



HU000227482B1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **227 482**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 98 01122**(22) A bejelentés napja: **1996. 12. 20.**(40) A közzététel napja: **1998. 08. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértéktobben: **2011. 07. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/12** (2006.01)**A01K 670/27** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61K 48/00** (2006.01)**C07K 11/07** (2006.01)**C07K 147/15** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)**G01N 335/66** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)**C12N 15/62** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 19/00** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12N 5/10** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 96/20621

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9723614

(30) Elsőbbségi adatok:

08/577,788 1995. 12. 22. US**08/706,945** 1996. 09. 03. US

(73) Jogosult(ak):

AMGEN Inc., Thousand Oaks, Kalifornia (US)

(72) Feltaláló(k):

Boyle, William J., Moorpark, Kalifornia (US)**Lacey, David L., Thousand Oaks, Kalifornia (US)****Calzone, Frank J., Westlake Village, Kalifornia (US)****Chang, Ming-Shi, Newbury Park, Kalifornia (US)**

(74) Képvisező:

**S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest**

(54)

Osteoprotegerin

(57) Kivonat

A találmány tárgyát egy új, szekretált polipeptid, az oszteoprotegerin képezi, amely a tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád egyik tagja, és amely résztvesz a csontmetabolizmus szabályozásában. A polipeptideket fokozott reszorpcióval jellemezhető csontbetegségek, azaz például oszteoporózis kezelésére használják.

A jelen találmány tárgyát általában a csontmetabolizmusban szerepet játszó enzimek képezik. Pontosabban, a találmány tárgya egy új, osteoprotegerin nevű polipeptid, amely a tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád egyik tagja. A polipeptidet fokozott csontvesztéssel járó csontbetegségek kezelésére használják.

A polipeptid növekedési faktorok és citokinek szekretált faktorok, amelyek számos különböző változás jelzői a sejtek növekedésében, differenciálódásában és metabolizmusában, specifikusan kötődve diszkrét, sejtfelszíni receptorokhoz. Mint fehérjeosztálynak, a receptoroknak változik a szerkezete és jelátadási módja. Azzal lehet jellemezni őket, hogy rendelkeznek egy olyan extracelluláris doménnel, amely szerepet játszik a ligandumok megkötésében, valamint rendelkeznek egy olyan citoplazmatikus doménnel, amely átad egy megfelelő intracelluláris jelet. A receptor expressziós mintázatok végső soron meghatározzák, hogy melyik sejt reagál egy adott ligandumra, míg egy adott receptor struktúrája diktálja a ligandum megkötése által indukált celluláris választ. A receptorokról kimutatták, hogy az intracelluláris jeleket citoplazmatikus doménjeik segítségével adják tovább, a fehérje tirozinját aktiválva, vagy a fehérje szerin/treonin foszforilezésével [ilyen például a vérlémezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) vagy a transzformáló növekedési faktor- β -receptor-1 (TGF β R-1)], a G-fehérje aktiválásának serkentésével (azaz például a β -adrenerg receptor) és az asszociációk citoplazmatikus szignál transzdukáló fehérjékkel való befolyásolásával (azaz például TNFR-1 és Fas/APO) [Heldin: Cell 80, 213-223 (1995)].

A tumor nekrosis faktor receptor (TNFR) szupercsalád az I-es típusú transzmembrán fehérjéknek egy olyan csoportja, amelyek egy megőrződött, ciszteinben gazdag motívumot tartalmaznak, ami háromszor-hatszor ismétlődik az extracelluláris doménben [Smith és mtsai: Cell 76, 953-962 (1994)]. Ezek az ismétlődő csoportok alkotják együtt ezeknek a receptoroknak a ligandumkötő doménjeit [Chen és mtsai: Chemistry 270, 2874-2878 (1995)]. Ezeknek a receptoroknak a ligandumai szerkezetileg a TNF α -val homológ fehérjék rokonai [Goeddel és mtsai: Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 51, 597-609 (1986); Nagata és mtsai: Science 267, 1449-1456 (1995)]. A TNF α egymástól eltérő, de egymással szoros rokonságban levő re-

ceptorokhoz, a TNFR-1-hez és a TNFR-2-höz kötődik. A TNF α számos különböző biológiai választ hoz létre a receptorhordozó sejtekben, beleértve a szaporodást, differenciálódást, citotoxicitást és apoptózist [Beutler és mtsai: Ann. Rev. Biochem. 57, 505-518 (1988)].

A TNF α -ról az a vélemény alakult ki, hogy az akut és krónikus gyulladásos válaszok közvetítője [Beutler és mtsai: Ann. Rev. Biochem. 57, 505-508 (1988)]. A TNF α szisztémás beadása toxikus sokkot és nagy kiterjedésű szöveti nekrozist okoz. Ennek következtében a TNF α felelős számos különböző fertőző betegséghez (beleértve a szepszist is) kapcsolódó súlyos morbiditásért és mortalitásért. A FasL-ben {a TNFR-rel rokon Fas/APO receptor liganduma [Suda és mtsai: Cell 75, 1169-1178 (1993)]} levő mutációk az autoimmunitáshoz kötődnek [Fisher és mtsai: Cell 81, 935-946 (1995)], míg a FasL túltermelődése szerepet játszhat a gyógyszer által indukált hepatitiszben. Tehát a TNFR-rel rokon fehérjék ligandumai gyakran befolyásolják számos kóros állapot súlyos hatásait, ami azt sugallja, hogy azoknak az ágenseknek, amelyek semlegesítik ezeknek a ligandumoknak a hatásait, terápiás értékük lehet. Az oldható TNFR-1 receptorokat, és a TNF α -hoz kötődő ellenanyagokat megvizsgálták, hogy képesek-e semlegesíteni a szisztémás TNF α -t [Loetscher és mtsai: Cancer Cells 3(6), 221-226 (1991)]. A szekretált TNFR-1 mRNS természetes formáját nemrég klónozták, és termékének vizsgálták azt a tulajdonságát, hogy képes-e *in vitro* és *in vivo* neutralizálni a TNF α aktivitását [Kohno és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87, 8331-8335 (1990)]. Ennek a fehérjének az a tulajdonsága, hogy az oldható TNF receptorok úgy működnek, hogy megkötik és tisztítják a TNF-et, ezzel blokkolva a TNFR- hordozó sejtek citotoxikus tulajdonságait.

A találmány tárgya a TNFR szupercsalád új tagjainak azonosítása. Várható, hogy az új családtagok transzmembrán fehérjék lehetnek, illetve ezek oldható formái, amelyek extracelluláris doméneket tartalmaznak, és hiányzik belőlük a transzmembrán és citoplazmatikus domén. Azonosítottuk a TNFR szupercsaládnak egy új tagját, ami egy, a TNFR-2-höz közel álló szekretált fehérjét kódolja. A TNFR-1-gyel való analógia alapján a TNFR-2-vel rokon fehérje negatívan szabályozhatja ligandumának aktivitását, és így hasznos lehet bizonyos humán betegségek kezelésében.

Azonosítottuk a tumor nekrosis faktor receptor (TNFR) szupercsalád egy tagját, patkányembrió cDNS könyvtárból. Egy teljes hosszúságú cDNS klónt azono-

sítottunk és szekvenáltunk. A patkány cDNS-nek egy transzgenikus egérben való expressziója jelentős növekedést eredményez a csontok sűrűségében, főleg a hosszú csontokéban, leginkább a medencecsontban és a gerincben. A cDNS által kódolt polipeptid neve Osteoprotegerin (OPG), és szerepet játszik a csontfelhalmozódás elősegítésében.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

2. ábra: A teljes hosszúságú patkány OPG génnek, a TNFR szupercsalád egy új tagjának szerkezete és szekvenciája. B, C: A patkány OPG cDNS nukleinsav és fehérjeszekvenciája. A várt szignálpeptidet aláhúztuk, majd az N-kapcsolt glikozilezés potenciális pontjait vastagított, aláhúzott betűkkel jelezzük.

9. ábra: A humán OPG cDNS klónok struktúrája és szekvenciája. A,B: Egér cDNS és fehérjeszekvencia. C,D: Humán cDNS és fehérjeszekvencia. A megjósolt szignálpeptideket aláhúztuk, majd az N-kapcsolt glikozilezés potenciális pontjait vastagítással jelezzük. E,F: A patkány, egér és humán OPG aminosav szekvenciák egymáshoz illesztése és összehasonlítása.

11. ábra: A humán OPG háromdimenziós bemutatása. A humán OPG 25-163-as csoportjainak (széles vonal) együtt kristályosítva a humán TNF β -val (vékony vonal) megjósolt háromdimenziós szerkezete Molescript bemutatásának oldal-látványa. Az orientáció irányítására az OPG polipeptid gerinc mentén levő vastag nyílak az N-terminális és a C-terminális irányba mutatnak. Megmutatjuk az egyes ciszteincsoportok oldalláncának pozícióját a polipeptid gerincben, ezzel segítjük elő a külön ciszteinben gazdag domének bemutatását. A TNF β molekulát Banner és munkatársai (1993) leírása szerint illesztjük.

12. ábra: Az OPG ciszteinben gazdag doménjeinek struktúrája. A humán (felső sor, 136. számú számú szekvenciavázlat) és az egér (alsó sor) OPG aminosav szekvenciák illesztése, kiemelve az OPG megjósolt doménstruktúráját. A polipeptidet két félre oszthatjuk: az N-terminális (A) és a C-terminális (B) részre. A N-terminális részből megjósolható, hogy négy, ciszteinben gazdag domént tartalmaz (1-4-gyel jelölve). A megjósolt, láncon belüli diszulfid hidakat vastag vonalakkal jelezzük, "SS1", "SS2" vagy "SS3" jelzéssel. A 28-as tirozinról és a 75-ös hisztidinről (aláhúzva) azt gondoljuk, hogy ionos kölcsönhatásba lépnek egymással. Azokat az aminosavakat, amelyekről azt jósoljuk, hogy kölcsönhatásba lépnek egy OPG ligan-

dummal, a megfelelő csoport felett pontokkal jelezzük. Az OPG C-terminális felében levő ciszteinscsoportokat bekereteztük.

21. Az OPG hatása az oszteoklaszt differenciálódás terminális állapotára. huOPG[22-401]-Fc fúziós fehérjét adunk az oszteoklaszt képződési vizsgálatokhoz az oszteoklaszt érés intermedier állapotában (5-6. nap; OPG-CTL) vagy az oszteoklaszt érés terminális állapotában (7-15. nap; CTL-OPG). A TRAP aktivitást mennyiségileg meghatározzuk, és összehasonlítjuk az OPG távollétében (CTL-CTL), vagy az OPG jelenlétében (OPG-OPG) megfigyelt aktivitással.

22. ábra: Az interleukin-1 β interleukin-1 α és az OPG hatása a vér ionos kalciumtartalmára egerekben. Követjük a vér ionizált kalciumtartalmának szintjét csak interleukin-1 β , csak interleukin-1 α , interleukin-1 β plusz muOPG[22-401]-Fc, interleukin-1 α plusz muOPG [22-401]-Fc, és csak muOPG [22-401]-Fc injekciójása után. A kontroll egerek csak foszfáttal puffertelt sóoldat injekciókat kapnak. Az interleukin-1 β kísérleteket az A-ban mutatjuk be; az interleukin-1 α kísérletet a B-ben mutatjuk be.

23. ábra: Az OPG hatása koponyatető oszteoklasztokra kontroll és interleukin-1-gyel kezelt egerekben. Az egér koponyatető csontminták elemzésére szolgáló hisztológiai módszereket a 11B. példában ismertetjük. A nyilak a 2. napon kezelt egerekben jelenlevő oszteoklasztokat mutatják. A koponyatető minták olyan egerekből származnak, amelyek naponta négy PBS injekciót kaptak (A), naponta egy interleukin-1 és három PBS injekciót kaptak (B); naponta egy PBS és három OPG injekciót kaptak (C), naponta egy interleukin-1 és három OPG injekciót kaptak.

24. ábra: Normális egerek csontvelő üregeiben akkumulálódó csont radiográfiai elemzése. Az egereket 14 napig szubkután injekciózzuk sóoldattal (A) vagy muOPG [22-401]-Fc fúzióval (5 mg/kg/nap) (B), majd a csontsűrűséget a 11C. példában leírtak alapján határozzuk meg.

25. ábra: A csont-akkumuláció hisztomorfometriai elemzése normál egerek csontvelő üregében. Az injekciós kísérleteket és a csont-hisztológiai vizsgálatokat a 11C. példában leírtak alapján végezzük.

26. ábra: A csont-akkumuláció hisztomorfometriai elemzése normál egerek csontvelő üregében. Az injekciós kísérleteket és a csont-hisztológiai vizsgálatokat a 11C. példában leírtak alapján végezzük. A: sóoldat injekciójás; B: muOPG [22-401]-Fc fúzió injekciójása.

27. ábra: Petefészek kiirtáson átesett patkányoknak beadott OPG aktivitása. Ebben a kéthetes kísérletben a csökkent csontsűrűség trendjét blokkolni látszik az OPG vagy egyéb anti-reszorptív terápia. A petefészek kiirtás időpontjában valamint a kezelés 1. és 2. hetében DEXA méréseket végeztünk. Az eredményeket a kiindulási csontsűrűség százalékos változásában fejezzük ki (átlag $\pm$ SEM).

28. ábra: A combcsonti metaphysisben mért csontsűrűség, hisztomorfometriai módszerekkel mérve, alacsonyabbnak látszik a petefészek kiirtáson átesett (OVX) patkányokban mint a hamis operáción átesett állatokban (SHAM) a petefészek kiirtás után 17 nappal. Ezt a hatást blokkolja az OPG-Fc, az OPG-Fc-vel kezelt, petefészek kiirtáson átesett patkányokban (OVX+OPG) jelentősen nagyobb a csontsűrűség mint a csak hordozóval kezelt, petefészek kiirtáson átesett állatokban (OVX). (Átlag $\pm$ SEM).

A tumor nekrosis faktor receptor (TNFR) szupercsaládnak egy új tagját azonosították mint egy expresszált szekvenciárészt (EST), patkányembrió bél cDNS könyvtárból izolálva. A teljes hosszúságú patkány cDNS klónokat és a megfelelő egér valamint humán cDNS klónokat az 1. és 6. példákban meghatározott módon határozzuk meg. A patkány, egér és humán géneket a 2B-2C. ábrán (120. számú szekvenciavázlat), 9A-9B. ábrán (122. számú szekvenciavázlat) és a 9C-9D ábrán (125. számú szekvenciavázlat) mutatjuk be. Mindhárom szekvencia erős hasonlóságot mutat a TNFR család tagjainak extracelluláris tagjaival. Az izolált teljes hosszúságú cDNS klónok közül egyik sem kódol transzmembrán és citoplazmatikus doméneket, amiket elvárunk a membránhoz kötött receptoroktól, sugallva ezzel, hogy ezek a cDNS-ek inkább oldható, szekretált fehérjéket kódolnak mint sejtfelszíni receptorokat. A humán génnek az 1200-1353-as nukleotidokat tartalmazó részét, amit a 9D. ábrán mutatunk be, a Genbank adatbázisban helyeztük letétbe 17188769 számon, 1995. november 22-én.

A patkány és a humán mRNS szöveteloszlását a 2. példában leírtak alapján határozzuk meg. A patkányokban a mRNS expresszióját vesében, májban, méhlepényben és szívben határozzuk meg, a legnagyobb expressziót a vesében kapjuk. Emberekben az expressziót ugyanezekben a szövetekben lehetett kimutatni, amellett, hogy a nyirokmirigyben, csecsemőmirigyben, lépben és vakbélben is ki lehetett mutatni.

A patkány cDNS-t transzgenikus egerekben expresszáljuk (3. példa), a májspecifikus ApoE promotor expressziós rendszer alkalmazásával. Az expresszálok elemzése azt mutatja, hogy erősen megnőtt a csontsűrűség, főleg a hosszú csontokban (combcsontok), a gerinccsontokban és a lapos csontokban (vesemedence). A csont megfestett szekcióinak hisztológiai elemzése súlyos oszteopetróziist mutatott (lásd 4. példa) (lásd 4. példa), ami erős egyensúlyhiányt jelez a csontképződés és felszívódás között, és ez a csont valamint az ízületek erős akkumulálódásához vezet. A gerendázatos oszteoklasztok számának csökkenése az OPG-t expresszálo állatok csontjaiban azt mutatja, hogy a TNFR-hez kapcsolódó fehérje aktivitásának jelentős része megakadályozhatja a csontfelszívódást, amit az oszteoklasztok közvetítenek. A transzgenikus expresszálok aktivitásának fényében az alábbiakban ismertetett, TNFR-hez kapcsolódó fehérjéket OPG-knek nevezzük.

A patkány cDNS szekvencia felhasználásával izoláljuk az egér és humán cDNS klónokat (5. példa). Az egér OPG expresszióját 293 sejtekben és a humán OPG expresszióját *Escherichia coli*-ban a 7. és 8. példában ismertetjük. Az egér OPG-t Fc fúziós formában állítjuk elő, amit azután Protein A affinitáskromatográfiával tisztítunk. A 7. példában ismertetjük a teljes hosszúságú és csonkított humán és egér OPG polipeptidek expresszióját CHO és 293 sejtekben, akár a humán IgG1 Fc régiójához való fúziós polipeptidek, akár nem-fúzionált polipeptidek formájában. A teljes hosszúságú és csonkított humán és egér OPG-k *Escherichia coli*-ban való expresszióját, akár Fc fúziós polipeptidek vagy nem-fúzionált polipeptidek formájában, a 8. példában ismertetjük. A rekombináns módszerrel előállított emlős és bakteriális OPG-k tisztítását a 10. példában ismertetjük.

