nebo rostliny, rostlinné tkáně nebo buňky, do kterých je vnesena molekula
 PNA podle nároku 18 nebo 19 a které mají blokovanou expresi GlcNAc- α 1,3-fukosyltrans-
 10 ferázy na úrovni transkripce nebo translace, transfekcí vnese gen, který je kódován pro gly-
 koprotein, takže je tento rekombinantní glykoprotein exprimován.

24. Způsob selekce molekul DNA kódujících GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu ve vzorku,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se ke vzorku přidá molekula DNA podle nároku 7, která se váže
 15 k molekule DNA kódující GlcNAc- α 1,3-fukosyltransferázu.

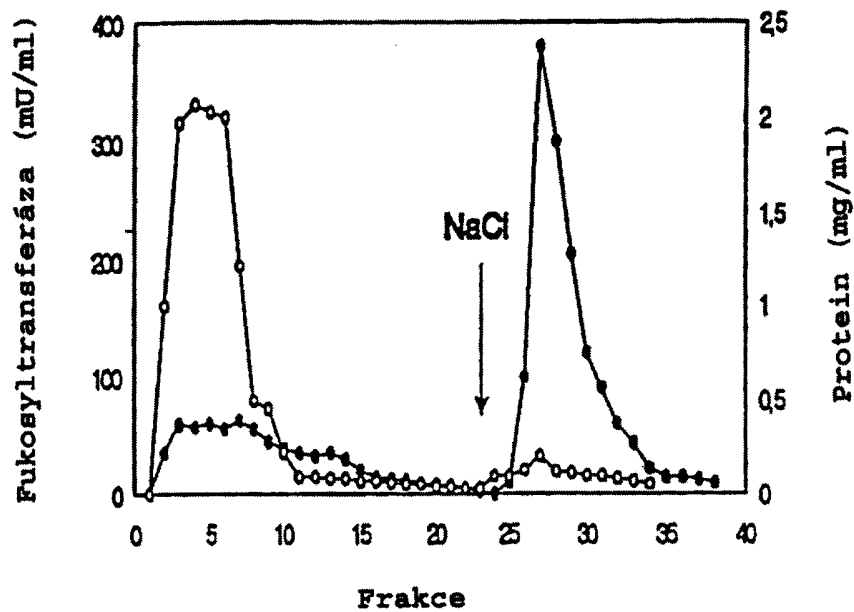
25. Způsob podle nároku 24, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vzorek obsahuje genomovou
 DNA rostlinného organismu.