Az OPG biológiai aktivitását *in vitro* oszteoklaszt érési vizsgálat felhasználásával, valamint az interleukin-1 (IL-1) által indukált hiperkalcémia *in vivo* modelljével és a csontsűrűség injekciós vizsgálatával határozzuk meg, normális egerekben (lásd 11. példa). Az alábbi, CHO és 293 sejtekben előállított OPG rekombináns fehérjék mutatnak aktivitást *Escherichia coli* oszteoklaszt érési vizsgálatokban: muOPG [22-185]-Fc, muOPG [22-194]-Fc, muOPG [22-401]-Fc, muOPG [22-401], huOPG [22-201]-Fc, huOPG [22-401]-Fc. A CHO sejtekben előállított muOPG [22-180]-Fc és az *Escherichia coli*-ban előállított huOPG met [32-401] nem mutatott aktivitást az *in vitro* vizsgálatban.

A különböző forrásokból származó OPG-t dimer, és bizonyos mértékig magasabb multimer formájában állítjuk elő. A transzgenikus egerekben előállított patkány OPG [22-401], a rekombináns polipeptid formájában CHO sejtekben előállított muOPG [22-401] és huOPG [22-401], valamint egy citotoxikus T-sejtvonalban természetesen előforduló termék formájában expresszálandó OPG főleg dimer illetve trimer, ha nem-redukáló SDS géleken elemezzük őket (lásd 9. példa). A 186-401-es régióban delécióval rendelkező csonkított polipeptidek (például az OPG [1-185] és OPG [1-194]) főleg monomerek, azt sugallva, hogy a 186-401-es régió részt vesz az OPG polipeptidek ön-asszociációjában. Azonban az *Escherichia coli*-ban előállított huOPG met [32-401] főleg monomer.

Az OPG fontos lehet a csontfelszívódás szabályozásában. Úgy tűnik, hogy a fehérje a TNF család oldható receptoraként hat, és megakadályozhatja az oszteolitikus bioszintézis útban résztvevő receptor-ligandum kölcsönhatást. A szabályozás egy szempontja az oszteoklasztok számának csökkentése lehet.

A találmány tárgyát képezi az OPG, a TNF receptorcsalád egy új tagja, amelynek az aktivitása kapcsolatban áll a csontmetabolizmussal, pontosabban olyan aktivitással rendelkezik, amely gátolja a csont felszívódását, és ezzel fokozza a csont sűrűségét. Az OPG szakkifejezés egy olyan polipeptidre vonatkozik, amely az egér, patkány vagy humán OPG vagy ezek egy származéka szekvenciájával rendelkezik, és az OPG biológiai aktivitásai közül legalább eggyel rendelkezik. A patkány, egér és humán OPG aminosav szekvenciáit a 2B-2C. (121. számú szekvenciavázlat), 9A-9B. (123. számú szekvenciavázlat) és 9C-9D. (125. számú szekvenciavázlat) ábrákon mutatjuk be. Az OPG származék szakkifejezés jelentése egy olyan polipeptid, amely egy vagy több aminosav addícióval, delécióval, inszercióval vagy helyettesítéssel rendelkezik, oly módon, hogy a keletkező polipeptid az OPG-nek legalább egy biológiai aktivitásával rendelkezik. Az OPG biológiai aktivitásai közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a csontmetabolizmusban szerepet játszó aktivitások. A polipeptidek előnyösen nem tartalmazzák a 21 aminosavból álló vezérszekvenciát.

A találmány szerinti OPG polipeptidek közé tartozik a patkány [1-401], patkány [22-180], patkány [22-401], patkány [22-401]-Fc fúzió, patkány [1-180]-Fc fúzió, egér [1-401], egér [1-180], egér [22-401], humán [1-401], egér [22-180], humán [22-401], humán [22-180], humán [1-180], humán [22-180]-Fc fúzió és a humán met-

32-401. Az aminosavak számozása megfelel a 121. számú szekvenciavázlaton (patkány), a 123. számú szekvenciavázlaton (egér) és a 125. számú szekvenciavázlaton (humán) látható számozásnak. A találmány tárgyát képezik továbbá azok a polipeptid származékok, amelyekben az OPG 180-401-es aminosav csoportjai részben vagy teljes egészükben le vannak vágva a C-terminálisról; egy vagy több aminosav változást tartalmaznak az OPG 180-401-es csoportjaiban; az OPG egy ciszteinben gazdag része részben vagy teljes egészében ki van vágva, különösen a disztális (C-terminális) ciszteinben gazdag domén; és egy vagy több aminosav változást tartalmaznak a ciszteinben gazdag doménben, különösen a disztális (C-terminális) ciszteinben gazdag doménben. Az egyik megvalósítási mód szerint az OPG C-terminálisáról az 1-216-os aminosav csoportig terjedő rész le van hasítva. Egy másik megvalósítási mód szerint az OPG érett N-terminálisáról (ahol az érett N-terminális a 22-es csoportnál található) 1-10 aminosav le van hasítva, és adott esetben a C-terminálisról 1-216 aminosav van lehasítva.

A találmány tárgyát képezik továbbá az alábbi OPG polipeptidek: humán [22-180]-Fc fúzió, humán [22-201]-fúzió, humán [22-401]-Fc fúzió, egér [22-185]-fúzió, egér [22-194]-Fc fúzió. Ezeket a polipeptideket emlős gazdasejtekben állítjuk elő, azaz például CHO vagy 293 sejtekben. A találmány tárgyát képezik továbbá az alábbi, prokarióta sejtekben expresszálandó OPG polipeptidek is: humán met [22-401], Fc-humán met [22-401] fúzió (az Fc régió a 8. példában ismertetett teljes hosszúságú, OPG-t kódoló szekvencia N-terminálisához van fuzionáltatva), humán met [22-401]-Fc fúzió (az Fc régió a teljes hosszúságú OPG szekvenciához van fuzionáltatva), Fc-egér met [22-401] fúzió, egér met [22-401]-Fc fúzió, humán met [27-401], humán met [22-185], humán met [22-189], humán met [22-194], humán met [22-194] (P25A), humán met [22-194] (P26A), humán met [27-185], humán met [27-189], humán met [27-194], humán met-arg-gly-ser-(his)₆ [22-401], humán met-lys [22-401], humán met-(lys)₃-[22-401], humán met [22-401]-Fc (P25A), humán met [22-401] (P25A), humán met [22-401] (P26), humán met [22-401] (P26D), egér met [22-401], egér met [27-401], egér met [32-401], egér met [27-180], egér met [22-189], egér met [22-194], egér met [27-189], egér met [27-194], egér met-lys[22-401], egér HEK [22-401] (A45T), egér met-lys-(his)₇[22-401], egér met-lys [22-401]-(his)₇ és egér met [27-401] (P33E, G36S, A45P). Az nyilvánvaló, hogy a fenti, prokarióta gazdasejtekben előállított OPG polipeptidek N-terminális metionin csoportot tartalmaznak, akkor is,

ha ezt a csoportot nem jelöljük. A specifikus példákban az OPG-Fc fúziót úgy állítjuk elő, hogy a humán IgG1-γ1 227 aminosavból álló régióját használjuk, amelynek a szekvenciáját Ellison és munkatársai közölték [Ellison és mtsai: *Nucleic Acids Research* **10**, 4071-4079 (1982)]. Azonban a humán IgG Fc régiójának variánsai is használhatók.

A C-terminális OPG csonkítások humán IgG1 Fc régiójához való fúziójának biológiai aktivitását vizsgálva találunk egy körülbelül 146 aminosavból álló OPG részt, amelyre feltétlenül szükség van az aktivitáshoz. Ez a régió a 22-185-ös aminosavakat tartalmazza, előnyösen a 9C-9D. ábrán (125. számú szekvenciavázlat) láthatókat, valamint tartalmaz négy, ciszteinben gazdag domént is, amelyek a TNFR extracelluláris doménjeinek ciszteinben gazdag doménjeire jellemzőek.

Az OPG és a TNF receptorcsalád tagjainak extracelluláris ligandumkötő doménjei közötti homológia felhasználásával előállítottuk az OPG-nek egy háromdimenziós modelljét, a TNFR-I extracelluláris doménje ismert kristályszerkezete alapján (lásd 6. példa). Ezt a modellt használjuk az OPG-n belül azoknak a csoportoknak az azonosítására, amelyek fontosak lehetnek a biológiai aktivitás szempontjából. Azonosítottuk azokat a csoportokat, amelyek részt vesznek a négy ciszteinben gazdag domén szerkezetének fenntartásában. Az alábbi diszulfid kötések azonosítottuk a modellben: 1-es domén: cys41-től cys54-ig, cys44-től cys62-ig, tyr23-től his66-ig, ez működhet úgy, hogy stabilizálja ennek a doménnek a szerkezetét; 2-es domén: cys65-től cys80-ig, cys83-től cys98-ig, cys87-től cys105-ig; 3-as domén: cys107-től cys118-ig, cys124-től cys142-ig; 4-es domén: cys145-től cys165-ig, cys166-től cys185-ig. Azonosítottunk olyan csoportokat is, amelyek a TNFβ szoros közelségében vannak, amint az a 11. és 12A-12B. ábrákon láthatók. Ebben a modellben azt feltételezzük, hogy az OPG kötődik a megfelelő ligandumhoz; a TNFβ-t használtuk modell ligandumként az OPG és a ligandumai közötti kölcsönhatás serkentésére. Ennek a modellnek az alapján a ligandum megkötésében az alábbi OPG csoportok lehetnek fontosak; glu34, lys43, pro66-től gln91-ig (pontosabban a pro66, his68, tyr69, tyr70, thr71, asp71, asp72, ser73, his76, ser77, asp78, glu79, leu81, tyr82, pro85, val86, lys88, glu90 és gln91), glu153 és ser155.

Ezeknek az aminosavaknak a megváltoztatása, akár egyenként akár kombinációban, megváltoztathatja az OPG aktivitását. Például specifikus ciszteincsoportok megváltoztatása megváltoztathatja az egyes ciszteinben gazdag domének szerkezetét,

míg a ligandum megkötésében fontos szerepet játszó csoportok megváltoztatása megváltoztathatja az OPG és a ligandum közötti fizikai kölcsönhatásokat. A szerkezeti modellek segíthetnek azoknak az analógoknak az azonosításában, amelyeknek jobbak a tulajdonságai, azaz fokozott biológiai aktivitással, nagyobb stabilitással rendelkeznek, vagy könnyebben formulázhatók.

Az OPG polipeptidek módosítása szintén a találmány tárgyát képezi, és ide tartoznak a poszt-transzlációs módosítások (azaz például az N-kapcsolt vagy O-kapcsolt szénhidrát láncok, az N-terminális és C-terminális végek processzálása), kémiai egységek kapcsolása az aminosav gerinchez, az N-kapcsolt vagy O-kapcsolt szénhidrát láncok kémiai módosítása, valamint egy N-terminális metionin csoport hozzáadása, ami a prokarióta gazdasejtben való expresszió következménye. A polipeptidek emellett módosíthatók egy kimutatható jelöléssel is, azaz például egy enzimátikus, fluoreszcens, izotipusos vagy affinitás jelöléssel, hogy ezzel lehetővé váljon a fehérje kimutatása és izolálása.

Az OPG további módosításai közé tartoznak azok a kiméra fehérjék, amelyekben az OPG egy heterológ aminosav szekvenciához van fuzionáltatva. A heterológ szekvencia lehet bármely olyan szekvencia, amely lehetővé teszi, hogy a keletkező fúziós fehérje megtartsa OPG aktivitását. A heterológ szekvenciák közé tartoznak például az immunglobulin fúziók is, azaz például az Fc fúziók, amik segíthetnek a fehérje tisztításában. Előnyben részesítünk egy olyan heterológ szekvenciát, amely elősegíti az OPG monomerek asszociálódását dimerekké, trimerekké és egyéb, magasabb multimer formákká.

A találmány szerinti polipeptideket az OPG-t expresszáló szövetekben, sejtvonalakban és transzformált gazdasejtekben jelenlevő egyéb polipeptidek mellől izoláljuk és tisztítjuk, vagy pedig a szekretált fehérjét tartalmazó sejtenyészetek komponensei mellől tisztítjuk. Az egyik megvalósítási mód szerint a polipeptid mentes minden, egyéb humán fehérjékkel való asszociációtól, azaz például egy bakteriális gazdasejt expressziós terméke.

A találmány tárgyát képezik továbbá az OPG kémiaiilag módosított származékai, amelyek további előnyökkel szolgálhatnak, azaz például a fehérje fokozott stabilitásával és keringési idejével, vagy pedig csökkent immunitásával (lásd például a 4,179,337-es számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést). A származékképzéshez a kémiai egységeket választhatjuk vízoldható polimerek közül,

azaz például lehet polietilén-glikol, etilén-glikol, etilén-glikol/propilén-glikol kopolimer, karboximetilcellulóz, dextrans, polivinil-alkohol és hasonlóak. A polipeptideket a molekulán belül véletlenszerű pozíciókban, vagy előre meghatározott pozíciókban módosíthatjuk, és tartalmazhatnak egy, kettő, három vagy több kapcsolt kémiai egységet.

A polimernek bármennyi lehet a molekulásúlya, és lehet egyenes vagy elágazó láncú. A polietilén-glikol esetében az előnyben részesített molekulásúly körülbelül 1 kDa és körülbelül 100 kDa között van (a "körülbelül" kifejezés azt mutatja, hogy a polietilén-glikol készítése során néhány molekula molekulásúlya lehet nagyobb, lehet kisebb mint a deklarált molekulásúly), a kezelés és gyártás egyszerűsítése céljából. Egyéb molekulásúlyú molekulák is használhatók, a kívánt terápiás profiltól függően (azaz például a szabályozott felszabadulás időtartamától, a biológiai aktivitásra gyakorolt hatástól, ha van ilyen, a kezelés egyszerűségétől, az antigenitás mértékétől, vagy annak hiányától, valamint a polietilén-glikol egyéb ismert, egy terápiás fehérjére, vagy annak analógjára gyakorolt hatásától függően).

A polietilén-glikol molekulákat (vagy egyéb kémiai egységeket) úgy lehet hozzákapcsolni a fehérjéhez, hogy figyelembe vesszük a fehérje funkcionális vagy antigén doménjeire gyakorolt hatását. A szakterületen jártas szakember számára számos kapcsolási módszer ismert [EP 0 401 384, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk; Malik és mtsai: *Exp. Hematol.* 20, 1028-1035 (1992) (amely publikációban a GM-CSF pegilezését ismertetik trezil-klorid alkalmazásával)]. A polietilén-glikol például kovalens kötással kapcsolódhat egy aminosavon, illetve annak reakcióképes csoportján, azaz például egy szabad amino- vagy karboxi-csoporton keresztül. Azokat tekintjük reakcióképes csoportoknak, amelyekhez hozzákapcsolhatunk egy aktivált polietilén-glikol molekulát. A szabad aminosav csoporttal rendelkező aminosavak közé tartozik például a lizincsoport, valamint az N-terminális aminosav csoportok; a szabad karboxicsoporttal rendelkező aminosavak közé tartozik például a glutaminsav valamint a C-terminális aminosav csoportok. A szulfhidril csoportok is használhatók reakcióképes csoportként a polietilén-glikol molekulák kapcsolása során. Terápiás célokra egy aminosavnál való kapcsolás lehet előnyös, azaz például az N-terminálison vagy egy lizincsoporton.

Szükség lehet például arra, hogy a fehérjét az N-terminálisán módosítsuk. A jelen találmány szerinti összetételek illusztrálásának céljára választhatunk számos különböző polietilén-glikol molekula közül (molekulásúly, elágazás, stb. alapján), a reak-

cióelegyben levő polietilén-glikol molekula és a fehérje (vagy peptid) egymáshoz viszonyított aránya alapján, valamint a kiválasztott, az N-terminálisán pegilezett fehérje előállítása alapján. Az N-terminálisán pegilezett készítmény előállítására használt eljárás (azaz például ennek az egységnek szükség esetén egyéb monopegilezett molekuláktól való elválasztása) lehet az N-terminálisán monopegilezett anyag tisztítása a pegilezett fehérjemolekulák populációjából). A szelektív N-terminális kémiai módosítást végezhetjük redukzív alkilezéssel, ami az egy adott fehérjében a származékképzés céljára hozzáférhető különböző típusú primer aminos csoportok (a lizin az N-terminálishoz viszonyítva) különböző reakcióképességét aknázza ki. A megfelelő reakciókörülmények között a fehérje lényegében szelektív származékának előállítása érhető el az N-terminálison, egy karbonilcsoportot tartalmazó polimer alkalmazásával.

Az alábbi példákat a találmány illusztrálása, jobb megértése céljából adjuk meg, nem tekinthetők a találmány oltalmi köre korlátozásának.

1. Példa

A patkány OPG cDNS azonosítása és izolálása

A cDNS klónozásának és elemzésének módszereit megtalálhatjuk a szakirodalomban [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. A polimeráz láncreakciókat (PCR) egy Perkin-Elmer 9600 típusú berendezésben hajtjuk végre, PCR reakcióelegy (Boehringer Mannheim) alkalmazásával, a gyártó által specifikált primer koncentrációkat használva. Általában 25-50 µl-es reakcióelegyeket denaturálunk 94 °C-on, majd 20-40 ciklust végeztünk 94 °C-on, 5 másodpercig, 50-60 °C-on 5 másodpercig és 72 °C-on 3-5 percig. A reakcióelegyeket 3-5 percig 72 °C-on tartjuk. A reakcióelegyeket azután gélelektroforézissel elemezzük, a szakirodalomban található leírás szerint [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Egy cDNS könyvtárat készítünk embrionális d20 bélből izolált mRNS felhasználásával EST elemzés céljára [Adams és mtsai: Science 252, 1651-1656 (1991)]. A patkány embriókat felboncoljuk, majd a teljes, fejlődő vékony- és vastagbéllet eltávolítjuk, majd PBS-sel mossuk. Az összes sejt-RNS-t savas guanidinium-tiocianát-fenol-kloroform extrakcióval tisztítjuk [Chomczynski és Sacchi: Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)]. A poli(A⁺) mRNS frakciót az össz-RNS készítményből állítjuk elő Dynabeds Oligo (dT)25 (Dynal Corp)-ra való adszorbeálással és

eluálással, a gyártó által ajánlott eljárásokat követve. Egy random módon indított cDNS könyvtárat készítünk a Superscript Plasmid System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) alkalmazásával. A belső NotI hasítási helyet tartalmazó random cDNS primert használjuk az első szál szintézisének iniciálására, szekvenciája az alábbi:

1. számú szekvencia:

5'-AAAGGAAGGAAAAAAGCGGCCGCTACANNNNNNNNT-3'

NotI

Az első szál szintéziséhez három különböző reakciót végzünk, amelyek 2,5 µg poli(A) RNS-t és 120 ng, 360 ng vagy 1080 ng random primert tartalmaznak. A második szál szintézise után a reakciótermékeket külön-külön extraháljuk fenol:kloroform:izoamil-alkohol 25:24:1 arányú elegyével, majd etanollal kicsapjuk. A három reakcióban kapott kétszálú (ds) cDNS termékeket egyesítjük, majd az alábbi oligonukleotid adapterrel ligáljuk:

5'-TCGACCCACGCGTCCG-3' (2. számú szekvencia)

3'-GGGTGCGCAGGCp-5' (3. számú szekvencia).

Ligálás után a cDNS-t teljesen megemésztjük NotI-gyel, fenol:kloroform:izoamil-alkohol 25:24:1 arányú elegyével extraháljuk, majd etanollal kicsapjuk. Az újra szuszpendált cDNS-t méret alapján frakcionáljuk gélszűrővel, előre elkészített oszlopokon (Superscript Plasmid System, Gibco BRL Gaithersburg, MD), a gyártó ajánlásainak megfelelően. A legnagyobb cDNS termékeket tartalmazó frakciókat egyesítjük, etanollal kicsapjuk, majd irányítottan ligáljuk NotI és SalI enzimekkel emésztett pMOB vektor DNS-be [Strathman és mtsai (1991)]. A ligált cDNS-t kompetens ElectroMax DH10B *Escherichia coli*-ba juttatjuk be (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), elektroporációval. Az automata szekvencia-elemzéshez körülbelül 10000 transzformánszt szélesztünk 20x20 cm-es agarlemezekre, amelyek ampicillinnel kiegészített LB táptalajt tartalmaznak. A kinövő telepeket izoláljuk, majd 96 lukas mikrotiter lemezeken rendezzük el, amelyek 200 µl L-táptalajt tartalmaznak, 7,5% glicerinnel és 50 µg/ml ampicillinnel kiegészítve. A tenyészeteket éjszakán át szaporítjuk, majd a mikrotiter lemezokről másolatokat készítünk egy steril 96 tűs replikázó szerszámmal, majd mindkét csoportot -80 °C-on tartjuk a további elemzésekig. A teljes hosszúságú cDNS klónozáshoz körülbelül egymillió transzformánszt szélesztünk 96 lukas, bakteriális ampicillin lemezre, amelyek egyenként körülbelül 10000 klónt tartalmaznak. Az egyes poolokból származó plazmid DNS-t

külön izoláljuk Quiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen Corp., Németország) alkalmazásával, majd a PCR elemzésekhez 96-lukas mikrotiter lemezekre rendezzük el őket.

A véletlenszerű patkánymagzat-bél cDNS klónok szekvenálásához a glicerines mintákat megolvasztjuk, majd kis alikvot részeket 1:25 arányban meghígítunk desztillált vízben. Körülbelül 3,0 µl hígított bakteriális tenyészetet adunk a PCR reakcióelegyhez (Boehringer Mannheim), amely az alábbi nukleotidokat tartalmazza:

5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3' (4. számú szekvencia)

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (5. számú szekvencia)

A reakcióelegyeket egy PCR berendezésben (Perkin-Elmer 9600) inkubáljuk, az alábbi ciklust alkalmazva: 94 °C két perc; 30 ciklus 94 °C 5 másodperc, 50 °C 5 másodperc és 72 °C 3 perc; 72 °C 4 perc. A PCR berendezésben való inkubálás után a reakcióelegyeket 2,0 ml vízzel hígítjuk. Az amplifikált DNS fragmenseket tovább tisztítjuk, Centricon oszlopok (Princeton Separations) felhasználásával, a gyártó által ajánlott eljárásokat alkalmazva. A PCR reakciótermékeket Applied Biosystems 373A automata DNS szekvenátorral szekvenáljuk, T3 primert (353-23-as oligonukleotid: 5'-CAATTAACCCTCACTAAAGG-3'), (6. számú szekvenciavázlat) és Taq festék-terminátor reakciókat (Applied Biosystems) alkalmazva, a gyártó által ajánlott eljárásokat alkalmazva.

A kapott 5' nukleotid szekvenciákat véletlenszerűen kiválasztott és transzlációba vitt cDNS klónokból kapjuk, majd összehasonlítjuk az ismert fehérjeszekvenciák létező adatbázisaival, a FASTA programnak egy módosított verzióját alkalmazva [Pearson és mtsai: *Methods in Enzymology* **183** (1990)]. A transzlációba vitt szekvenciákban vizsgáljuk egy ismert, specifikus, ciszteinben gazdag motívum jelenlétét, amely megtalálható a tumor nekrosis faktor receptor (TNFR) szupercsalád összes ismert tagjában [Smith és mtsai: *Cell* **76**, 959-962 (1994)], Gribskov és munkatársainak szekvencia-profil módszerét alkalmazva [Gribskov és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 4355-4359 (1987)], Luethy és munkatársai által módosítva [Luethy és mtsai: *Protein Science* **3**, 139-146 (1994)].

A FASTA és Profil keresés adatait felhasználva egy EST, FRI-1 (patkánymagzat bél-1) volt azonosítható, mint a TNFR szupercsalád egy új tagja. Az FRI-1 egy körülbelül 600 bázispár méretű inszertet tartalmaz, benne egy körülbelül 150 aminosavból álló LORF-fal. Az adatbázissal összehasonlítva a legjobb közelítést a humán II-es típusú TNFR-rel (TNFR-2) kapjuk. Az összehasonlított régió körülbelül

43%-os homológiát mutat a TNFR-2 és az FRI-1 között, a LORF-nak ebben a 150 aminosavból álló régiójában. A TNFR szupercsalád első és második ciszteinben gazdag ismétlődéseinek profil-elemzése alapján egy körülbelül 8-as Z értéket kapunk, jelezve, hogy az FRI-1 gén valószínűleg a család egy új tagját kódolja. Az FRI-1 termék szerkezetének levezetéséhez átvizsgáljuk a patkánymagzat-bél cDNS könyvtárat, teljes hosszúságú klónokat keresve benne. Az eredeti FRI-1 szekvenciából az alábbi oligonukleotidok származtak:

7. számú szekvenciavázlat

5'-GCATTATGACCCAGAAACCGGAC-3'

8. számú szekvenciavázlat

5'-AGGTAGCGCCCTTCCTCACATTC-3'

Ezeket a primereket használjuk a PCR reakciókban 96 plazmid pool átvizsgálására, aholis mindegyik pool 10000 független cDNS klónból származó plazmid DNS-t tartalmaz. Körülbelül 1 µg plazmid pool DNS-t amplifikálunk egy PCR reakcióelegyen (Boehringer Mannheim), egy Perkin-Elmer 96 lukas PCR berendezést alkalmazva, az alábbi ciklusokkal: 2 perc 94 °C, 1 ciklus; 15 másodperc 94 °C, majd 45 másodperc 65 °C-on, 30 ciklus; 7 perc 65 °C-on, 1 ciklus. A PCR reakciótermékeket gélelektroforézissel elemezzük. A 96 plazmid DNS poolból 13 adott amplifikált DNS termékeket, a várt relatív molekulasúllyal.

Az egyik pozitív poolból származó DNS-t használjuk kompetens ElectroMAX DH10B *Escherichia coli* (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) transzformálására, az előzőekben ismertetett módon. Körülbelül 40000 transzformánst szélesztünk steril nitrocellulóz szűrőlapokra (BA-85, Schleicher és Schüll), majd telephibridizálással vizsgáljuk át őket, az előzőekben kapott PCR termék ³²P-dCTP-jelzett verzióját használva erre a célra. A szűrőlapokat előhibridizáljuk 5XSSC, 50% ionmentesített formamid, 5X Denhardt oldat, 0,5% SDS és 100 µg/ml denaturált lazacsperma DNS összetételű oldatban, 2-4 óra hosszat, 42 °C-on. A szűrőlapokat azután 5X SSC, 50% ionmentesített formamid, 2X Denhardt oldat, 0,1% SDS, 100 µg/ml denaturált lazacsperma DNS és körülbelül 5 ng/ml jelzett próba összetételű oldatban hibridizáljuk, körülbelül 18 óra hosszat 42 °C-on. A szűrőlapokat azután 2X SSC-vel mossuk 10 percig szobahőmérsékleten, 1X SSC-vel 10 percig 55 °C-on, majd végül 0,5X SSC-vel 10-15 percig 55 °C-on. A hibridizálódó klónokat autoradiográfiával

mutatjuk ki, majd a másodlagos szűrővizsgálathoz nitrocellulóz szűrőlapra visszük át. A második szűrővizsgálat során izoláltunk egy plazmid klónt (pB1.1), majd ezt szaporítjuk L-táptalajban, amely 100 µg/ml ampicillint tartalmaz, és kinyerjük a plazmidot. A 2,4 kilobázis méretű pB1.1 plazmidnak mindkét szálát szekvenáljuk.

A pB1.1 inszert szekvenciáját használjuk a publikus adatbázis FASTA keresésére, hogy kimutassuk, van-e szekvencia azonosság és/vagy hasonlóság. Nem találtunk azonosságot az EST ismert génjeivel, jóllehet volt egy körülbelül 45%-os hasonlóság a humán és egér TNFR-2 génekkel. Egy metionin startkodont találtunk a nukleotid szekvencia 124-es nukleotidjánál, ezt követi egy LORF, amely 401 aminosav csoportot kódol, és az 1327-es csoportnál végződik. A 401 aminosavból álló termékről azt vártuk, hogy egy körülbelül 31 csoportból álló hidrofób szignálpeptidet tartalmaz az N-terminálisán, valamint van 4 potenciális N-kapcsolt glikozilezési helye. Nem azonosítottunk hidrofób transzmembrán szekvenciát, a PepPlot program alkalmazásával (Wisconsin GCG csomag, 8.1-es verzió). Azután a kikövetkeztetett 401 aminosavból álló szekvenciát használjuk a fehérje adatbázis átvizsgálására. Megint nem találtunk azonosságokat, jóllehet erős hasonlóságot találtunk a TNFR szupercsalád számos tagjával, leginkább említésre méltót az egér és humán TNFR-2-vel. A Pileup program segítségével illesztettük ezt a szekvenciát a TNFR szupercsalád ismert tagjaival, majd módosítottuk a PrettyPlot programmal (Wisconsin GCG csomag, 8.1-es verzió). Ez az illesztés egy világos homológiát mutat a teljes hosszúságú FRI-1 géntermékkel, valamint a TNFR család összes tagjával. A homológ régió a TNFR család tagjainak az extracelluláris doménjeire térképezhető, és megfelel ezeknek a fehérjéknek a ligandumkötő doménjében talált ciszteinek gazdag ismétlődéseknek. Ez azt sugallja, hogy az FRI-1 gén a TNFR család egy új tagját kódolja. Mivel nem lehetett kimutatni transzmembrán régiót, ezért azt gondoljuk, hogy ez egy szekretált receptor lehet, a TNFR-1 eredetű oldható receptorokhoz [Kohn és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **87**, 8331-8335 (1990)]. Az FRI-1 gén nyilvánvaló biológiai aktivitása következtében (*vide infra*), a termék neve Osteoprotegerin (OPG).

2. Példa

Az OPG mRNS expressziója szövetekben

Több humán szövetből származó Northern blottot (Clontech) vizsgálunk át ³²P-dCTP-vel jelzett FRI-1 PCR termékkel, hogy megtudjuk a humán átírat méretét és

hogy meghatározzuk az expresszió mintázatát. A Northern blottokat előhibridizáljuk 5X SSPE, 50% formamid, 5X Denhardt oldat, 0,5% SDS és 100 µg/ml denaturált lazacsperma DNS-sel, 2-4 óra hosszat, 42 °C-on. A blottokat azután 5X SSPE, 50% formamid, 2X Denhardt oldat, 0,1% SDS, 100 µg/ml denaturált lazacsperma DNS és 5 ng/ml jelzett próba összetételű oldatban hibridizáltatjuk 18-24 óra hosszat, 42 °C-on. A blottokat azután szobahőmérsékleten mossuk 2X SSC-ben, 1X SSC-ben 10 percig mossuk 50 °C-on, majd 0,5X SSC-ben mossuk 10-15 percig.

A patkánygénből származó próba felhasználásával számos szövetből ki lehetett mutatni egy körülbelül 2,4 kilobázis relatív molekulasúlyú, predomináns mRNS fajtát, beleértve a vesét, májat, méhlepényt és a szívet. A legmagasabb szintet a vesében lehetett kimutatni. Egy nagy, 4,5 és 7,5 kilobázis méretű mRNS fajtát lehetett kimutatni a vázizmokban és a hasnyálmirigyben. A humán magzati szövetben a veséről kiderült, hogy viszonylag nagy mennyiségben expresszálja a 2,4 kilobázis méretű mRNS-t. Egy humán próba alkalmazásával (*vide infra*) csak a 2,4 kilobázis méretű átíratot lehet kimutatni ugyanezekben a szövetekben. Emellett viszonylag magas szintű 2,4 kilobázis méretű átírat mutatható ki a nyirokcsomóban, a csecsemőmirigyben, a lépben és a vakbélben. A mind a patkány mind a humán Osteoprotegerin génnel kimutatott átírat mérete majdnem azonos a patkány pB1.1 FRI-1 inszert méretével, sugallva ezzel, hogy ez egy teljes hosszúságú cDNS klón.

3. Példa

Az OPG szisztémás bejuttatása transzgenikus egerekbe

A patkány pB1.1 OPG klónt használjuk templátként egy polimeráz láncreakcióban, hogy amplifikáljuk a kódoló régiót, azzal a céllal, hogy szubklónozzuk egy ApoE-máj specifikus expressziós vektorba [Simon és mtsai: J. Clin. Invest. 94, 1310-1319 (1994), US94/11675 PCT bejelentés; U.S. 08/221767 sorozatszám]. Az alábbi 5' és 3' oligonukleotid primereket használjuk a PCR amplifikáláshoz:

9. számú szekvencia

5'-GACTAGTCCCACAATGAACAAGTGGCTGTG-3'

10. számú szekvencia

5'-ATAAGAATGCGCCGCTAAACTATGAAACAGCCCAGTGACCATTC-3'

A PCR reakcióelegyet (Boehringer Mannheim) a következőképpen kezeljük: 94 °C 1 perc, 1 ciklus; 94 °C 20 másodperc, 62 °C 30 másodperc, 74 °C 1 perc, 25

ciklus. Az amplifikálást követően a mintákat Qiagen PCR oszlopon tisztítjuk, majd éjszakán át emésztjük SpeI és NotI restrikciós endonukleázokkal. Az emésztett termékeket azután extraháljuk és kicsapjuk, majd ApoE promotor expressziós vektorba szubklónozzuk. A kapott klónt, a HE-OPG-t mikroinjekciózása előtt szekvenáljuk, hogy bizonyítsuk, hogy mutáció mentes.

A HE-OPG plazmidot két CsCl gradiens centrifugálással tisztítjuk. A tisztított plazmid DNS-t XhoI és AseI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd a 3,6 kilobázis transzgén inszertet gélelektroforézissel tisztítjuk. A tisztított fragmenst 1 µg/ml koncentrációjú injekciós oldattá hígítjuk (5 mmol/l TRISZ pH=7,4, 0,2 mmol/l EDTA). A BDF1 x BDF1 egerek egysejtes embrióit injekciózzuk, lényegében a szakirodalomban megjelent leírás szerint [Brinster és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 82, 4338 (1985)], azzal az eltéréssel, hogy az injekciós tűket felhasználás előtt ferdére vágjuk és szilikonozzuk. Az embriókat éjszakán át CO₂ inkubátorban tartjuk, majd 15-20 kétsejtes embriót viszünk át átlátszó CD1 nőstény egerek petevezetékébe.

A terhességi periódus végén 49 utódot kaptunk a mikroinjekciózott és beültetett embriókból. Az utódokat az integrálódott transzgén PCR amplifikálásával vizsgáljuk át, a genomiális DNS mintákból. Az amplifikálás megcélzott régiója a humán Apo E intron egy 369 bázispár méretű régiója, ami benne van az expressziós vektorban. Az PCR amplifikáláshoz használt oligonukleotidok az alábbiak:

11. számú szekvencia

5'-GCC TCT AGA AAG AGC TGG GAC-3'

11. számú szekvencia

5'-CGC CGT GTT CCA TTT ATG AGC-3'

A polimeráz láncreakció körülményei a következők: 94 °C 2 perc, 1 ciklus; 94 °C 1 perc, 63 °C 20 másodperc és 72 °C 30 másodperc, 30 ciklus. A 49 eredeti utódból kilencet lehetett azonosítani pozitív transzgenikus utódként.