20

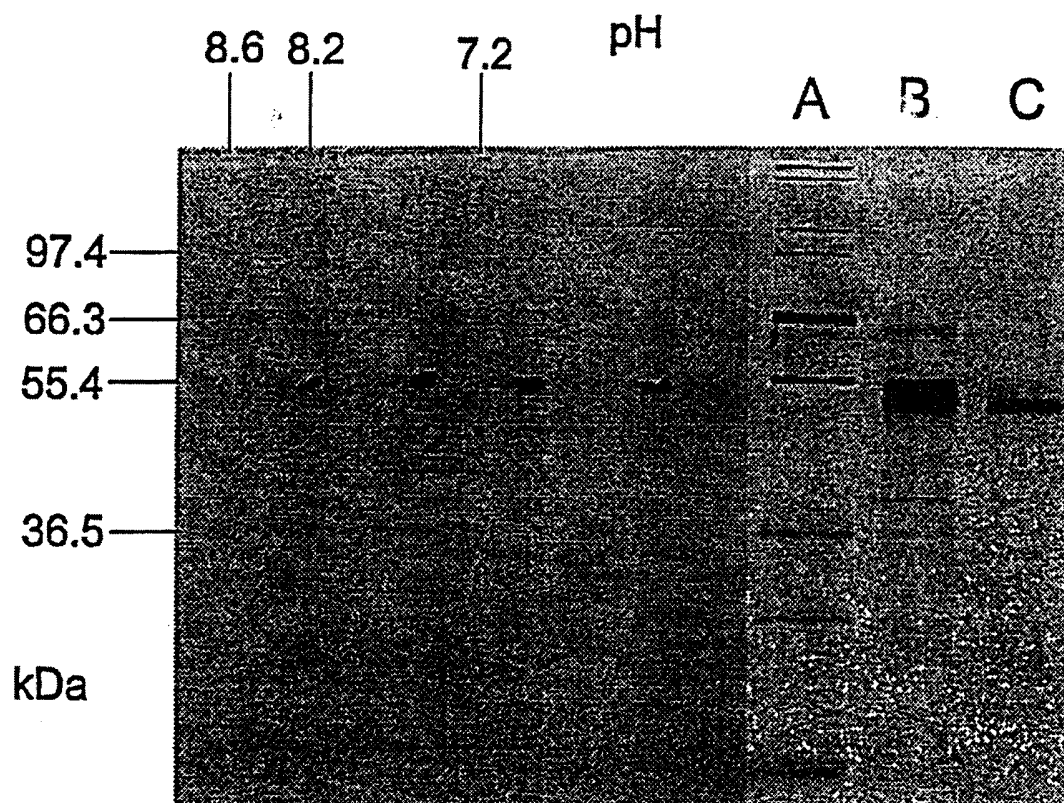
16 výkresů



Obr. 1a

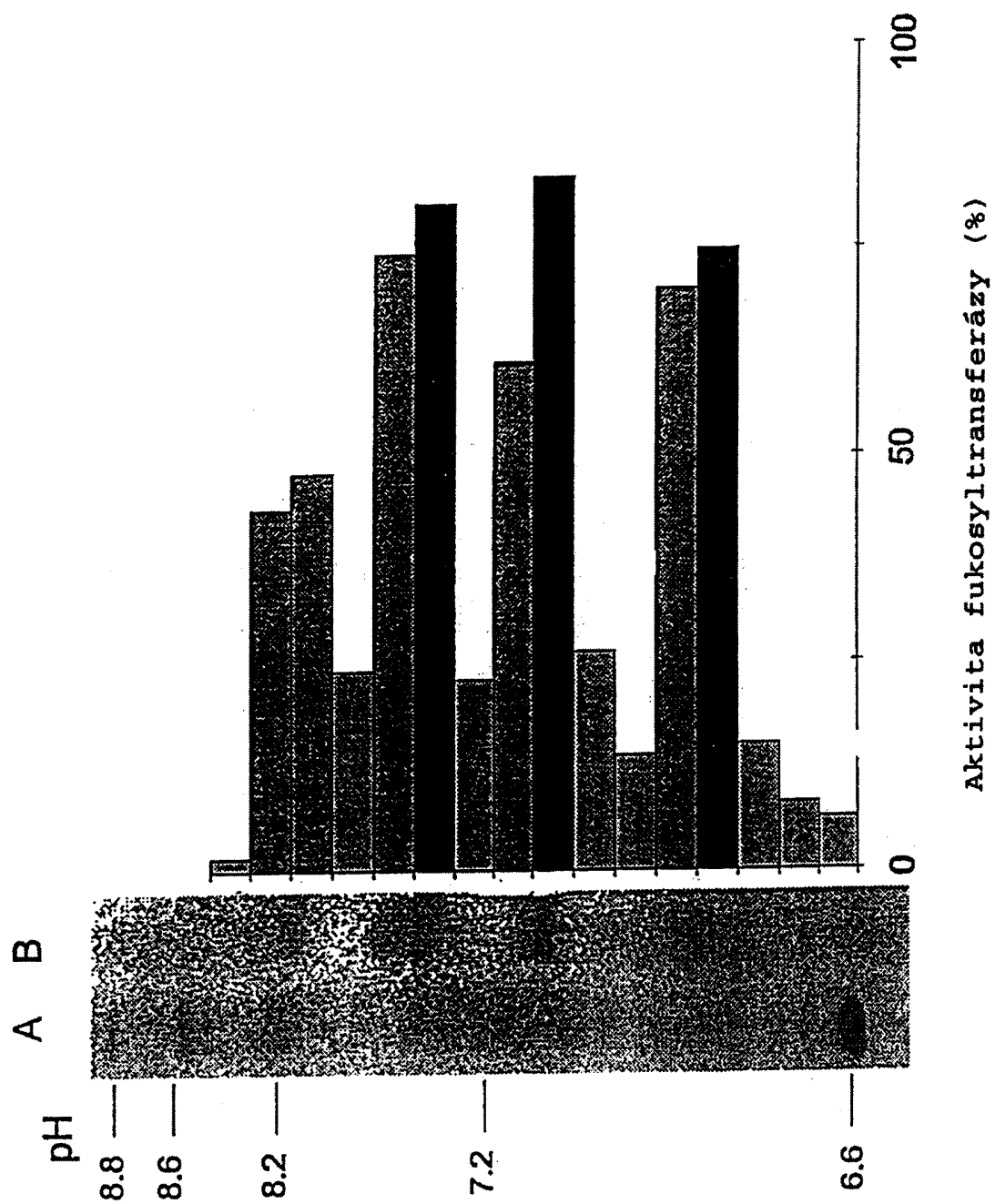


Obr. 1b



Obr. 2

Obr. 3



- 1 KPDA_xFGLPQPSTAS
- 2 PETVYHIYVR
- 3 MESA EYYAENNIA
- 4 GRFEMESIYL

S1 5'- GCIGAATACTACGCIGAAAACAACAT^ACGC -3'
 G T T G T T T

A2 5'- CATAGATATGATAIACIGTCTC -3'
 G T G G T

A3 5'- TAGAT^AICACTCCATCTCAAA - 3'
 T GTT T G

Obr. 4

ACTAACTCAA ACGCTGCATT TTCTTTTTTC TTTCAGGGAA CCATCCACCC ATAACAACAA	60
AAAAAACAAC AGCAAGCTGT GTTTTTTTTA TCGTTCTTTT TCTTTAAACA AGCACCCCCA	120
TCATGGAATC GTGCTCATAA CGCCAAAATT TTCCATTTC CTTTGATTTT TAGTTTATTT	180
TGCGGAATTG GCAGTTGGGG GCGCAATTGA ATGATGGGTC TGTTGACGAA TCTTCGAGGC	240
TCGAGAACAG ATGGTGCCCA ACAAGACAGC TTACCCGTTT TGGCTCCGGG AGGCAACCCA	300
AAGAGGAAAT GGAGCAATCT AATGCCTCTT GTTGTGCCC TTGTGGTCAT CGCGGAGATC	360
GCGTTTCTGG GTAGGTTGGA TATGGCCAAA AACGCCGCCA TGGTTGACTC CCTCGTGAC	420
TTCTTCTACC GCTCTCGAGC GGTCGTTGAA GGTGACGATT TGGGGTTGGG TTTGGTGGCT	480
TCTGATCGGA ATTCTGAATC GTATAGTTGT GAGGAATGGT TGGAGAGGGA GGATGCTGTC	540
ACGTATTCTGA GGGGCTTTTC CAAAGAGCCT ATTTTGTGTT CTGGAGCTGA TCAGGAGTGG	600
AAGTCGTGTT CGGTTGGATG TAAATTGGG TTTAGTGGG ATAGAAAGCC AGATGCCGCA	660
TTTGGGTTAC CTCAACCAAG TGGAACAGCT AGCATTCTGC GATCAATGGA ATCAGCAGAA	720
TACTATGCTG AGAACAATAT TGCCATGGCA AGACGGAGGG GATATAACAT CGTAATGACA	780
ACCAGTCTAT CTTCGGATGT TCCTGTTGGA TATTTTTCAT GGGCTGAGTA TGATATGATG	840
GCACCACTGC AGCCGAAAAC TGAAGCTGCT CTTGCAGCTG CTTTCATTTC CAATTGTGGT	900
GCTCGAAATT TCCGGTTGCA AGCTCTTGAG GCCCTTGAAA AATCAAACAT CAAAATTGAT	960