8-10 hetes korukban öt transzgenikus állatot (2-es, 11-es, 16-os, 17-es és 28-as) és öt kontrollt (1-es, 12-es, 15-ös, 18-as és 30-as) leölünk boncolás és patológiai elemzés céljából. A megmaradt négy transzgenikus állatból részleges hepatektómiával izoláljuk a májat. A részleges hepatektómiához az egereket elaltatjuk és a máj egy lebenyét sebészeti úton eltávolítjuk. Mindegyik transzgenikus állat, valamint az öt negatív kontroll állat májából össz-RNS-t izolálunk, a szakirodalomban megjelent

leírás szerint [McDonald és mtsai: *Methods in Enzymology* **152**, 219 (1987)]. Ezeken a mintákon Northern blot elemzést végzünk, hogy felbecsüljük a transzgenikus expresszió szintjét. Az egyes állatok májából származó össz-RNS-ből körülbelül 10 µg-ot denaturáló gélelektroforézissel elválasztunk [Ogden és mtsai: *Methods in Enzymology* **152**, 61 (1987)], majd Hybond-N nylon membránra (Amersham) vesszük át és ³²P-dCTP-vel jelzett pB1.1 inszert DNS-sel mint próbával vizsgáljuk át. A hibridizációt éjszakán át végezzük 42 °C-on 50% formamid, 5X SSPE, 0,5% SDS, 5X Denhardt oldat, 100 µg/ml denaturált lazacsperma DNS és 2-4x 10⁶ cpm jelzett próba/ml hibridizációs puffer összetételű oldatban. A hibridizálást követően a blottokat kétszer mossuk 2X SSC-vel, és 0,1% SDS-sel szobahőmérsékleten 5-5 percig, majd kétszer mossuk 0,1X SSC-vel és 0,1% SDS-sel 55 °C-on, 5-10 percig. A transzgenikus állatokban és a kontrollokban a transzgén expresszióját autoradiográfiával határozzuk meg.

A Northern blot adatok azt mutatják, hogy a transzgenikus utódok közül 7 expresszáll kimutatható szinten transzgenikus mRNS-t (a 2-es, 11-es, 16-os, 17-es, 22-es, 33-as és 45-ös). A negatív kontroll egerek és az egyik transzgenikus utód (a 28-as) a transzgénhez nem kapcsolódó mRNS-t expresszáll. Mivel azt várjuk, hogy az OPG egy szekretálódó fehérje, a transzgenikus mRNS túlexpressziója jó közelítése a szisztémásan bevitt géntermék szintjének. A PCR és Northern blot alapján pozitívnak bizonyult egerek, azaz a 2-es, 17-es és 22-es állat expresszálla a transzgenikus mRNS-t a legmagasabb szinten, és még más biológiai hatása is lehet a gazdasejtekre és szövetekre.

4. példa

Az OPG biológiai aktivitása

A transzgenikus egerek közül ötöt (a 2-es, 11-es, 16-os, 17-es és 28-as állatot) és 5 kontroll utódot (az 1-es, 12-es, 15-ös, 18-as és 30-as állatot) leölünk boncolás és patológiai elemzés céljából, az alábbi eljárások alkalmazásával: Az eutanázia előtt mindegyik állatnak ellenőrizzük az azonosítási számát, azután megmérjük a súlyukat, elaltatjuk őket és leszívjuk a vérüket. A vért mind szérum mind teljes vér formájában megőrizzük, teljes szérumkémiai és hematológiai vizsgálatok céljából. A radiográfiát közvetlenül a végső, halálos CO₂ belélegeztetésével végrehajtott elaltatás után és a teljes boncolás előtt végezzük el. Ezt követően a szöveteket eltávolítjuk és 10%-os pufferelt Zn-formalinban fixáljuk a hisztológiai vizsgálatok céljából. A vizsgált

szövetek közé tartozik a máj, a lép, a hasnyálmirigy, a gyomor, a patkóbél, a végbél, a vastagbél a vese, az ivarszervek, a bőr és az emlőmirigyek, a csont, az agy, a szív a tüdő, a csecsemőmirigy, a hörgők, az esophagus, a pajzsmirigy, a méh, a cecum, a végbél, a mellékvesék, a húgyhólyag és a vázizom. A fixálás előtt meghatározzuk a szervek súlyát a máj, a gyomor, a vese, a mellékvesék, a lép és a csecsmőmirigy esetében. Fixálás után a szöveteket paraffin blokkokba ágyazzuk be, majd 3 μ m-es szekciókat vágunk belőlük. A csontszövetet hangyasav oldattal kalcium-mentesítjük, majd mindegyik szekciót hematoxilinnel és eozinnal festjük. Emellett Gomori reticulinnal és Masson trichrommal is festjük az egyes szöveteket. Enzim hisztokémiát végzünk a tartarát rezisztens savas foszfatázzal (TRAP) (ez egy olyan enzim, amely erősen expresszálódik az oszteoklasztokban, a monocita-makrofág leszármazási sorba tartozó többmagvú, csont-felszívódásban szerepet játszó sejtekben). A BrdU és F480 monocita-makrofág felszíni antigén immunkémiai vizsgálatát is elvégezzük azzal a céllal, hogy kimutassuk a replikálódó sejteket, valamint a monocita-makrofág leszármazási sorba tartozó sejteket. Az F480 felszíni antigén expressziójának kimutatására a formalinban fixált, paraffinba ágyazott 4 μ m-es szekciókat paraffin-mentesítjük, majd ionmentesített vízzel hidratáljuk. A szekciókat 3%-os hidrogénperoxiddal oltjuk ki, Protein Block-kal (Lipshaw, Pittsburgh, PA) blokkoljuk, majd patkány monoklonális anti-egér F480-ban inkubáljuk (Harlan, Indianapolis, IN). Ezt az ellenanyagot biotínilezett nyúl anti-patkány immunglobulinokkal, peroxidázzal konjugált sztreptavidinnel (BioGenex San Ramon, CA) mutatjuk ki, DAB-ot (BioTek, Santa Barbara) használva kromagénként. A szekciókat hematoxilinnel ellenfestjük.

A teljes boncolással és a zsigeri szövetek megfigyelése után nem találtunk abnormalitásokat a transzgén expresszorokban vagy a kontroll utódokban. A szervsúlyok elemzése azt mutatja, hogy a transzgenikus egerekben a lép mérete körülbelül 38%-kal nőtt meg a kontrollokhöz viszonyítva. Enyhe emelkedés volt a vérlemezke méretben és enyhén nőtt a keringő festetlen sejtek száma a transzgenikus utódokban. Marginális növekedés volt a vérlemezke szintben a transzgenikus utódokban. Emellett a szérum húgysav, a vizelet nitrogén és alkalikus foszfatáz szintje mind alacsonyabb volt a transzgenikus utódokban. Az expresszálokról kiderült továbbá, hogy megnőtt a váz radiodenzitása, beleértve a hosszú csontokat (combesontok), a hátgerincet és a laposcsontokat (medence). A transzgenikus expresszálo utódokban a combcsontok relatív mérete nem tért el a kontroll egerek méretétől.

Az OPG-t expresszáló szervezetek csontjai festett szekcióinak hisztológiai elemzése súlyos oszteopetrotízist mutat a primer spongiosa-ból származó porcogó maradványainak jelenlétével, ami a combcsont diafizisben a csont gerendázatban látható. Egy világosan meghatározott kortex nem azonosítható a combcsont szekcióiban. A normális állatokban a központi diafizist csontvelő tölti ki. A gerinc szekciói is oszteopetrotikus változásokat mutatnak, beleértve, hogy az OPG által indukált váz-változások szisztémásak. A reziduális csontvelő főleg mieloid elemeket mutat. Megakariociták voltak jelen. A reticulín festékekkel nem volt kimutatható a reticulín lerakódása. Az F480, ami egy, az egérben monocita-makrofág származék sejtek által expresszált sejtfelszíni antigén, immunhisztokémiai vizsgálata F480 pozitív sejtek jelenlétét mutatja a velőterekben. Fokálisan, behorpadt F480 pozitív sejtek láthatók közvetlenül a gerendázat csontok felszínének szomszédságában.

A csontos gerendázat mellett felsorakozó mesenchyma sejtek behorpadtak és inaktívnak tűnnek. A H&E és TRAP festékek alapján az oszteoklasztok ritkán találhatók meg a gerendázatos csontok felszínén az OPG-t expresszáló szervezetekben. Ezzel szemben oszteoklasztok és/vagy chondroklasztok láthatók a növekedési lemez reszorbeáló porcok régiójában, de számuk a kontrollokhoz viszonyítva csökkent. Emellett oszteoklasztok voltak jelen a metafízis kortikális felszínén, ahol a modellezési aktivitás általában erős. Az expresszálók és a kontrollok között a domináns különbség a gerendázatos oszteoklasztok csökkenése az expresszálók és a kontrollok között, mint a gerincben mind a combcsontokban. A csont-akkumuláció mértéke közvetlen korrelációban van az OPG transzgen mRNS szintjével, amit az össz-máj-RNS Northern blotjával lehet kimutatni.

Az OG-t expresszáló szervezetek lépjeiben megnőtt a vörös bél mennyisége, a fokozott hematopoézis következtében fellépő kiterjedéssel. Mindegyik hematopoietikus származék reprezentálva van. Az F480 pozitív sejtek mind a kontroll mind az OPG-t expresszáló szervezetekben jelen vannak a vörös bélben. Az expresszáló szervezetek közül kettő (2 a 17-ből) extramedulláris hematopoézis gócokat tartalmaz a májban, és ez valószínűleg az oszteopetrotikus csontvelő miatt van.

Nincsenek megfigyelhető abnormalitások a csecsemőmirigyben, a nyirokcsomókban, a gasztrointesztinális szervekben, a pankreato-hepatobiliáris szervekben, a légzési szervekben, a szaporítószervekben, a genito-urináris rend-

szerben, a bőrben, az idegrendszerben, a szívben és az aortában, az emlőben, a vázizomban és a zsírban.

5. Példa

Az egér és humán cDNS izolálása

Az egér OPG mRNS 5' végének megfelelő cDNS klónt izoláltunk egérvese cDNS könyvtárból (Clontech), PCR amplifikálással. Az oligonukleotidok a patkány OPG cDNS szekvenciából származnak, szekvenciájukat az alábbiakban mutatjuk be:

13. számú szekvencia

5'-ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTG-3'

14. számú szekvencia

5'-GTTGCACTCCTGTTTCACGGTCTG-3'

15. számú szekvencia

5'-CAAGACACCTTGAAGGGCCTGATG-3'

16. számú szekvencia

5'-TAACTTTTACAGAAGAGCATCAGC-3'

17. számú szekvencia

5'-AGCGCGGCCCGCATGAACAAGTGGCTGTGCTGCG-3'

18. számú szekvencia

5'-AGCTCTAGAGAAACAGCCCAGTGACCATTCC-3'

Az ezzel az eljárással kapott részleges és teljes hosszúságú cDNS termékeket szekvenáljuk. A teljes hosszúságú terméket NotI és XbaI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan klónozzuk a pRcCMV plazmid vektorba (Invitrogen). A kapott plazmid neve pRcCMV-Mu-OPG. A klónozott termék nukleotid szekvenciáját a patkány OPG cDNS szekvenciával hasonlítjuk össze. Az OPG LORF-ot lefedő 1300 bázispáros régióban a patkány és az egér DNS szekvenciák körülbelül 88%-ban azonosak. Az egér cDNS szekvencia egy 401 aminosavból álló LORF-ot tartalmaz, amit a patkány OPG fehérjeszekvenciával hasonlítottunk össze, és kiderült, hogy körülbelül 94%-ban azonos, kihagyások nélkül. Ez azt mutatja, hogy az izolált cDNS szekvencia a rágsáló OPG fehérjét kódolja, és a szekvencia valamint a szerkezet erősen megőrződött az evolúció során. Az egér OPG fehérjeszekvencia tartalmaz egy azonos, feltételezett szignálpeptidet az N-terminálisán, és mind a 4 potenciális N-kapcsolt glikozilezési hely megőrződött. Egy részleges humán OPG

cDNS-t klónoztunk egy humán vese cDNS könyvtárból, az alábbi, patkányspecifikus oligonukleotidok felhasználásával:

19. számú szekvencia

5'-GTG AAG CTG TGC AAG AAC CTG ATG-3'

20. számú szekvencia

5'-ATC AAA GGC AGG GCA TAC TTC CTG-3'

Ezt a polimeráz láncreakció terméket szekvenáljuk, és arra használjuk, hogy primereket tervezzünk a humán cDNS 3' végének amplifikálására, egy humán OPG genomiális klónt felhasználva a lambdában templátként:

29. számú szekvencia

5'-TCCGTAAGAAACAGCCCAGTGACC-3'

21. számú szekvencia

5'-CAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTTG-3'

Az amplifikált PCR terméket szekvenáljuk, és az 5' vég szekvenciával együtt arra használjuk hogy 5' és 3' specifikus humán-specifikus primereket tervezzünk, amelyek a teljes humán OPG cDNS kódoló szekvencia amplifikálására használhatók:

22. számú szekvencia

5'-AGCGCGGCCGCGGGGACCACAATGAACAAGTTG-3'

23. számú szekvencia

5'-AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGCTCAATGGC-3'

A teljes hosszúságú humán PCR terméket szekvenáljuk, majd irányítottan klónozzuk a pRcCMV plazmid vektorba (Invitrogen), NotI és XbaI restrikciós endonukleázok felhasználásával. A kapott plazmid neve pRcCMV-humán OPG. A klónozott termék nukleinsav szekvenciáját a patkány és az egér OPG cDNS szekvenciájával hasonlítjuk össze. Az OPG LORF-ot lefedő 1300 bázispár méretű régióban a patkány és az egér DNS szekvenciák körülbelül 78-88%-ban azonosak a humán OPG cDNS-sel. A humán OPG cDNS szekvencia tartalmaz egy 401 aminosavból álló LORF-ot is, és ezt összehasonlítjuk a patkány és az egér fehérjeszekvenciákkal. A megjósolt humán OPG fehérje körülbelül 85%-ban azonos és körülbelül 90%-ban azonos a patkány és az egér fehérjékkel. A patkány, egér és humán fehérjék szekvencia-illesztése azt mutatja, hogy erősen megőrződtek az evolúció során. A humán fehérjéről azt jósoljuk, hogy van egy N-terminális szignálpeptidje, és van 5 potenciális

helye az N-kapcsolt glikozilezéshez, amelyek közül 4 megőrződött a patkány és az egér OPG fehérjékben is.

Az egér OPG DNS- és számított aminosav szekvenciáját a 9A. és 9B. ábrákon mutatjuk be (122. számú szekvencia). A humán OPG DNS- és megjósolt aminosav szekvenciája a 9C. és 9D. ábrákon látható (125. számú szekvencia). A patkány, egér és humán OPG aminosav szekvenciáinak összehasonlítása a 9E. és 9F. ábrákon látható.

További humán OPG cDNS klónok izolálása felfedte egy G→C változás jelenlétét a 9C. ábrán bemutatott DNS szekvencia 103-as pozíciójában. Ez a nukleotid változás azt eredményezi, hogy aszparagin helyettesít egy lizint a 9C. ábrán bemutatott szekvencia 3-as pozíciójában. Az ezt a változást hordozó többi klónban a szekvencia többi része azonos azzal, ami a 9C. és 9D. ábrákon látható.

6. Példa

Az OPG háromdimenziós szerkezeti modellezése

Az OPG N-terminális része homológ a TNFR szupercsalád összes ismert tagja extracelluláris részével (1C. ábra). A legjelentősebb motívum a TNFR-rel rokon géneknek ebben a régiójában egy körülbelül 40 aminosavat tartalmazó, ciszteinben gazdag ismétlődő szekvencia, amely különböző struktúrákba szerveződik [Banner és mtsai: *Cell* **73**, 431-445 (1993)]. Ez a motívum általában négy (3-6-os tartomány) tandem ismétlődésben jelenik meg (lásd az 1C. ábrát), és tudott, hogy szerepet játszik a ligandum megkötésében [Beutler és van Hufel: *Science* **264**, 667-663 (1994)]. Mindegyik ismétlődő rész általában hat elválasztó cisztein-csoportot tartalmaz, amelyek három, domének közötti diszulfid hid képzésében játszanak szerepet (SS1, SS2 és SS3) [Banner és mtsai: *Cell* **73**, 431-445 (1993)]. Néhány receptorban, mint például a TNFR2, CD30 és CD40 receptorban az ismétlődő domének közül néhány csak két, láncok közötti diszulfid kötést tartalmaz (SS1 és SS3).

A humán OPG fehérjeszekvenciát a TNFR1 extracelluláris domén profiljához illesztjük, Luethy és munkatársai módszerét alkalmazva [Luethy és mtsai: *Protein Science* **3**, 139-146 (1994)], majd az eredményeket grafikusán ábrázoljuk, a Wisconsin Package (8.1-es verzió) PrettyPlot programját használva (Genetics Computer Group, Madison, WI) (10. ábra). Az illesztés világosan mutatja, hogy az 1-4-es domének képződésében szerepet játszó cisztein-csoportok konzerválódtak. Ezt az illesztést használjuk azután a humán OPG N-terminális doménje háromdimenziós mo-

deljének konstruálására, a p55 TNFR1 extracelluláris doménje ismert háromdimenziós struktúrájának mint templánnak a felhasználásával [Banner és mtsai: Cell 73, 431-445 (1993)]. Ennek elvégzéséhez a peptidgerinc és az azonos csoportok oldalláncainak atomi koordinátáit a TNFR1 kristályszerkezetének koordinátáiról másoljuk le. Ezt követően az inszerciók és eltérő oldalláncok többi koordinátáját a LOOK programmal generáljuk (Molecular Applications Group, Palo Alto, CA). Azután finomítjuk a háromdimenziós modellt, a LOOK felhasználásával minimalizálva a konformációs energiát.

A TNFR család egyéb tagjaival való analógia alapján azt feltételezzük, hogy az OPG egy ligandumhoz kötődik. Az OPG ligandumával való kölcsönhatásának modellezésére a TNF- β kristályszerkezetét használjuk egy "OPG ligandum" háromdimenziós reprezentálására. Ezt az adatot grafikusán mutatjuk be (lásd 11. ábra), a Molscript használatával [Kraulis: J. Appl. Cryst. 24, 946-95 (1991)]. Az OPG/ligandum komplex modelljét 3 TNF β és 3 OPG molekulából készítjük el, amelyben az OPG relatív pozíciója azonos a TNFR1-ével a kristályszerkezetben. Ezt a modellt használjuk azután azoknak az OPG csoportoknak a megtalálására, amelyek kölcsönhatásba léphetnek a ligandumával, az alábbi megközelítés alapján: A komplexben minden, az összes csoportnak az oldószert számára hozzáférhető területét és egyetlen OPG modellt számítjuk ki. Azok a csoportok, amelyeknek eltér a komplexben a hozzáférhetőségük a monomerben való hozzáférhetőségtől, valószínűleg kölcsönhatásba lépnek a ligandummal.

A humán és az egér OPG aminosav szekvenciáját egymás mellé illesztjük, és ezt az információt használjuk arra, hogy kiemeljük azokat a szekvenciákat, amelyek az 1-4 ciszteinben gazdag doméneket tartalmaznak (12A. és 12B. ábra). Mindegyik doménnek egyedi, megkülönböztető strukturális jellemzői vannak:

1-es domén

4 ciszteint tartalmaz, amelyek az SS2 (C41-től C54-ig) és az SS3 (C44-C62-ig) diszulfid híd kialakításában vesznek részt. Jóllehet az SS1 kötés nem evidens a diszulfid hidak alapján, a konzervált tirozin a 28-as pozícióban homológ a TNFR1 Y20-as pozíciójával, amiről ismert, hogy a H66-tal kölcsönhatásban részt vesz a domén kialakításában. Az OPG-nek van egy homológ hisztidin csoportja a 75-ös pozícióban, sugallva, hogy az OPG Y28 és H75 csoportjai összetartanak a természetes fehérjében, ugyanúgy, ahogy a homológ csoportok teszik a TNFR1-ben. Ennek

következtében mindkét említett csoport valóban fontos lehet a biológiai aktivitás szempontjából, és az N-terminális OPG csonkítás, egészen az Y28-as csoportig, eltérő aktivitással rendelkezhet. Emellett az E34 csoportról és a K43 csoportról a háromdimenziós modellünk alapján az jósolható, hogy kölcsönhatásba lép egy megkötött ligandummal.

2-es domén

Hat ciszteint tartalmaz, és az jósolható meg róla, hogy tartalmazza az SS1 (C65-től C80-ig), SS2 (C83-től C98-ig) és SS3 (C87-től C105-ig) diszulfid hidakat. Az OPG-nek ez a régiója tartalmazhat egy olyan régiót, amely a P66-Q91-től terjeszkedik ki, és illeszkedik a TNFR1 2-es doménjéhez, amely szoros kontaktusokat hoz létre a TNF β -val (lásd az előzőkben), és kölcsönhatásba léphet egy OPG ligandummal. Pontosabban a P66, H68, Y69, Y70, T71, D72, S73, H75, T76, S77, D78, E79, L81, Y82, P85, V86, K88, E89, L90 és Q91 csoportoktól a szerkezeti adataink alapján az várható, hogy kölcsönhatásba lépnek egy megkötött ligandummal.

3-as domén

4 ciszteint tartalmaz, amelyek az SS1 (C107-től C118-ig) és az SS3 (C124-től C142-ig) diszulfid kötésekben szerepelnek, de nem vesznek részt az SS2 kötésben. A szerkezeti adataink alapján az várható, hogy az E115, L118 és K119 csoportok kölcsönhatásba lépnek egy OPG ligandummal.

4-es domén

4 ciszteint tartalmaz, amelyek az SS1 (C145-től C160-ig) és az SS3 (C166-től C185-ig) diszulfid hidakban szerepelnek, de nem vesznek részt az SS2 kötésben, a 3-as doménhez hasonlóan. Szerkezeti adataink azt mutatják, hogy az E153 és az S155 kölcsönhatásba lép egy OPG ligandummal.

Tehát az OPG számított szerkezeti modellje számos erősen konzerválódott csoportot azonosít, amelyek valószínűleg fontosak a biológiai aktivitás szempontjából.

7. Példa

Rekombináns szekretált OPG fehérje előállítása emlős sejtekben

Annak meghatározására, hogy az OPG valóban szekretált fehérje-e, az egér OPG cDNS-ét fuzionáltatjuk a humán IgG1 Fc doménjével mint jelzéssel [Capon és mtsai: Nature 357, 525-531 (1989)], és humán 293 fibroblasztokban expresszáltatjuk. Az Fc fúziókat a pFc-A3 vektor felhasználásával hajtjuk végre. A pFc-A3 tartalmazza a humán immunoglobulin IgG- γ 1 nehéz lánc Fc részét kódoló régiót [Ellison és mtsai:

Nucleic Acids Research 10, 4071-4079 (1992)], a csuklódomén első aminosavától (Glu-99) a C-terminálisig, és ezeket határolja egy 5'-NotI fúziós hely valamint egy 3'-SalI és XbaI hasítási hely. A plazmidot humán lép könyvtár (Clontec) PCR amplifikálásával állítjuk elő. A PCR reakciókat 100 µl végtérfogatban végezzük el, és 2 egység Vent DNS polimeráz (New England Biolabs) használunk, 20 mmol/l TRIS-HCl (pH=8,8), 10 mmol/l KCl, 10 µmol/l (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/l MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 400 µmol/l az egyes dNTP-kből, valamint egy ng az amplifikálandó cDNS könyvtárból, 1-1 µmol az egyes primerekből összetételű oldatban. A reakciókat úgy iniciáljuk, hogy 95 °C-on 2 percig denaturáljuk, ezt követi 30 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 30 másodpercig és 73 °C-on 2 percig. Az 5' primer:

24. számú szekvencia

5'-ATAGCGGCCGCTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC-3'

amelyben található egy NotI hasítási hely közvetlenül az IgG-γ1 csuklódoménje első csoportja után 5' irányban (Glu-99). A 3' primer az alábbi:

25. számú szekvencia

5'-TCTAGAGTCGACTTATCATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT-3'

amelyben található SalI és XbaI hasítási hely. A 717 bázispár méretű PCR terméket NotI és SalI restriktációs enzimmal emésztjük, elektroforézissel izoláljuk egy 1%-os agarózból (FMC Corp.), és a GeneClean eljárással tisztítjuk (BIO 101, Inc.), majd NotI, SalI restriktációs enzimekkel emésztett pBluescript II KS vektorba (Stratagene) klónozzuk. A kapott plazmidban, a pFc-A3-ban levő inszertet szekvenáljuk, hogy igazoljuk a PCR reakció pontosságát.

A klónozott egér cDNS-t a pRcCMV-MuOPG plazmidban amplifikáljuk az alábbi két primer-pár alkalmazásával:

1. pár

26. számú szekvencia

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3'

27. számú szekvencia

5'-CCTCTGCGGCCGCTAAGCAGCTTATTTTCACGGATTGAACCTG-3'

2. pár

28. számú szekvencia

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3'

30. számú szekvencia

5'-CCTCTGCGGCCGCTGTTGCATTTCCTTTCTG-3'

Az első amplifikálja a teljes OPG LORF-ot, és egy NotI hasítási helyet hoz létre, amely kompatibilis a leolvasási keretben levő NotI hasítási hellyel a pFcA3 fúziós vektorban. A pFcA3 vektort úgy állítjuk elő, hogy egy NotI hasítási helyet hozunk létre a humán IgG1 Fc cDNS 216 aszparaginsav csoportja mellett 5' irányban. Ezzel a konstrukcióval egy olyan linkert viszünk be, amely két irreleváns aminosavat kódol, amelyek lefedik az OPG fehérje és az IgG Fc régió közötti kapcsolódást. Ez a termék, ha az Fc részhez kapcsoljuk, akkor kódolja mind a 401 OPG csoportot, amit közvetlenül követ a humán IgG1 Fc régió 227 aminosava (F1.Fc). A második primer-pár az OPG első 180 aminosavát kódoló DNS szekvenciákat amplifikálja, amely a feltételezett ligandumkötő domént tartalmazza. Ugyanúgy mint az előzőkben, a 3' primer egy mesterséges NotI restrikciós hasítási helyet hoz létre, amely a C-terminálisán csonkított OPG LORF-ot a 180-as pozícióban levő treoninnál fuzionáltatja közvetlenül az IgG1 Fc doménjével (Ct.fc).

Az OPG 401 csoportját és a humán Fc régió 221-es aminosav csoportját összekapcsoló aminosav szekvencia kapcsolás módosítható, az alábbiak szerint: A humán Fc régió 216-220-as csoportjait kódoló DNS kivágható, az alábbiakban ismertetett módon, vagy a humán Fc régió C220-as csoportjának megfelelő ciszteincsoportot mutáltathatjuk szerinre vagy alaninra. Az ezek által a módosított vektorok által kódolt OPG-Fc fúziós fehérje transzfektálható humán 293 sejtekbe vagy CHO sejtekbe, majd a rekombináns OPG-Fc fehérje az alábbiakban ismertetett módon tisztítható.

Mindkét terméket irányítottan klónozzuk a pCEP4 plazmid vektorba (Invitrogen). A pCEP4 tartalmazza az Epstein-Barr vírus replikációs origóját, és képes episzómális replikációra 293-EBNA-1 sejtekben. A kiindulási pCEP4 vektort, valamint a pCEP4-F1.Fc és pCEP4-CT.Fc vektorokat lipofektáljuk 293-EBNA-1 sejtekbe, a gyártó által ajánlott módszereket alkalmazva. A transzfektált sejteket azután 100 µg/ml higromicinen szelektáljuk, hogy a vektor expresszióját szelektáljuk, majd a kapott antibiotikum-rezisztens tömegtenyészeteket összefolyásig tenyésztjük. A tenyészeteket azután szérum-mentes táptalajon tenyésztjük 72 óra hosszat, majd a kondicionált táptalajt eltávolítjuk és SDS-PAGE-val elemezzük. A poliakrilamid gél ezüsfestésével ki lehet mutatni az antibiotikum-rezisztens 293 tenyészetek által

termelt fő kondicionált táptalaj fehérjét. A pCEP4-F1.Fc és a pCEP4-CT.Fc kondicionált táptalajban a jóslott méretű egyedi csíkok nagy mennyiségben szekretálódnak (lásd a 13B. és 13C. ábrákat). A teljes hosszúságú Fc fúziós fehérje magas koncentrációban akkumulálódik, jelezve, hogy stabil lehet. Mindkét Fc fúziós fehérjét anti-humán IgG1 ellenanyaggal (Pierce) mutatjuk ki Western blottokon, jelezve, hogy rekombináns OPG termékek.

A teljes hosszúságú OPG-Fc fúziós fehérjét Protein-A oszlopkromatográfiával (Pierce) tisztítjuk, a gyártó által ajánlott módszert alkalmazva. A fehérjét azután N-terminális szekvencia elemzésnek vetjük alá automatizált Edman degradációval, lényegében a Matsudaira és munkatársai által ismertett módszerrel [Matsudaira és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **262**, 10-35 (1987)]. 19 ciklus után az alábbi aminosav szekvenciát lehetett meghatározni:

31. számú szekvencia

NH₂-E T L P P K Y L H Y D P E T G H Q L L-CO₂H

Ez a szekvencia azonos a számított egér OPG aminosav szekvenciával, a 22-es aminosavval kezdve, sugallva ezzel, hogy a természetes emlős vezérszekvencia hasítási hely a Q21-E22 aminosav csoportok között van, és nem az Y31-D32 között, ahogy azt eredetileg gondoltuk. A 293-EBNA sejtekben a pCEP4-F1.Fc és a pCEP4-CT.Fc konstrukciókkal végrehajtott expressziós kísérletek azt igazolják, hogy az OPG egy szekretált fehérje, és szisztémásan hathat a liganduma megkötésére.

A muOPG[22-180]-Fc és a muOPG[22-401]-Fc fúziók készítésére és expresszáására használt eljárásokhoz hasonló eljárásokat használunk további egér és humán OPG-Fc fúziós fehérjék előállítására.

A humán IgG1 Fc régiójához fuzionált 1-185 aminosavakat kódoló rágcsáló cDNS-t [MuOPG Ct(185).Fc] az alábbiak szerint állítjuk elő. A pRcCMV Mu Osteoprotegerin plazmidból származó rágcsáló OPG cDNS-t (ezt az 5. példában írtuk le) amplifikáljuk, az alábbi primer-párt alkalmazva egy, az előzőekben ismertett polimeráz láncreakcióban:

32. számú szekvencia

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

33. számú szekvencia

1333-80:

5'-CCT CTG CGG CCG CAC ACA CGT TGT CAT GTG TTG C-3'

Ez a primer-pár az OPG leolvasási keret 63-185-ös aminosav csoportjait (ez a 278-645-ös bázispároknak felel meg) kódoló rágsáló OPG cDNS-t amplifikálja, amint azt a 9A. ábrán mutatjuk be. A 3' primer tartalmazza a NotI restrikciós hasítási helyet, amely kompatibilis a pFcAr Fc fúziós vektor NotI hasítási helyével. A termék lefedi a 436-os bázispárnál található egyedi EcoRI restrikciós hasítási helyet. Az amplifikált PCR terméket tisztítjuk, NotI és EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd a kapott EcoRI-NotI restrikciós fragmenst tisztítjuk. A rágsáló 1-401 OPG-Fc fúziós inszertet tartalmazó pCEP4 vektort EcoRI és NotI restrikciós enzimekkel emésztjük, tisztítjuk, majd az előzőekben előállított PCR termékhez ligáljuk. A kapott pCEP4-alapú expressziós vektor az 1-185-ös OPG csoportokat kódolja, amit közvetlenül követ a humán IgG1 Fc régiónak mind a 227 aminosav csoportja. A rágsáló OPG 1-185.Fc fúziós vektort 293 sejtekbe transzfektáljuk, antibiotikummal szelektáljuk, majd az előzőekben ismertetett módon kondicionált táptalajokat állítunk elő. A kapott szelektált rágsáló OPG 1-185.Fc fúziós terméket Protein-A oszlopkromatográfiával (Pierce) tisztítjuk, a gyártó által ajánlott eljárásokat alkalmazva.

A humán IgG1 Fc régiójához fuzionáltatott 1-194-es aminosavakat kódoló rágsáló OPG DNS-t (muOPG Ct(194).Fc) az alábbiak szerint állítjuk elő. A pRcCMV Mu-Osteoprotegerin plazmidből származó egér OPG cDNS-t az alábbi primer-párral amplifikáljuk:

34. számú szekvencia

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

35. számú szekvencia

1333-81:

5'-CTT CTG CGG CCG CCT TTT GCG TGG CTT CTC TGT T-3'

Ez a primer-pár az OPG leolvasási keret 70-194-es aminosav csoportjait (ami megfelel a 298-672-es bázispároknak) kódoló rágsáló OPG cDNS-t amplifikálja. A 3' primer tartalmaz egy NotI restrikciós hasítási helyet, amely kompatibilis a pFcA3 Fc fúziós vektor leolvasási keretben levő NotI hasítási helyével. A termék tartalmaz egy egyedi EcoRI restrikciós hasítási helyet a 436-os bázispárnál. Az amplifikált PCR terméket a rágsáló OPG[1-401] Fc fúziós vektorba klónozzuk, amit az előzőekben ismertettünk. A kapott pCEP4 alapú expressziós vektor az 1-194-es OPG csoportokat

kódolja, amit közvetlenül követ a humán IgG1 Fc régiónak mind a 227 aminosava. A rácsáló OPG 1-194.Fc fúziós vektort 293 sejtekbe transzfektáljuk, antibiotikummal szelektáljuk, majd kondicionált táptalajt állítunk elő. A kapott szekréciós terméket Protein-A oszlop-kromatográfiával (Pierce) tisztítjuk, a gyártó által ajánlott eljárást alkalmazva.

A humán OPG 1-401-es aminosavait a humán IgG1 Fc régiójához fuzionáltatva kódoló humán OPG DNS-t az alábbiak szerint állítjuk elő. A pRcCMV-hu osteoprotegerin plazmidban levő humán OPG DNS-t (lásd 5. példa) amplifikáljuk, az alábbi oligonukleotid primerek alkalmazásával:

36. számú szekvencia

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'

37. számú szekvencia

1254-95:

5'-CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG AAT GG-3'

A kapott PCR termék a teljes hosszúságú humán OPG fehérjét kódolja, és egy NotI restrikciós hasítási helyet hoz létre, amely kompatibilis az FcA3 Fc fúziós vektor leolvasási fázisban levő NotI hasítási helyével. A PCR terméket irányítottan klónozzuk a pCEP4 plazmid vektorba, az előzőekben ismertetett módon. A kapott expressziós vektor a humán OPG 1-402-es csoportjait kódolja, amit közvetlenül követ a humán IgG1 Fc régió 227 aminosav csoportja. A transzfektált és antibiotikummal szelektált sejtekkel kondicionált táptalajt állítunk elő, és a huOPG F1.Fc fúziós terméket Protein-A oszlop-kromatográfiával (Pierce) tisztítjuk, a gyártó által ajánlott eljárást alkalmazva.