TCTTATGGTG GTTGTCACAG GAACCGTGAT GGAAGAGTGA ACAAAGTGGA AGCCCTGAAG	1020
CACTACAAAT TTAGCTTAGC GTTTGAAAAT TCGAATGAGG AAGATTATGT AACTGAAAAA	1080
TTCTTCCAAT CCCTGTTGC TGGAACGTC CCTGTGGTTG TTGGTGCTCC AAATATTGAG	1140

Obr. 5a

GACTTTGCTC CTTCTCCTGG TTCAATTTTA CATATTAAAG AGATAGAGGA TGTGAGTCT	1200
GTTGCAAAGA CCATGAGATA TCTAGCAGAA AATCCCGAAG CATATAATCA ATCATTGAGG	1260
TGGAAGTATG AGGGTCCATC TGA CTCCTTC AAGGCCCTTG TGGATATGGC AGCTGTGCAT	1320
TCATCGTGCC GTCTTTGCAT TCACTTG GCC ACAGTGAGTA GAGAGAAGGA AGAAAATAAT	1380
CCAAGCCTTA AGAGACGTCC TTGCAAGTGC ACTAGAGGGC CAGAAACCGT ATATCATATC	1440
TATGTCAGAG AAAGGGGAAG GTTTGAGATG GAGTCCATTT ACCTGAGGTC TAGCAATTTA	1500
ACTCTGAATG CTGTGAAGGC TGCTGTTGTT TTGAAGTTCA CATCCCTGAA TCTTGTGCCT	1560
GTATGGAAGA CTGAAAGGCC TGAAGTTATA AGAGGGGGGA GTGCTTTAAA ACTCTACAAA	1620
ATATACCCAA TTGGCTTGAC ACAGAGACAA GCTCTTTATA CCTTCAGCTT CAAAGGTGAT	1680
GCTGATTTCA GGAGTCACTT GGAGAACAAT CCTTGTGCCA AGTTTGAAGT CATTTTTGTG	1740
TAGCATGCGC TAAATGGTAC CTCTGCTCTA CCTGAATTAG CTTCACTTAG CTGAGCACTA	1800
GCTAGAGTTT TAGGAATGAG TATGGCAGTG AATATGGCAT GGCTTTATTT ATGCCTAGTT	1860
TCTTGGCCAA CTCATTGATG TTTGTATAA GACATCACAC TTTAATTTTA AACTTGTTTC	1920
TGTAGAAGTG CAAATCCATA TTTAATGCTT AGTTTTAGTG CTCTTATCTG ATCATCTAGA	1980
AGTCACAGTT CTTGTATATT GTGAGTGAAA ACTGAAATCT AATAGAAGGA TCAGATGTTT	2040
CACTCAAGAC ACATTATTAC TTCATGTTGT TTTGATGATC TCGAGCTTTT TTAGTGTCTG	2100
GAACTGTCCC TGTGGTTTGA GCACCTGTTA TTGCTTCAGT GTTACTGTCC AGTGGTTATC	2160
GTTTTTGACC TCTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA	2198

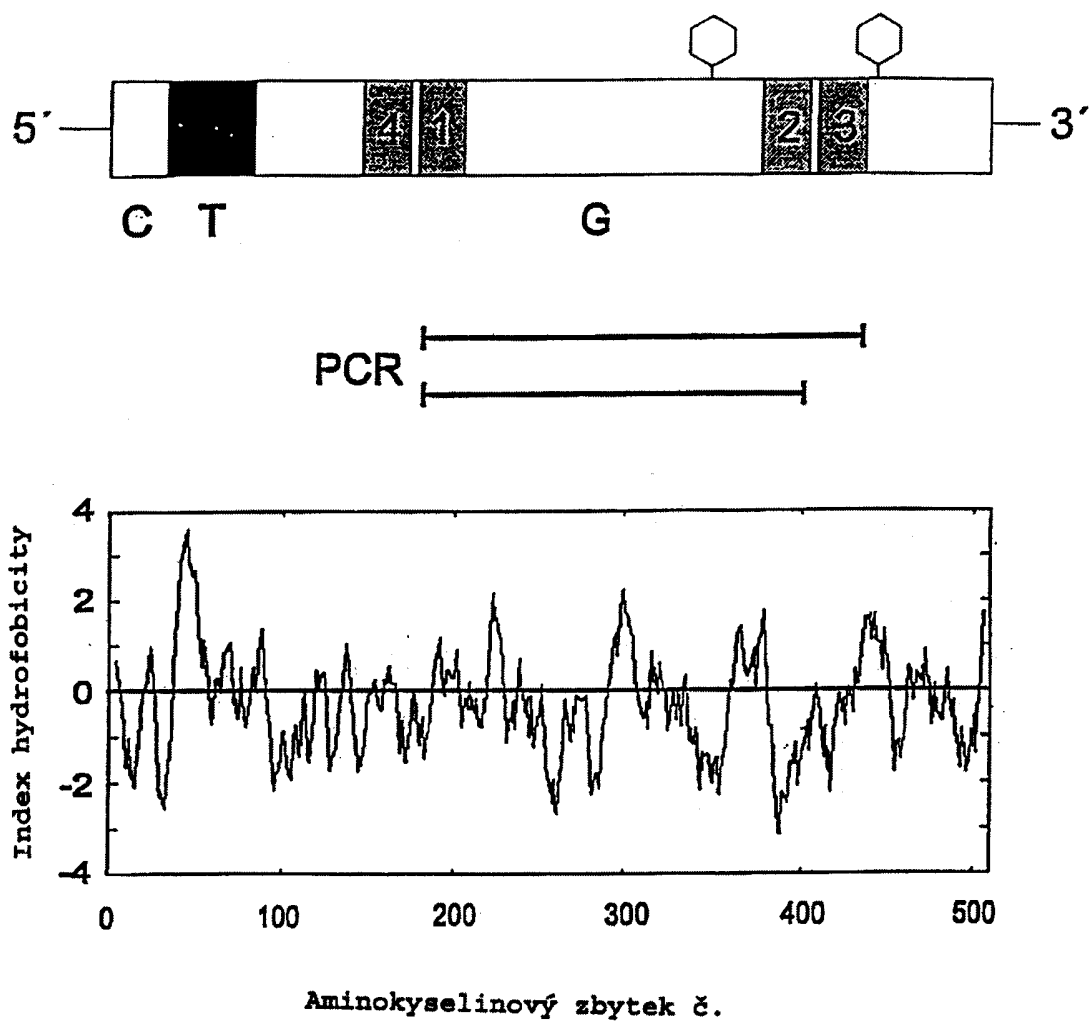
Obr. 5b

Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Arg Gly Ser Arg Thr Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Gln Gln Asp Ser Leu Pro Val Leu Ala Pro Gly Gly Asn Pro Lys Arg
 20 25 30
 Lys Trp Ser Asn Leu Met Pro Leu Val Val Ala Leu Val Val Ile Ala
 35 40 45
 Glu Ile Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Met Ala Lys Asn Ala Ala Met
 50 55 60
 Val Asp Ser Leu Ala Asp Phe Phe Tyr Arg Ser Arg Ala Val Val Glu
 65 70 75 80
 Gly Asp Asp Leu Gly Leu Gly Leu Val Ala Ser Asp Arg Asn Ser Glu
 85 90 95
 Ser Tyr Ser Cys Glu Glu Trp Leu Glu Arg Glu Asp Ala Val Thr Tyr
 100 105 110
 Ser Arg Gly Phe Ser Lys Glu Pro Ile Phe Val Ser Gly Ala Asp Gln
 115 120 125
 Glu Trp Lys Ser Cys Ser Val Gly Cys Lys Phe Gly Phe Ser Gly Asp
 130 135 140
 Arg Lys Pro Asp Ala Ala Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ser Ile Leu Arg Ser Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn
 165 170 175
 Ile Ala Met Ala Arg Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp
 195 200 205
 Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala
 210 215 220
 Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His

Obr. 6a

Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr
 260 265 270
 Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr
 275 280 285
 Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val
 290 295 300
 Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu
 305 310 315 320
 His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg
 325 330 335
 Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys
 340 345 350
 Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala
 355 360 365
 Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg
 370 375 380
 Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys
 385 390 395 400
 Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly
 405 410 415
 Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu
 420 425 430
 Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
 435 440 445
 Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
 450 455 460
 Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
 465 470 475 480
 Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
 485 490 495
 Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
 500 505 510