A humán OPG 1-201 aminosav csoportjait a humán IgG1 Fc régiójához fuzionáltatva kódoló humán OPG DNS-t az alábbiak szerint állítjuk elő. A pRrCMV-hu osteoprotegerin plazmidból származó humán klónozott OPG cDNS-t PCR-rel amplifikáljuk, az alábbi nukleotid primer-párt alkalmazva:

38. számú szekvencia

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'

39. számú szekvencia

1254-92:

5'-CCT CTG CGG CCG CCA GGG TAA CAT CTA TTC CAC-3'

Ez a primer-pár az OPG leolvasási keret 1-201 aminosavait kódoló humán OPG cDNS régiót amplifikálja, és NotI restrikciós hasítási helyet hoz létre a 3' végen, amely kompatibilis az FcA3 Fc fúziós vektor leolvasási keretben levő NotI restrikciós hasítási helyével. Ez a termék, ha az Fc részhez kapcsoljuk, akkor az 1-201-es OPG csoportokat kódolja, amit közvetlenül követ a humán IgG1 Fc régiónak mind a 221 aminosav csoportja. A PCR terméket irányítottan klónozzuk a pCEP4 plazmid vektorba, az előzőekben ismertetett módon. A transzfektált és antibiotikummal szelektált sejtekből kondicionált táptalajt készítünk, majd a hu OPG Ct(201).Fc fúziós terméket Protein-A oszlopkromatográfiával (Pierce) tisztítjuk, a gyártó által ajánlott eljárást alkalmazva.

Az alábbi eljárásokat alkalmazzuk nem-fúzionált egér és humán OPG készítésére és expresszáására.

A teljes hosszúságú rágsáló OPG (1-401-es csoportok) emlős sejtekben való expresszáálásához plazmidot készítünk a pRcCMV Mu-Osteoprotegerin plazmidból származó rágsáló OPG cDNS inszert PCR amplifikálásával, majd a pDSR α expressziós vektorba szubklónozzuk [DeClerck és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3893 (1991)]. Az alábbi oligonukleotid primereket használjuk:

40. számú szekvencia

1295-26:

5'-CCG AAG CTT CCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GC-3'

41. számú szekvencia

1295-27:

5'-CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G-3'

A rágsáló OPG teljes hosszúságú leolvasási keretét PCR-rel amplifikáljuk, az alábbiakban ismertetett módon. A PCR terméket tisztítjuk, majd HindIII és XbaI restrikciós endonukleázokkal (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) emésztjük, a gyártó által ajánlott körülmények között, majd HindIII és XbaI restrikciós endonukleázokkal emésztett pDSR α plazmidba ligáljuk. A rekombináns klónokat restrikciós endonukleáz emésztéssel mutatjuk ki, majd szekvenáljuk, hogy igazoljuk, miszerint nem vittünk be mutációkat a génbe a PCR amplifikációs lépések során.

A kapott plazmidot, a pDSR α -muOPG-t aranyhörsög petefészek (CHO) sejtekbe visszük be, kalciumos transzfektációval [Wigler és mtsai: *Cell* **11**, 233 (1977)].

Az egyedi klónokat a dihidrofolát reduktáz (DHFR) génnek a plazmidról való expressziójára alapuló szelekcióval választjuk ki, és számos klónt izolálunk. A rágsáló OPG rekombináns fehérje expresszióját a CHO sejtek kondicionált táptalaja Western blotjával követjük. Az erősen expresszáló sejteket választjuk ki, majd az OPG expresszióját tovább amplifikáljuk metotrexát kezeléssel, a szakirodalomban megtalálható leírás szerint [DeClerck és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3893 (1991)]. A CHO sejtvonalakból kondicionált táptalajt készítünk, amiből további tisztítással előállítjuk a szekretált rágsáló OPG fehérjét.

A teljes hosszúságú humán OPG (1-401-es aminosavak) emlős sejtekben való expressziójához használható plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pRcCMV-hu Osteoprotegerin plazmidban levő cDNS inszertet szubklónozzuk a pDSRα vektorba [DeClerck és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3893 (1991)]. A pRcCMV-OPG plazmidot teljesen megemésztjük NotI enzimmal, tompavégűvé alakítjuk Klenow fragmenssel, majd teljesen megemésztjük XbaI enzimmal. A vektor DNS-t HindIII enzimmal emésztjük, tompavégűvé alakítjuk Klenow fragmenssel, majd XbaI restrikciós endonukleázzal emésztjük és az OPG inszerttel ligáljuk. A rekombináns plazmidokat azután szekvenáljuk, hogy igazoljuk a humán OPG cDNS helyes orientációját.

A kapott pDSRα-huOPG plazmidot aranyhőrcsög petefészkek (CHO) sejtekbe visszük be, az előzőekben ismertetett módon. Az egyes telepeket a plazmid vektorban levő dihidrofolát reduktáz (DHFR) gén expressziója alapján szelektáljuk, majd számos telepet izolálunk. A humán OPG rekombináns fehérje expresszióját a CHO sejtekkel készített kondicionált táptalaj Western blot elemzésével követjük. Az erősen expresszáló klónokat választjuk ki, majd az OPG expressziót tovább erősítjük, metotrexátos kezeléssel. A humán OPG-t expresszáló CHO sejtvonalakból kondicionált táptalajt készítünk a fehérjetisztításhoz.

A rágsáló OPG 1-185-ös csoportjait kódoló expressziós vektorokat az alábbiak szerint állítjuk elő. A pRcCMV-Mu OPG-ből származó rágsáló OPG cDNS-t amplifikáljuk, az alábbi oligonukleotid primerek felhasználásával:

42. számú szekvencia

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

43. számú szekvencia

1356-12:

5'-CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC-3'

Ezzel a primer-párral az OPG leolvasási keret (278-645-ös bázispárok) 63-185-ös aminosavait kódoló rágsáló OPG cDNS-t amplifikáljuk, amely egy mesterséges stopkodont tartalmaz közvetlenül a cisztein kodon (C185) után, amit egy mesterséges Sall restrikciós hasítási hely követ. A kikövetkeztetett termék tartalmaz egy belső EcoRI restrikciós hasítási helyet, amely jól használható egy előkészített vektorba való szubklónozáshoz. A PCR amplifikálás után a kapott termékeket EcoRI és Sall restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd a nagy fragmenst gélen tisztítjuk. A tisztított terméket azután az előzőekben ismertetett pBluescript-muOPG F1.Fc plazmid EcoRI és Sall emésztésével kapott nagy restrikciós fragmensével ligáljuk. A kapott plazmidot HindIII és XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd a kis fragmenst gélen tisztítjuk. Ezt a fragmenst, amely az 1-185-ös csoportokat kódoló nyitott leolvasási keretet tartalmazza, azután a HindIII és XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztett pCEP4 expressziós vektorba szubklónozzuk. A kapott vektor, a pmuOPG [1-185], egy csonkított OPG polipeptidet kódol, amely a 185-ös pozícióban levő cisztein-csoportnál ér véget. A transzfektált és antibiotikummal szelektált kondicionált táptalajt az előzőekben ismertetett módon állítjuk elő.

44. számú szekvencia

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

45. számú szekvencia

1356-13:

5'-CCT CTG TCG ACT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TT-3'

Ezzel a primer-párral az OPG leolvasási keret (298-672-es bázispárok) 70-194-es aminosavait kódoló rágsáló OPG cDNS régiót amplifikáljuk, amely egy mesterséges stopkodont tartalmaz közvetlenül a lizin kodon (K194) után, amit egy mesterséges Sall restrikciós endonukleáz hasítási hely követ. A kikövetkeztetett termék tartalmaz egy belső EcoRI hasítási helyet, amely jól használható egy előkészített vektorba való klónozáshoz. A PCR amplifikálás után a kapott tisztított terméket EcoRI és Sall restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd a nagy fragmenst gélen tisztítjuk. A tisztított terméket azután az előzőekben ismertetett pBluescript-muOPG F1.Fc EcoRI és Sall restrikciós endonukleázos hasításával kapott nagy

fragmensbe szubklónozzuk. A kapott plazmidot HindIII és XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd a kis fragmenst gélen tisztítjuk. Ezt a fragmenst, amely az 1-185-ös csoportokat kódoló nyitott leolvasási keretet tartalmaz, azután HindIII és XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztett pCEP4 expressziós vektorba szubklónozzuk. A kapott vektor, a pmuOPG [1-185] egy csonkított OPG polipeptidet kódol, amely a 194-es pozícióban levő lizinnél végződik. A transzfektált és antibiotikummal szelektált kondicionált táptalajt az előzőekben ismertetett módon állítjuk elő.

Számos mutációt hozunk létre a huOPG [22-401]-Fc gén 5' végén, amelyekkel vagy aminosav helyettesítéseket vagy deléciókat viszunk be az OPG-be a 22-32-es csoportok között. Mindegyik mutációt a "Quickchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit"-tel (Stratagene, San Diego, CA) visszük be, a gyártó által ajánlott körülmények között. Röviden, a huOPG [22-401]-Fc plazmid DNS templátot tartalmazó reakcióelegyet Pfu polimerázzal kezeljük dezoxinukleotidok jelenlétében, majd egy PCR be rendezésben amplifikáljuk, az előzőekben ismertetett módon. A reakcióelegy egy alikvot részét azután kompetens *Escherichia coli* XL1-Blue sejtekbe visszük be hősokkal, majd kiszélesztjük őket. A transzformánsokból származó plazmid DNS-t azután szekvenáljuk, a mutációk igazolására.

Az alábbi primer-párt használjuk a humán OPG gén 22-26-os csoportjainak kivágására, így állítjuk elő a huOPG [27-401]-Fc fúziós fehérjét:

140. számú szekvencia

1436-11:

5'-TGG ACC ACC CAG AAG TAC CTT CAT TAT GAC-3'

141. számú szekvencia

1436-12:

5'-GTC ATA ATG AAG GTA CTT CTG GGT GGT CCA-3'

Az alábbi primer-párt használjuk a humán OPG gén 22-28-as csoportjainak kivágására, így állítjuk elő a huOPG [29-401]-Fc fúziós fehérjét:

142. számú szekvencia

1436-17:

5'-GGA CCA CCC AGC TTC ATT ATG ACG AAG AAA C-3'

143. számú szekvencia

1436-18:

5'-GTT TCT TCG TCA TAA TGA AGC TGG GTG GTC C-3'

Az alábbi primer-párt használjuk a humán OPG gén 22-31-es csoportjainak kivágására, így állítjuk elő a huOPG [32-401]-Fc fúziós fehérjét:

144. számú szekvencia

1436-27:

5'-GTG GAC CAC CCA GGA CGA AGA AAC CTC TC-3'

145. számú szekvencia

1436-28:

5'-GAG AGG TTT CTT CGT CCT GGG TGG TCC AC-3'

Az alábbi primer-párt használjuk a humán OPG gén 28-as tirozincsoportja kodonjának fenilalanin kodonra való cserélésére, így állítjuk elő a huOPG [22-401]-Fc Y28F fúziós fehérjét:

146. számú szekvencia

1436-29:

5'-CGT TTC CTC CAA AGT TCC TTC ATT ATG AC-3'

147. számú szekvencia

1436-30:

5'-GTC ATA ATG AAG GAA CTT TGG AGG AAA CG-3'

Az alábbi primer-párt használjuk a humán OPG gén 26-os prolincsoportja kodonjának alanin kodonra való cserélésére, így állítjuk elő a huOPG [22-401]-Fc P26A fúziós fehérjét:

148. számú szekvencia

1429-83:

5'-GGA AAC GTT TCC TGC AAA GTA CCT TCA TTA TG-3'

149. számú szekvencia

1429-84:

5'-CAT AAT GAA GGT ACT TTG CAG GAA ACG TTT CC-3'

Mindegyik keletkező muOPG [22-401]-Fc plazmidot, amelyek a megfelelő mutációt tartalmazzák, azután humán 293 sejtekbe transzfektáljuk, majd a mutáns OPG-Fc fúziós fehérjét az előzőekben ismertetett módon tisztítjuk a kondicionált táptalajból. Az egyes fehérjék biológiai aktivitását a 11. példában ismertetett *in vitro* oszteoklaszt képződési vizsgálattal határozzuk meg.

8. Példa

Az OPG expressziója *Escherichia coli*-ban

pAMG21

A pAMG21 expressziós plazmid az Amgen pCFM1656 expressziós vektorból származik (ATCC #69576), ami viszont az Amgen expressziós vektor rendszerből származik, amit a 4,710,473 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben ismertettek. A pCFM1656 plazmid a már leírt pCFM836 plazmidból származtatható (4,710,473 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés), az alábbi módon: (a) T4 polimerázzal elroncsoljuk a két belső NdeI restriktációs hasítási helyet, majd tompavég ligálást végzünk; (b) az egyedi AatII és ClaI restriktációs hasítási helyek között levő, a szintetikus P_L promotert tartalmazó DNS szekvenciát egy hasonló, a P_L promotert tartalmazó fragmenssel helyettesítjük, amit a pCFM636 plazmidból állítunk elő 4,710,473 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés).

AatII

5' CTAATTCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
3TGCAGATTAAAGCCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGGACGTTTTTTTATTAAAGTATA-

-AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACCTGTATTI-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAACACAT 3' (53. számú szekvencia)

-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5' (54. számú szekvencia)

ClaI

majd (c) az alábbi oligonukleotiddal helyettesítjük az egyedi ClaI és KpnI hasítási helyek között levő DNS szekvenciát:

5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3'

(48. számú szekvencia)

3' TAAACTAAGATCTTCCTTATGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'

(49. számú szekvencia)

ClaI

KpnI

A pAMG21 expressziós plazmidot a pCFM1656-os plazmidból állíthatjuk elő, egy sorozat helyspecifikus báziscserével, amit PCR-es oligonukleotid mutagenézissel és DNS szekvencia helyettesítéssel hajtunk végre. A plazmid P_{copB} replikációs promotere közvetlen szomszédságában 5' irányban levő BglII hasítási helytől (180-as bázis-

pár) kiindulva, és a plazmid replikációs génjei irányában haladva az alábbi báziscseréket végezzük el:

pAMG21 bp#	bp a pCFM1656-ban	a megváltozott bázispár a pAMG21-ben
# 204	T/A	C/G
#428	A/T	G/C
#509	G/C	A/T
#617	--	két G/C bázispár beszúrása
#679	G/C	T/A
#980	T/A	C/G
#994	G/C	A/T
#1004	A/T	C/G
#1007	C/G	T/A
#1028	A/T	T/A
#1047	C/G	T/A
#1178	G/C	T/A
#1466	G/C	T/A
#2028	G/C	bp deléción
#2187	C/G	T/A
#2480	A/T	T/A
#2499-2502	AGTG	GTCA
	TCAC	CAGT
#2642	TCCGAGG	7 bázispár deléción
	AGGCTCG	
#3435	G/C	A/T
#3446	G/C	A/T
#3643	A/T	T/A

Az egyedi AatII (#4364-es pozíció a pCFM1656-ban) és SacII (#4585-ös pozíció a pCFM1656-ban) hasítási helyek közötti restrikciós hasítási helyeket az alábbi DNS szekvenciával helyettesítjük:

[AatII tapadós vég] 5' GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
(#4358-os pozíció a pAMG21-ben) 3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGG-

-
CCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT
-
-GGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-
-GGGCTTTTCGTTTATCTGTGTGTTGTCGGTGAAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGC-
-
CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGGCG-
-
CGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGGGGGCAGGACGCCCCGC
-
-GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCCGGGCCCTCCACCGCCCGTCCTGCGGGCG-
-
-CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCT-
-GTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTGCTCTTCCGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCA-
AatII
-TTCTACAACTCTTTTGTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
-AAGATGTTTGAGAAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG-
-
-TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTGTTAAAATTGCTTTAGAAATACCTTTGGCAGC-
-AAAATTTTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG-
-
-GGTTTGTGTTGATTGAGTTTCATTTGCCGATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC-
-CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACCGGTAACCAATTTACCTTTCACTGGCACCGGAATG-
-
-TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTCTTCGCATGCCACGCTAAAC-
-
ATGTCGGATTATAAAAACTTTATAGGGTTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTG-
-
-ATTCCTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTGTTGATTTATTATTTGCTATATTTATTTTC-

TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTTAGCAACAACTAAATAATAAACGATATAAATAAAAAAG

GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTTCATACACGCATGTAAAAATA-
-CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATAACAAGTATGTGCGTACATTTTTAT-

-AACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
-TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTGTAAGGCTTCGGTAATA-

-TAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTGCTTCTTTAA-
-ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-

-TTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
-AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAACAAAAGTTTATATAAGGTAAATTAGCCAC-

-AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT-
-TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAAATAATTTAATCGCAGTAGTA-

-AATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATAG-
-TTATAACGGAGGTAAAAAATCCCATTAATAGGCTTAACCTTATAGTCTAAATTGGTATC-

-AATGAGGATAAATGATCOCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAG-
-TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTATTATTATAAGTGTACATGGTAAAATCAGTATAGTC-

-ATAAGCATTGATTAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAAATTATTCTGT-
-TATTCGTAACCTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAATAAATTAATAAGACA-

-AAGTGTGTCGGCATTATGTCTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTG-

TTACAGCAGCCGTAAATACAGAAAGTATGGGTAGAGAAATAGGAATGGATAACAAACAG

-GCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA-
-CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTIGCCATTATCTAAGTAACTAACTAAGATTATT-

-ATTGGATTTTTGTACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTG-

TAACCT_AAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACTTTATGTTAACAAATTGTATTCAATGGAC-

-TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGTCGATTAATCGATTTGATT-

-ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTTACCAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-

-CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGA-

-GATCTAAACAAAATTGATTAAATTTCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-

SacII

GCTCACTAGTGTGCGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA-

-CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTT-

GAAGAAGAAGAAGAAAGCCCCAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA

-CTTCTTCTTCTTCTTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-

-ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGCTGAAAGGAGG-

-TGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTGCCCCAGAACTCCCCAAAAACGACTTTCCTCC-

-AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3' [SacII tapadós vég] (50. számú szekv.)