Obr. 6b

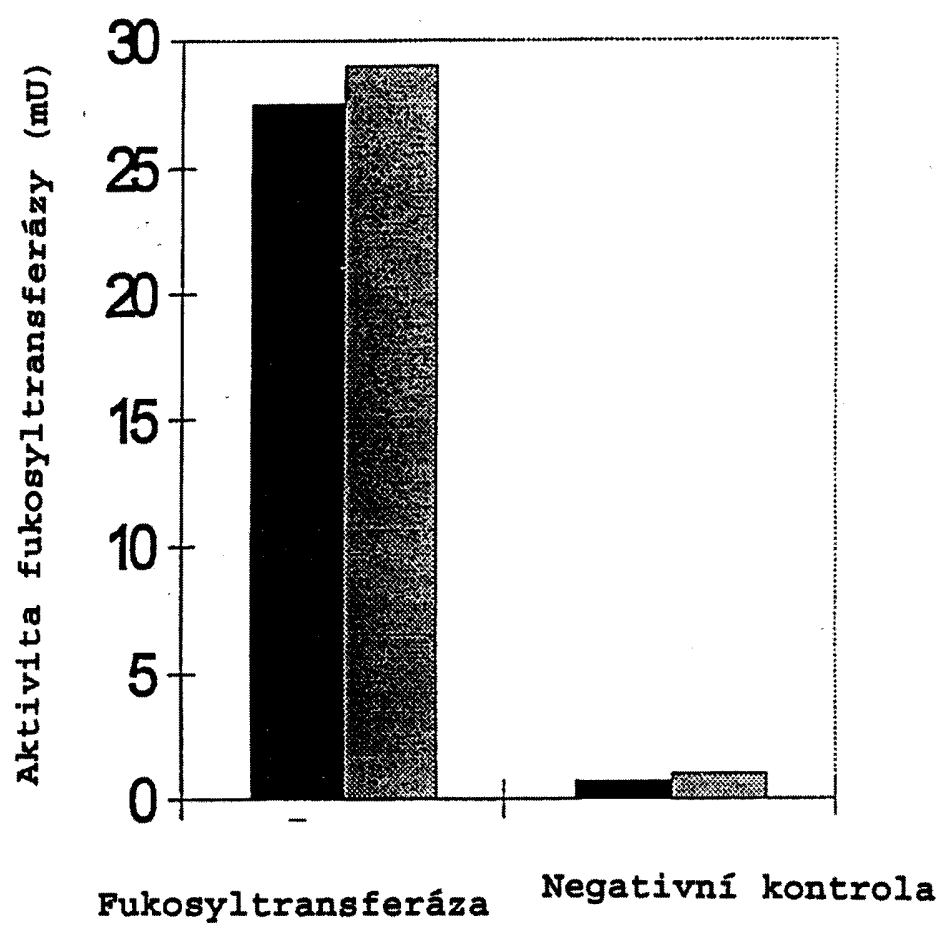


Obr. 7

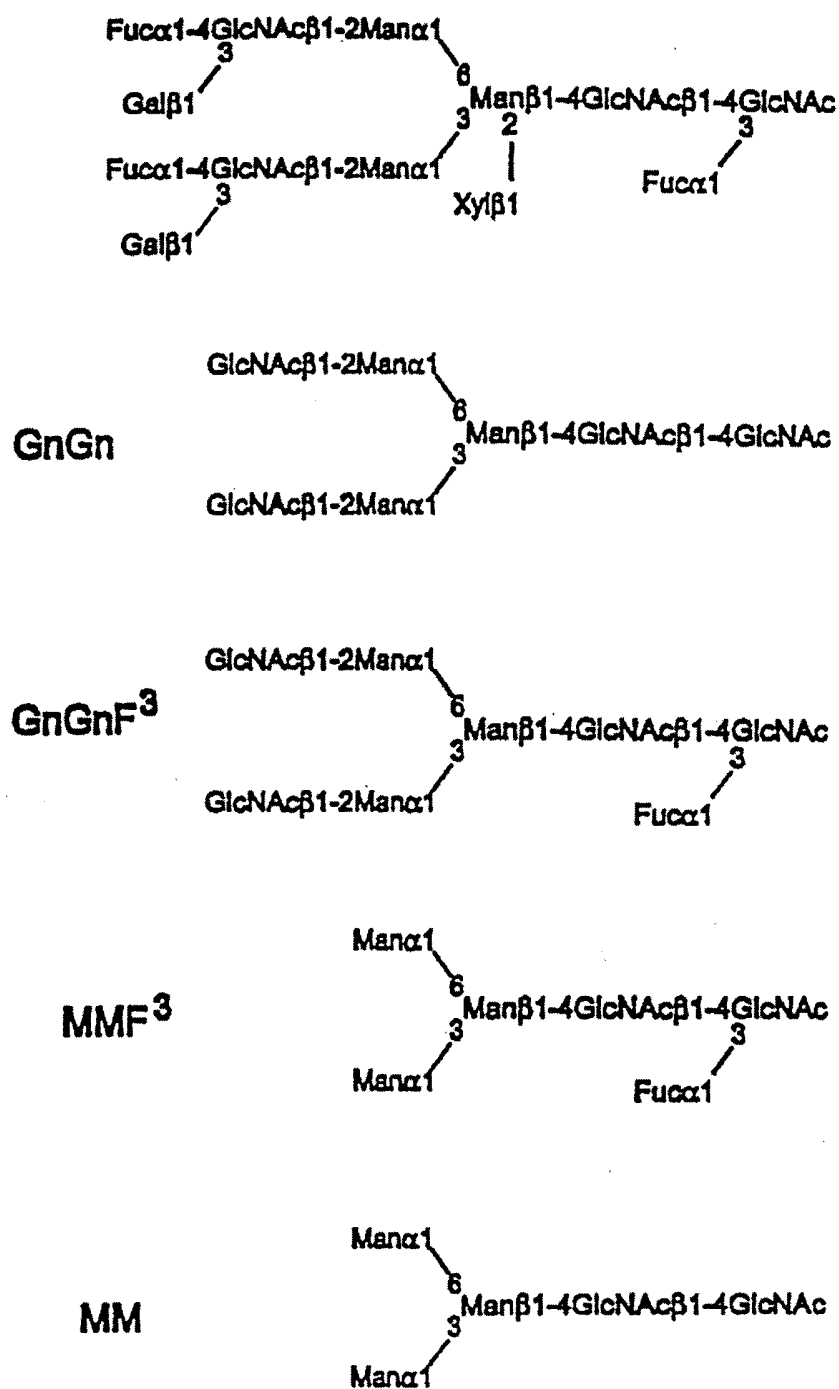
Transferáza	Typ	Číslo*	Konzervativní motiv
PucT-C3	fazol mungo		267-EALKHYKFSLA FENSNEEDYVTEKFFQ-SLVAGTVP
PucT-III	člověk	P21217	236-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-III	šimpanz	O19058	247-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-V	člověk	Q11128	249-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-V	šimpanz	P56433	249-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-VI	člověk	P51993	235-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-VI	šimpanz	P56434	235-ETLSRYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-III	kráva	Q11126	240-KQLSQYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALQAWAVP
PucT-?	č. křeček	O35886	237-GTLARYKFFYLA FENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
PucT-VII	člověk	Q11130	217-PTVAQYRFFYLS FENSQHRDYITEKWRNALVAGTVP
PucT-VII	myš	Q11131	264-PTIARYRFFYLA FENSQHRDYITEKWRNALAAGAVP
PucT-VII	<i>Schistosoma mansoni</i>	O76204	226-PTIARYRFFYLA FENSQHRDYITEKWRNALAAGAVP
PucT-IV	člověk	P22083	277-HTVARYKFFYLA FENSQHLDYITEKLWRNALAGAVP
PucT-IV	myš	Q11127	305-HTVARYKFFYLA FENSQHRDYITEKLWRNALAGAVP
PucT-IV	potkan	Q62994	305-HTVARYKFFYLA FENSQHRDYITEKLWRNALAGAVP
PucT-IV	kuře	Q98952	228-KTVSAKYKFFYLA FENSQHTDYITEKLWKNAFAASAVP
PucT-IX	myš	O88819	233-PTISTCKFFYLS FENSQHKDYITEKLYNAFL-AGSVP
FutA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	O76544	247-DVLKRYNFAI A FENS LCKDYITEKLWE-SLSVGTIP
hpPucT1	<i>Helicobacter pylori</i>	O32631	106-EFELSQYKFNLC FENS QGYGVTEKILD-AYFSHTIP
hpPucT2	<i>Helicobacter pylori</i>	O30511	227-EFELSQYKFNLC FENS QGYGVTEKIID-AYFSHTIP
JEFT-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q21362	303-MLD TDYHFYVTFENSICEDYVTEKLWKSGYQNTIIP