-TTGGCGAGAAGTGCGAGAAGTG 5' (#5904 pozíció a pAMG21 plazmidban) (46. számú szekv.)

Emnek a helyettesítő DNS szekvenciának a tapadós végeinek a ligálása során a külső AatII és SacII hasítási helyek elromlanak. Vannak egyedi AatII és SacII hasítási helyek a helyettesítő DNS-ben.

pAMG22-His

A pAMG22-His expressziós plazmidot az Amgen expressziós vektorból állíthatjuk elő, a pAMG22 egyedi NdeI (#4759) és EcoRI (#4818) hasítási helyei között levő kis DNS szekvenciát az alábbi oligonukleotid duplexszel helyettesítjük:

NdeI	NheI	EcoRI	
5' TATGAAACATCATCACCATCACCATCATGCTAGCGTTAACGCGTTGG			3'

(51. számú szekvencia)

3' ACTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTAGTACGATCGCAATTGCGCAACCTTAA	5'
--	----

(52. számú szekvencia)

MetLysHisHisHisHisHisHisAlaSerValAsnAlaLeuGlu

(168. számú szekvencia)

pAMG22

A pAMG22 expressziós plazmid az Amgen pCFM1656-os expressziós vektorából (ATCC #69576) származhat, ami viszont az 1987. december 1-jén megadott 4,710,472-as számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben ismertetett expressziós vektor rendszerből állítható elő. A pCFM1656 plazmidot előállíthatjuk a szakirodalomban ismertetett pCFM836-os plazmidból (4,710,473-as szabadalmi bejelentés), az alábbiak szerint:

(a) elrontjuk a két belső NdeI restrikciós hasítási helyet, T4 polimerázzal feltöltve, majd tompavég ligálást hajtva végre; (b) a szintetikus PL promotert tartalmazó, az egyedi AatII és ClaI restrikciós hasítási helyek között levő DNS szekvenciát egy hasonló, a PL promotert tartalmazó fragmenssel helyettesítjük, amit a pCFM636-os plazmidból lehet kinyerni (4,710,473-as szabadalmi bejelentés):

AatII

5' CTAATTCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
3'TGCAGATTAAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGGACGTTTTTTAATTAAGTATA-

-AAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACCTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT (53. számú szekvencia)

-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGCS' (54. számú szekvencia)

ClaI

majd (c) az alábbi oligonukleotiddal helyettesítjük az egyedi Call és KpnI restrikciós hasítási helyek közötti kis DNS szekvenciát:

5' CGATTTGATTCTAGAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3'
(55. számú szekvencia)

3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'
(56. számú szekvencia)

ClaI

KpnI

A pAMG22 expressziós plazmidot a pCFM1656-os plazmidból állíthatjuk elő, egy sorozat helyspecifikus báziscserét végezve PCR átlapoló oligonukleotid mutagenézissel és DNS szekvencia helyettesítéssel. A plazmid PcopB replikációs promotere mellett 5' irányban levő BglII hasítási helynél (#180-as bázispár) és a plazmid replikációs génjei irányába haladva, az alábbi báziscseréket hajtjuk végre:

pAMG22 bp#	bp a pCFM1656-ban	a pAMG22-ben megváltoztatott bp
# 204	T/A	C/G
#428	A/T	G/C
#509	G/C	A/T
#617	--	két G/C bázispár beszűrése
#679	G/C	T/A
#980	T/A	C/G
#994	G/C	A/T
#1004	A/T	C/G
#1007	C/G	T/A
#1028	A/T	T/A
#1047	C/G	T/A
#1178	G/C	T/A
#1466	G/C	T/A
#2028	G/C	bp deléció
#2187	C/G	T/A
#2480	A/T	T/A
#2499-2502	AGTG	GTCA
	TCAC	CAGT
#2642	TCCGAGG	7 bázispár deléció
	AGGCTCG	
#3435	G/C	A/T
#3446	G/C	A/T
#3643	A/T	T/A

Az egyedi AatII (#4364-es pozíció a pCFM1656-ban) és SacII (#4585-ös pozíció a pCFM1656-ban) restrikciós hasítási helyek közötti DNS szekvenciát az alábbi DNS szekvenciával helyettesítjük:

[AatII tapadós vég] (#4358-as pozíció a pAMG22-ben)

5' GCGTAACGTATGCATGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAA-
 3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGGGGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTT-
 -ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGCGCCTTTTCGTTTTATCIGTTGTTTGTCCGGTG-
 -TATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGACCCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCAC-
 -
 AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTGTAACGTTGCGAAACCAACGG-
 -TTCCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCGGCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCC-
 -
 CCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG
 -
 -GGGCCTCCACCGCCCGTCCTGCGGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGTCTTC-
 -GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTGGGTTTCTACAAACTCTTTTGTATTTTCTAAAT-
 -
 CGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCAAAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTA

AatII

-ACATTCAAATATGGACGTCTCATAATTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAAATTC-
 -TGTAAGTTTATACCTGCAGAGTATTAATAATTTTAAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAG-
 -TTGATTAAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGATTTGATTCTAGATTTGTTT-
 -AACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGCTAAACTAAGATCTAAACTCA-
 -TAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGAGCTCACTAGTGT-
 -ATTGATTAAATTTCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCTCGAGTGATCACA-

SacII

CGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCCGAAAGAAGAAGAAGAAGAA
 -
 -GCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTTCTTCTTCTTCTT-
 -
 GAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC-
 -CTTTCGGGCTTTCTTCTGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGG-

-CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAACCGCTCTTCA-
 -GGAACCCCGGAGATTGCCCCAGAACTCCCCAAAAAACGACTTTCCTCCTTGGCGAGAAAGT-
 -CGCTCTTCAACGC 3' (58. számú szekvencia)
 -GCGAGAAGTG 5' (57. számú szekvencia)

Ezen helyettesítő DNS szekvencia tapadós végeinek ligálása során a szélső AatII és SacII hasítási helyek elromlanak. Vannak egyedi AatII és SacII hasítási helyek a helyettesített DNS-ben.

B. Humán OPG Met [32-401]

A példában a használt expressziós vektor a pAMG21, ami a pCFM1656-nak egy származéka (ATCC letéti szám: 69576), amely megfelelő restrikciós hasítási helyeket tartalmaz azzal a céllal, hogy a *lux* PR promoter után géneket lehessen beilleszteni [a *lux* expressziós rendszer leírását lásd az 5,169,318-as számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben]. A használt gazdasejt a GM120 (ATCC letéti száma: 55764). Ebben a *lacI*Q promoter és a *lacI* gén a prototróf *Escherichia coli* K12 gazdaszervezet kromoszómáján egy második helyre integrálódott. Más, általánosan használt *Escherichia coli* expressziós vektorok és gazdasejtek is alkalmasak az expresszállásra.

A humán OPG polipeptid N-terminális metioninját és 32-401-as aminosavait kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 expressziós vektorban a *luxPR* promoter szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. Ennek végrehajtásához az #1257-20 és #1257-19 oligonukleotidokkal mint primerekkel PCR reakciót hajtunk végre, templátként a pRcCMV-Hu OPG DNS-t használva, amely tartalmazza a humán OPG cDNS-t és 30 ciklust hajtunk végre, az alábbi paraméterekkel: 94 °C 20 másodpercig, majd 37 °C 30 másodpercig, majd 72 °C 30 másodpercig. A kapott PCR mintát agaróz gélen szétválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk és KpnI valamint BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük majd tisztítjuk. A #1257-21 és #1257-22 szintetikus oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük T4 polinukleotid kinázzal és ATP-vel, majd összekeverjük, 94 °C-ra melegítjük és lassan hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni, hogy kialakuljon egy oligonukleotid linker duplex, amely NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmaz. A #1257-21 és #1257-22 oligonukleotidok között kialakult foszforilezett linker duplexet, amely NdeI és KpnI tapadós végekkel rendelkezik (lásd a 14A. ábrát), valamint a KpnI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és

tisztított PCR terméket, amit a #1257-20 és #1257-19-es oligonukleotid primerekkel állítunk elő, irányítottan beépítjük a pAMG21 plazmid vektor két hasítási helye, azaz az NdeI és BamHI hasítási helyek közé, standard rekombináns DNS technikák alkalmazásával (lásd a 14A. ábrát és az alábbi szekvenciákat). A szintetikus linkerben *Escherichia coli* kodonokat alkalmazunk, és ezzel visszük be az N-terminális metionint is.

Két klónt választunk ki, ezekből plazmid DNS-t izolálunk, majd a humán OPG inszert szekvenciáját DNS szekvenálással ellenőrizzük. A kapott pAMG21 plazmidot, amely tartalmazza a humán OPG polipeptid 32-401-es aminosavait kódoló szekvenciákat, és közvetlenül előtte leolvasási keretben egy metionint, pAMG21-huOPG met [32-401] vagy pAMG21-huOPG met [32-401] jelzéssel láttuk el.

#1257-19 számú oligonukleotid

5'-TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTTATTTTACTGATTGGAC-3'

(59. számú szekvencia)

#1257-20 számú oligonukleotid

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC-3'

(60. számú szekvencia)

#1257-22 számú oligonukleotid

5'-CCGGCGGACATTTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTTCTTCATCCA-3'

(47. számú szekvencia)

Az *Escherichia coli* GM120 pAMG21-huOPG met [32-401] törzs 2XYT 20 µg/ml kanamicint tartalmazó táptalajban készített tenyészeit az indukció előtt 30 °C-on inkubáljuk. A huOPG met [32-401] génterméknek a luxPR promoterról történő indukcióját úgy érjük el, hogy szintetikus autoinducert [N-(3-oxohexanoil)-DL-homoszerin-lakton] adunk a táptalajhoz 30 ng/ml végkoncentrációban, majd a tenyészeteket további 6 óra hosszat vagy 30 °C-on vagy 37 °C-on inkubáljuk. 6 óra elteltével a baktériumtenyészeteket mikroszkóppal átvizsgáljuk, hogy tartalmazznak-e zárványtesteket, majd centrifugálással üleptítjük. Fénytörő zárványtestek figyelhetők meg az indukált tenyészetekben, ami azt mutatja, hogy a rekombináns huOPG met [32-401] géntermékből valamennyi oldhatatlan formában keletkezik *Escherichia coli*-ban. Valamennyi baktérium-üledéket 10 mmol/l TRIS-HCl/pH8, 1 mmol/l EDTA összetételű oldatban szuszpendálunk, majd közvetlenül lizáltatjuk 2X Laemmli

mintapuffer 1X végkoncentrációban való hozzáadásával, β -merkaptoetanol 5% végkoncentrációban való hozzáadásával, majd SDS-PAGE-val elemezzük. Lényegesen erősebb, körülbelül 42 kDa méretű, coomassie festékkel festődő csík figyelhető meg azon az SDS-PAGE gélen, amely a 30 °C-on illetve 37 °C-on tenyésztett, indukált tenyészetek össz-lizátumait tartalmazza, mint a 2-es sávban, amely egy 30 °C-on, indukálás nélkül növesztett tenyész össz-lizátumát tartalmazza (14B. ábra). A várt géntermék 370 aminosav hosszúságú, várt molekulásúlya körülbelül 42,2 kDa. 37 °C-on hat óra hosszat végzett indukálás után egy további tenyészetet ülepítünk, majd a zárványtestek izolálása, vagy mikrofluidizálással irányában dolgozzuk fel. A mikrofluidizáláshoz feldolgozott üledéket 25 mmol/l TRIS-HCl/pH9, 0,5 mol/l nátrium-klorid pufferben szuszpendáljuk, majd hússzor átengedjük egy Microfluidizer Model 1108 (Microfluidics Corp.) berendezésen, majd összegyűjtjük. Egy alikvot részt eltávolítunk az összegyűjtött mintából (mikrofluidizált össz-lizátum), majd a megmaradt anyagot 20,000xg-vel ülepítjük 20 percig. Centrifugálás után eltávolítjuk a felülúszót (mikrofluidizált oldható frakció), majd az üledékek újra szuszpendáljuk 25 mmol/l TRIS-HCl/pH8, 0,5 mol/l nátrium-klorid, 6 mol/l karbamid összetételű oldatban (mikrofluidizált oldhatatlan frakció). Mind az oldható, mind az oldhatatlan frakció alikvot részt azonos térfogatú Laemmli mintapufferhez és 5% végkoncentrációban jelenlevő β -merkaptoetanolhoz adjuk. A mintákat SDS-PAGE-val elemezzük. Jelentős mennyiségű rekombináns huOPG met [32-401] géntermék található az oldhatatlan frakcióban. A rekombináns fehérje zárványtesteinek tisztítását az alábbiak szerint végezzük: a bakteriális sejteket sűrűséggradiens centrifugálással el a táptalajtól, egy JS-4.2 rotorral felszerelt Beckman J-6B centrifugában, 4900 x g-vel, 15 percig 4 °C-on. A bakteriális üledéket 5 ml vízben szuszpendáljuk, majd 10 ml végtérfogatra hígítjuk. Ezt a szuszpenziót jégbehűtött rozsdamentes acél csészébe vesszük át, majd ultrahanggal elroncsoljuk, standard hegyvel felszerelt Branson Sonifier-rel (teljesítmény=5, ciklus=95%, 80 impulzus). Az ultrahanggal besugárzott sejtsuszpenziót egy TLA 100.3 rotorral felszerelt Beckman Optima TLX ultracentrifugával centrifugáljuk, 195000 x g-vel, 5-10 percig, 23 °C-on. A felülúszót előntjük, majd az üledéket mosópalackból vízsugárral öblítjük. Az üledékeket összegyűjtjük, oly módon, hogy egy mikro-spatulával felvakarjuk, majd egy üveg homogenizálóba vesszük át (15 ml a kapacitása). Öt ml Percoll oldatot (75% folyékony Percoll, 0,15

mol/l nátrium-klorid) adunk a homogenizáléhoz, majd tartalmát addig homogenizáljuk, amíg egyenletes szuszpenziót kapunk. A térfogatot 19,5 ml-re növeljük, Percoll oldat hozzáadásával, összekeverjük, majd 3 Beckman Quick-Seal csőbe tesszük (13 x 32 mm). A csöveket a gyártó ajánlásai szerint zárjuk le. A csöveket Beckman TLA 100.3 rotorban centrifugáljuk 23 °C-on, 20000/perc fordulatszámmal (21600 x g), 30 percig. A csöveket átvizsgáljuk, hogy tartalmazznak-e megfelelő csík-mintázatot. A zárványtestek kinyerésére a gradiens frakciókat kinyerjük, összegyűjtjük, majd vízzel hígítjuk. A zárványtesteket centrifugálással üleptítjük, majd SDS-PAGE után meghatározzuk a fehérje-koncentrációt.

A zárványtestek egy alikvot részét az alábbiak szerint izoláljuk, majd 1X Laemmli mintafelvívó pufferben (5% β -merkaptotetanolt tartalmaz) oldjuk, majd SDS-PAGE gélen szétválasztjuk, ezáltal a zárványtestekből erősen tisztított rekombináns huOPG [32-401] génterméket kapunk. A zárványtestek SDS-poliakrilamid gélen való szétválasztása után megfigyelt fő, körülbelül 42 kDa méretű csíkot kivágjuk az elválasztó gélből, majd meghatározzuk az N-terminális aminosav szekvenciát, lényegében Matsudaira és munkatársai leírása szerint [Matsudaira és mtsai: Journal of Biological Chemistry 262, 10-35 (1987)]. 19 ciklus után az alábbi aminosav szekvenciát határoztuk meg:

NH₂-MDEETSHQLLCDKCPPGTY-COOH (62. számú szekvencia)

Ezt a szekvenciát azonosnak találtuk a pAMG21 Hu-OPG met [32-401] expressziós vektor által kódolt első 19 aminosavval, amit a bakteriális expressziós vektor egy metionin csoporttal megfejeelve termel.

C. Humán OPG met [22-401]

Az egy N-terminális metionint és a humán OPG 22-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a luxPR promoter vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. A pAMG21-huOPG met [32-401] izolált plazmid DNS-t (lásd B. szekció) KpnI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd a kapott fragmenseket agaróz gélen választjuk szét. A B fragmenst (köribelül 1064 bázispár méretű fragmens) standard módszerek alkalmazásával izoláljuk a gélből. A #1267-06 és #1267-07 számú szintetikus oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk hogy oligonukleotid linker duplexet képezzenek, amely NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmaz, a B. szekcióban ismertetett módszerek alkalmazásával. A szintetikus linker duplex *Escherichia coli* kodonokat használ, és N-ter-

minális metionint ad a fehérjéhez. Az NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmazó foszforilezett oligonukleotid linkert és a pAMG21-huOPG met [32-401] izolált, körülbelül 1064 bázispár méretű fragmensét KpnI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a huOPG-met [22-401] gén DNS szekvenciáját.