* přístupové číslo v databázi proteinových sekvencí SwissProt

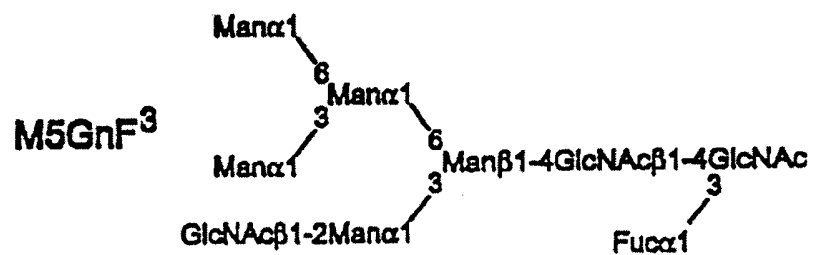
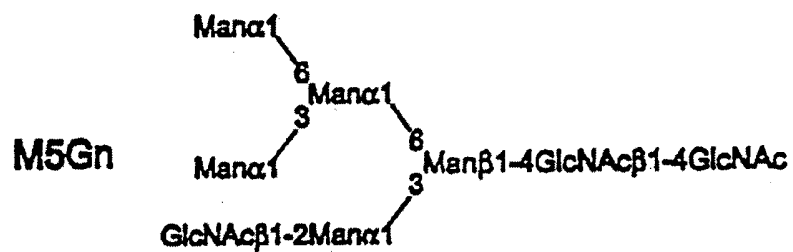
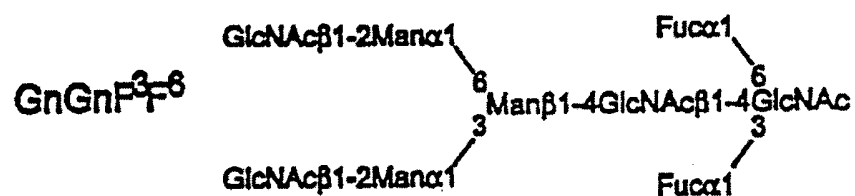
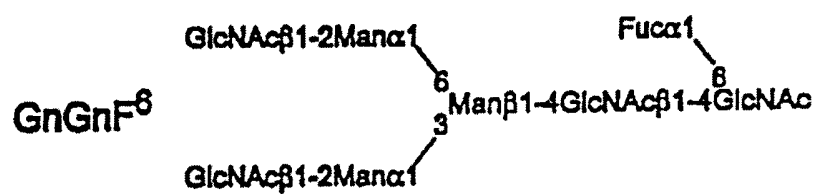
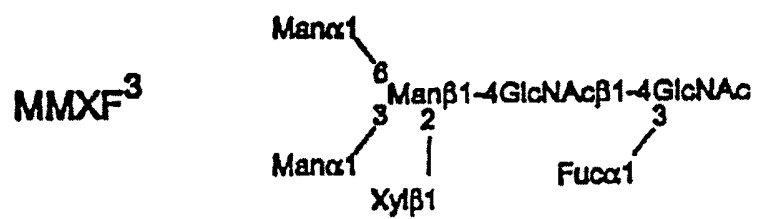
Obr. 8



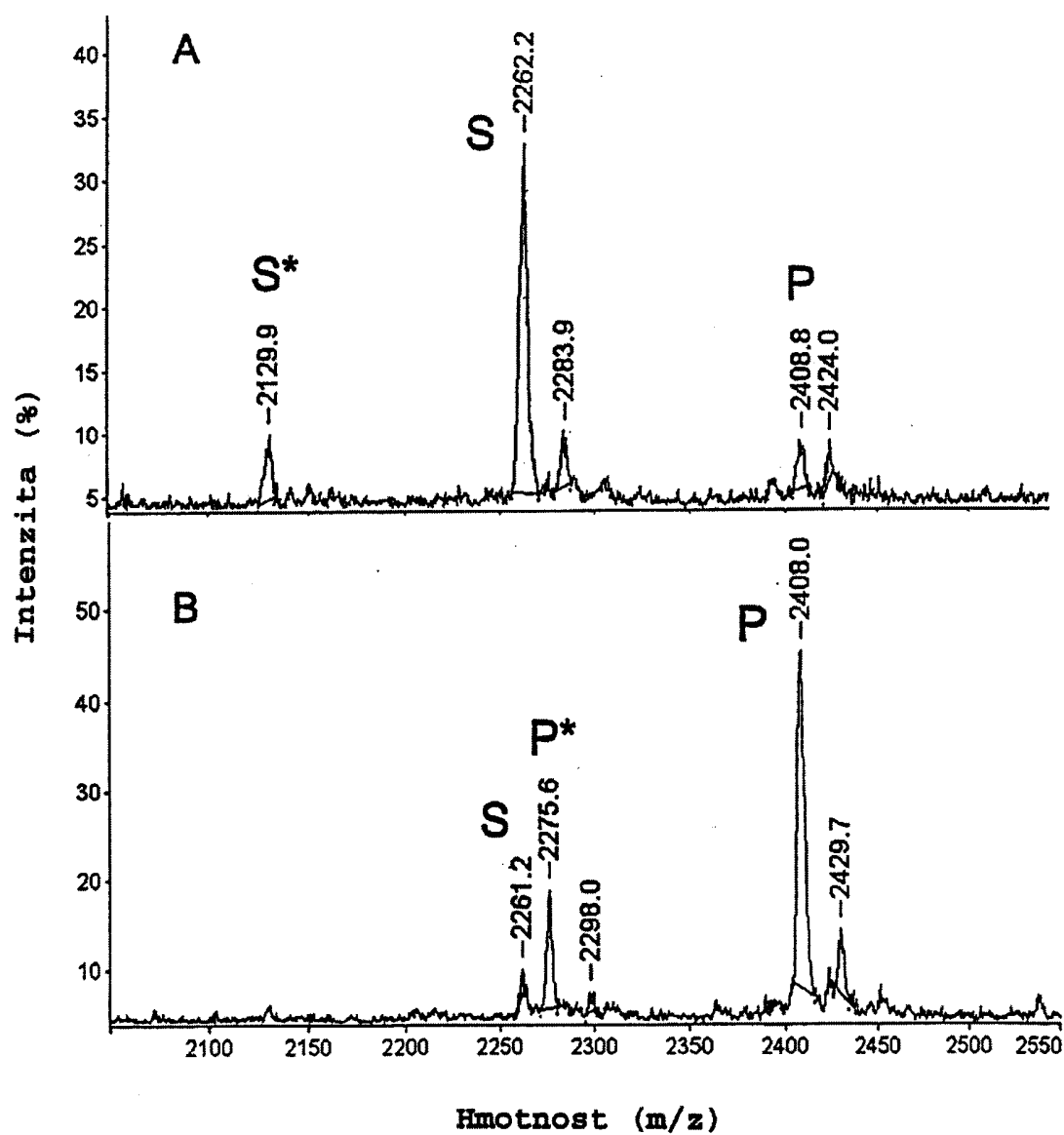
Obr. 9



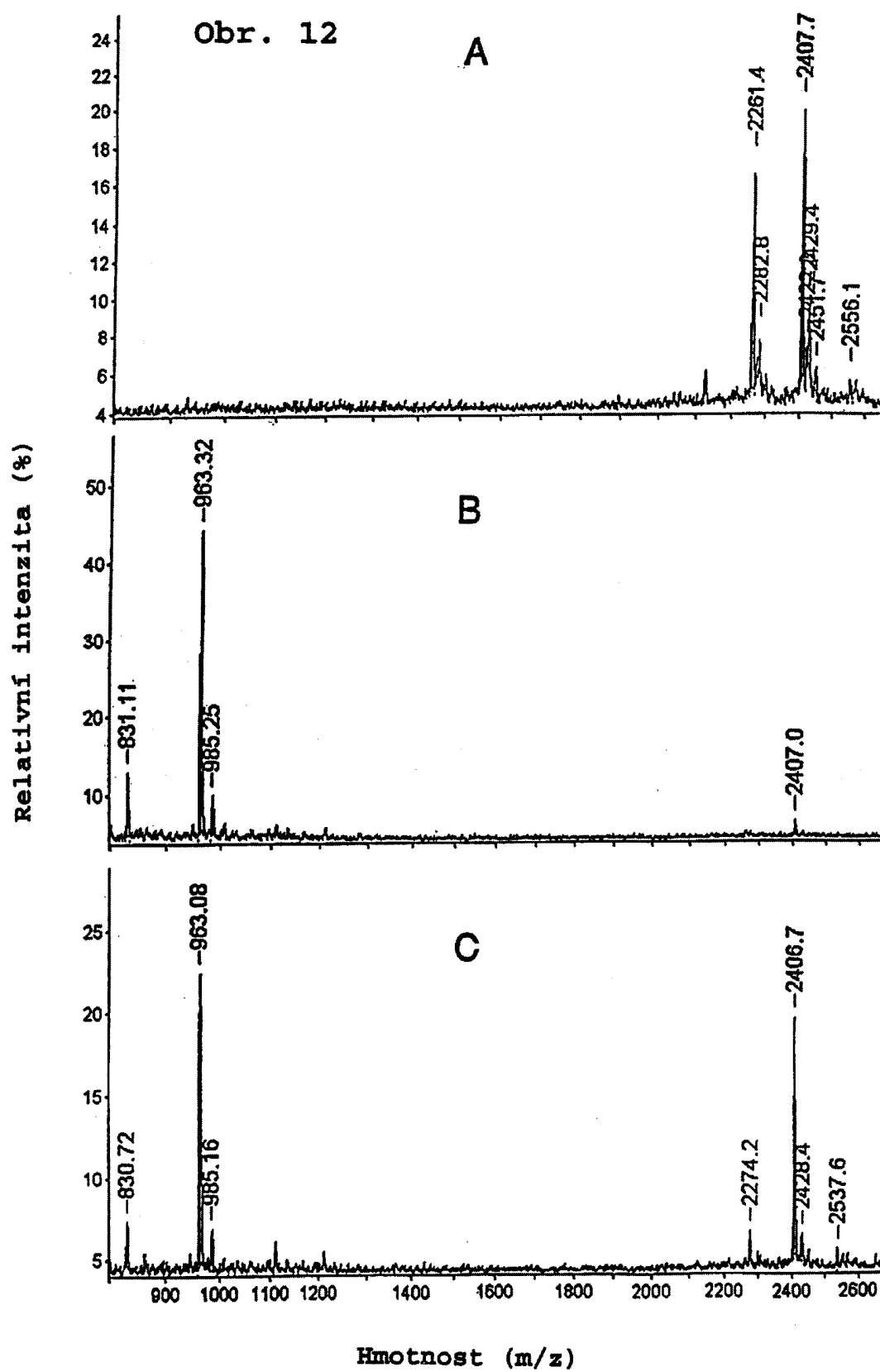
Obr. 10a

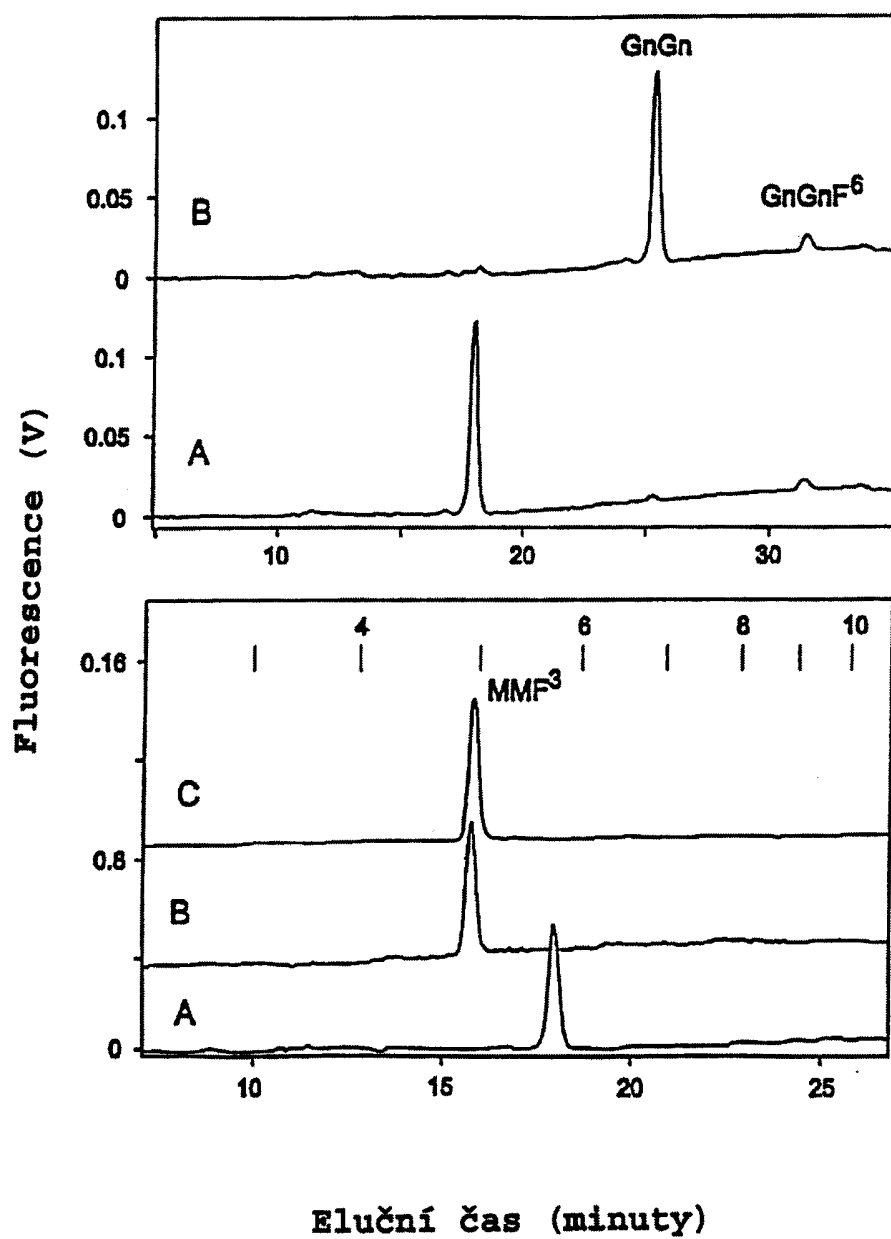


Obr. 10b



Obr. 11





Obr. 13

Konec dokumentu