63. számú szekvencia

#1267-06 számú oligonukleotid

5'-TAT GGA AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA
AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3'

64. számú szekvencia

#1267-07 számú oligonukleotid

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT CTT
CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3'

Az *Escherichia coli* 393 pAMG21-huOPG-met [22-401] gazdaszervezet tenyésztését 2XYT táptalajba tesszük, amely 20 µg/ml kanamicint tartalmaz, majd indukálás előtt 30 °C-on inkubáljuk. A rekombináns géntermék expressziójának indukcióját a pAMG21 vektor luxPR promoteréről úgy érjük el, hogy szintetikus autoinducert [n-(3-oxohexanoil)-DL-homoszerin-lakton] adunk a táptalajhoz 30 ng/ml végkoncentrációban, majd további 6 óra hosszat indukáljuk 30 °C-on vagy 37 °C-on. Hat óra elteltével a bakteriális tenyészeteket centrifugálással ülepitjük (=30 °C, I+6 vagy 37 °C I+6). A bakteriális tenyészeteket is vagy közvetlenül az indukció előtt ülepitjük (=30 °C PreI), vagy egy másik megvalósítási mód szerint nem adunk autoinducert egy másik tenyészethez, amit további 6 óra hosszat inkubálunk, így kapunk egy nem-indukált (UI) tenyészetet (=30 °C UI). A 30 °C PreI, 30 °C UI, 30 °C I+6 vagy 37 °C I+6 tenyészeteket szaszpendáljuk, lizáltatjuk, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) elemezzük, a B. szekcióban ismertetett módszer szerint. A poliakrilamid géleket vagy coomassie blue-val festjük és nyúl anti-mu OPG-Fc

poliklonális ellenanyaggal reagáltatjuk, a 10. példában leírtak alapján. Az indukció utáni géntermék szint vagy a nem-indukált (30 °C UI) vagy indukció előtti (30 °C PreI) mintával hasonlítjuk össze.

D. Rágcsáló OPG met [22-401]

Az egy N-terminális metionint és a rágcsáló OPG 22-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a luxPR promoter vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. PCR-t végzünk a #1257-16 és #1257-15 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pRcCMV-Mu OPG DNS mint templát felhasználásával, a B. szekcióban ismertetett PCR ciklusok végrehajtásával. A PCR terméket tisztítjuk, majd KpnI és BamHI restriktációs enzimekkel hasítjuk, a B. szekcióban ismertetett módon. A #1267-61 és #1267-82 számú szintetikus oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk hogy oligonukleotid linker duplexet képezzenek, amely NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmaz, a B. szekcióban ismertetett módszerek alkalmazásával. A szintetikus linker duplex *Escherichia coli* kodonokat használ, és N-terminális metionint ad a fehérjéhez. Az NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmazó, a #1260-61 és #1260-82 oligonukleotidok között létrejött, foszforilezett oligonukleotid linkert és a #1257-16 és #1257-15 oligonukleotidok alkalmazásával előállított, emésztett és tisztított PCR terméket irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombinációs DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a MaOPG-met [22-401] gén DNS szekvenciáját.

A pAMG21-MuOPG met [22-401] plazmidot hordozó 393 sejtek rekombináns muOPG met [22-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

65. számú szekvencia

#1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA
AC-3'

66. számú szekvencia

#1257-16

5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG TG-3'

67. számú szekvencia

#1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA
AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3'

68. számú szekvencia

#1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CCA-3'

E. Rágcsáló OPG met [32-401]

Az egy N-terminális metionint és a rágcsáló OPG 22-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a luxPR promotor vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. A #1267-08 és #1267-09 számú szintetikus oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk hogy oligonukleotid linker duplexet képezzenek, amely NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmaz, a B. szekcióban ismertett módszerek alkalmazásával. A szintetikus linker duplex *Escherichia coli* kodonokat használ, és N-terminális metionint ad a fehérjéhez. Az NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmazó, a #1260-08 és #1260-09 oligonukleotidok között létrejött, foszforilezett oligonukleotid linkert és a #1257-16 és #1257-15 oligonukleotidok alkalmazásával előállított, és a KpnI valamint BamHI restriktációs endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket (leírását lásd az előzőkben, a D. szekcióban) irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [22-401] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó 393 sejtek rekombináns muOPG met [22-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertett módszerrel határozzuk meg.

69. számú szekvencia

#1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG
TGC TCC GGG TAC-3'

70. számú szekvencia

#1267-09

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CTG
GGT CCA-3'

F. Rágcsáló OPG met-lys [22-401]

Az egy N-terminális metionint és azt követően egy lizincsoportot, valamint a rágcsáló OPG 22-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a luxPR promoter vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. A #1282-95 és #1282-96 számú szintetikus oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk hogy oligonukleotid linker duplexet képezzenek, amely NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmaz, a B. szekcióban ismertetett módszerek alkalmazásával. A szintetikus linker duplex *Escherichia coli* kodonokat használ, és N-terminális metionint ad a fehérjéhez. Az NdeI és KpnI tapadós végeket tartalmazó, a #1282-95 és #1282-96 oligonukleotidok között létrejött, foszforilezett oligonukleotid linkert és a D. szekcióban ismertetett, KpnI és BamHI restriktációs endonukleázokkal emésztett, tisztított PCR terméket irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a MaOPG-Met-Lys [22-401] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns plazmidot hordozó 393 sejtek rekombináns pAMG21-MuOPG Met-Lys [22-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

71. számú szekvencia

#1282-95

5'-TAT GAA AGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC
GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-
3'

72. számú szekvencia

#1282-96

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TCA-3'

G. Rágcsáló OPG met-lys-(his)₇[22-401]

Az alábbi N-terminális csoportokat: Met-Lys-His-His-His-His-His-His (=MKH), valamint a rágcsáló OPG 22-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a luxPR promotor vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre az #1300-50 és #1257-15 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-muOPG-met [[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A PCR körülmények azonosak azokkal, amiket a B. szekcióban ismertettünk. A keletkező PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, majd NdeI és BamHI restriktációs endonukleázokkal emésztjük és tisztítjuk. Az NdeI és KpnI enzimekkel emésztett, a #1300-50 és #1257-15 oligonukleotid primerek alkalmazásával létrehozott, tisztított PCR terméket irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-MKH [22-401] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó 393 sejtek rekombináns MuOPG-MKH[22-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

73. számú szekvencia

#1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ATC ACC ATC ATG AAA
CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3'

65. számú szekvencia

#1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA
AC-3'

H. Rágcsáló OPG met-lys [22-401](his)₇

Az N-terminális metionint, a rágsáló OPG 22-401-es aminosavait, valamint a 401-es aminosavat követő hét hisztidincsoportot kódoló DNS szekvenciát (=muOPG MK [22-401]-H₇) a luxPR promoter vezérlése alá helyezzük, a pAMG21 prokarióta plazmid expressziós vektorban, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre az #1300-49 és #1300-51 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-muOPG-met [[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A PCR körülmények azonosak azokkal, amiket a B. szekcióban ismertettünk. A keletkező PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, majd NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük és tisztítjuk. Az NdeI és KpnI enzimekkel emésztett, tisztított PCR terméket irányítottan klónozzuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-MK [22-401]-H₇ gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns MuOPG-MK [22-401]-H₇ polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

74. számú szekvencia

#1300-49

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3'

75. számú szekvencia

#1300-51

5'-TAC GCA CTG GAT OCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGA TGT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT GTA ACC TGA TTC CCT A-3'

I. Rágsáló OPG met[27-401]

A rágsáló OPG 27-401-es aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre a #1309-74 és #1257-15 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A polimeráz láncreakció körülményei megegyeznek a B.

szekcióban leírtakkal. A kapott PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd ismét tisztítjuk. Az NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket irányítottan inszertáljuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [27-401] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns MuOPG-met [27-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

76. számú szekvencia

#1309-74

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG
GTC AT-3'

65. számú szekvencia

#1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA
AC-3'

J. Humán OPG met[27-401]

A humán OPG 27-401-es aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre a #1309-75 és #1309-76 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-huOPG-met[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A polimeráz láncreakció körülményei megegyeznek a B. szekcióban leírtakkal. A kapott PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, AseI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd ismét tisztítjuk. Az AseI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket irányítottan inszertáljuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva.

Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a huOPG-met [27-401] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns huOPG-met [27-401] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

77. számú szekvencia

#1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT GAA GAA ACT T-3'

78. számú szekvencia

#1309-76

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT GAT T-3'

K. Rágcsáló OPG met[22-180]

A rágcsáló OPG 22-180-as aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre a #1309-72 és #1309-73 oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A polimeráz láncreakció körülményei megegyeznek a B. szekcióban leírtakkal. A kapott PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd ismét tisztítjuk. Az NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket irányítottan inszertáljuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [22-180] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns muOPG-met [22-180] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

79. számú szekvencia

#1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3'

80. számú szekvencia

#1308-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA ATT AGC A-3'

L. Rágcsáló OPG met[27-180]

A rágcsáló OPG 27-180-as aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. PCR-t hajtunk végre a #1309-74 (lásd az I. szekciót) és #1309-73 (lásd a K. szekciót) oligonukleotidok mint primerek, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] DNS mint templát alkalmazásával. A polimeráz láncreakció körülményei megegyeznek a B. szekcióban leírtakkal. A kapott PCR mintát agaróz gélen elválasztjuk, a PCR terméket kivágjuk, tisztítjuk, NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd ismét tisztítjuk. Az NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket irányítottan inszertáljuk a pAMG21 NdeI és BamHI hasítási helyére, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [27-180] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns muOPG-met [27-180] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

M. Rágcsáló OPG met[22-189] és met [22-194]

A rágcsáló OPG 22-189 vagy 22-194-es aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor luxPR promoterének szabályozása alá helyezzük. A #1337-92 és #1337-93 (=muOPG-189 linker) vagy a #1337-57 és #1333-58 (=muOPG-194 linker) szintetikus oligonukleotid párokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk kialakulni az oligonukleotid linker duplex párokat, a B. szekcióban alkalmazott módszerek alkalmazásával. A pAMG21-muOPG-met[22-401] tisztított plazmid DNS-t KpnI és BspEI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd a kapott DNS fragmenseket agaróz gélen választjuk szét. A körülbelül 413 bázispár méretű B fragmenst standard rekombináns DNS technikával izoláljuk. A #1337-92 és #1337-93 oligonukleotidokból (muOPG-189 linker) vagy a #1337-57 és #1333-58 oligonukleotidokból (muOPG-194 linker) kialakult foszfori-

lezett linker duplexeket, amelyek BspEI és BamHI tapadós végeket tartalmaznak, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] plazmid B fragmensét KpnI és BspEI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan beszúrjuk a pAMG21-muOPG met[22-401] KpnI és BamHI hasítási helyeire, standard módszereket alkalmazva. Mindegyik ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [22-189] vagy a muOPG-met[22-194] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns muOPG-met [22-189] vagy muOPG-met[22-194] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

81. számú szekvencia

#1337-92

5'-CCG GAA ACA GAT AAT GAG-3'

82. számú szekvencia

#1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3'

83. számú szekvencia

#1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CA CGC AAA AGT AAG-3'

84. számú szekvencia

#1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGA GTG GCT TCT CTG TTT-3'

N. Rágcsáló OPG met [27-189] és met [27-194]

A rágcsáló OPG 27-189 vagy 27-194-es aminosavait és egy N-terminális methionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor luxPR promoterének szabályozása alá helyeztük. A "muOPG-189 linker" vagy a "muOPG-194 linker" foszforilezett linker duplexeket, (lásd az M. szekciót) amelyek BspEI és BamHI tapadós végeket tartalmaznak, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] plazmid körülbelül 413 bázispár méretű B fragmensét KpnI és BspEI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan beszúrjuk a pAMG21-muOPG

met[22-401] KpnI és BamHI hasítási helyeire, standard módszereket alkalmazva. Mindegyik ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a muOPG-met [27-189] vagy a muOPG-met[27-194] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns muOPG-met [27-189] vagy muOPG-met[27-194] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

O. Humán OPG met [22-184], met[22-189], met [22-194]

A humán OPG polipeptid 22-185, 22-189, vagy 22-194-es aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor luxPR promoterének szabályozása alá helyezzük. A #1331-87 és #1331-88 (=huOPG-185 linker), a #1331-89 és #1331-90 (=huOPG-189 linker), vagy a #1331-91 és #1331-91 (=huOPG-194 linker) szintetikus oligonukleotid párokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk kialakulni az oligonukleotid linker duplex párokat, a B. szekcióban alkalmazott módszerek alkalmazásával. A pAMG21-muOPG-met[22-401] tisztított plazmid DNS-t KpnI és NdeI restriktációs endonukleázokkal hasítjuk, majd a kapott DNS fragmenseket agaróz gélen választjuk szét. A körülbelül 407 bázispár méretű B fragmenst standard rekombináns DNS technikával izoláljuk. A #1331-87 és #1331-88 oligonukleotidokból (huOPG-185 linker), a #1331-89 és #1331-90 oligonukleotidokból (huOPG-189 linker) vagy a #1331-91 és #1331-92 oligonukleotidokból (huOPG-194 linker) kialakult foszforilezett linker duplexeket, amelyek NdeI és BamHI tapadós végeket tartalmaznak, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] plazmid körülbelül 407 bázispár méretű B fragmensét KpnI és NdeI restriktációs endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan beszúrjuk a pAMG21-muOPG met[22-401] KpnI és BamHI hasítási helyeire, standard módszereket alkalmazva. Mindegyik ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a huOPG-met [22-184] vagy a huOPG-met[22-189] vagy a huOPG-met[22-194] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns huOPG-met [22-185], huOPG-met[22-189] vagy huOPG-met[22-194] polipep-

tidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

85. számú szekvencia

#1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG-3'

86. számú szekvencia

#1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3'

87. számú szekvencia

#1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3'

88. számú szekvencia

#1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3'

89. számú szekvencia

#1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC AAA AAT AAG-3'

90. számú szekvencia

#1331-92

5'-GAT CCT TAT TTT TGA GTT GAT TCA CTG TTT CCG GAA CA-3'

P. Humán OPG met [27-185], met [27-189], met [27-194]

A humán OPG polipeptid 27-185, 27-189, vagy 27-194-es aminosavait és egy N-terminális metionint kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 prokarióta expressziós vektor luxPR promoterének szabályozása alá helyezzük. A "huOPG-185 linker", a "huOPG-189 linker", vagy a "huOPG-194 linker" szintetikus oligonukleotid párokat, amelyek NdeI és BamHI tapadós végeket tartalmaznak, valamint a pAMG21-muOPG-met[22-401] plazmid körülbelül 407 bázispár méretű B fragmensét (lásd az O. szekciót) KpnI és NdeI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd irányítottan beszúrjuk a pAMG21-muOPG met[22-401] (lásd a J. szekciót) KpnI és BamHI hasítási helyeire, standard módszereket alkalmazva. Mindegyik ligáló elegyet elektroporációval *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk, a gyártó által megadott leírást használva. Klónokat szelektálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd

DNS szekvenálást végzünk, hogy igazoljuk a huOPG-met [27-185], a huOPG-met[27-189] vagy a huOPG-met[27-194] gén DNS szekvenciáját.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393 sejtek rekombináns huOPG-met [27-185], huOPG-met[27-189] vagy huOPG-met[22-194] polipeptidjének az expresszióját az indukció után a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

O. Rágcsáló OPG met[27-401] (P33E, G36S, A45P)

Egy N-terminális metionint, a humán OPG 27-48-as aminosavait és a rágcsáló OPG 49-401-es aminosavait kódoló DNS szekvenciát a pAMG21 expressziós vektor lux PR promoterének szabályozása alá helyezzük. A tisztított pAMG21-huOPG-met [27-401] plazmid DNS-t (lásd a J. szekciót) AatII és KpnI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd agaróz gélből izoláljuk a körülbelül 1075 bázispár méretű B fragmenst, standard rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. Emellett a pAMG21-muOPG-met[22-401] plazmidot KpnI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd a körülbelül 1064 bázispár méretű B fragmenst az előzőekben ismertetett módon izoláljuk. Az izolált körülbelül 1075 bázispár méretű pAMG21-huOPG-met [27-401] restrikciós fragmenst, amely AatII és KpnI tapadós végeket tartalmaz (lásd az előzőekben), a körülbelül 1064 bázispár méretű pAMG21-muOPG-met[22-401] restrikciós fragmenst, amely KpnI és BamHI tapadós véget tartalmaz, és egy körülbelül 5043 bázispár méretű restrikciós fragmenst, amely AatII és BamHI tapadós végeket tartalmaz, és megfelel a pAMG21 AatII és BamHI hasítási helyei közötti nukleinsav szekvenciának, standard rekombináns DNS módszerekkel összeligáljuk. A ligáló elegyet *Escherichia coli* 393 gazdaszervezetbe transzformáljuk elektroporációval, a gyártó által ajánlott eljárást alkalmazva. Klónokat szelektálunk, majd a rekombináns inszertnek a plazmidban való jelenlétét standard DNS módszerekkel igazoljuk. muOPG-27-401 (P33E, G36S, A45P) gén. A muOPG-ben elvégzett prolin-33 → glutaminsav-33, glicin-36 → szerin-36 és alanin-45 → prolin-45 aminosav cseréknek az az eredménye, hogy a muOPG 27-48-as csoportjait a huOPG 27-48-as aminosavaira cseréljük le.

A rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó, transzformált 393-as sejtekben a rekombináns muOPG-met [27-401] (P33E, G36S, A45P) expresszióját a C. szekcióban ismertetett módszerrel határozzuk meg.

R. Rágcsáló OPG met-lys-(his)₇-ala-ser-(asp)₄-lys [22-401] (A45T)

Egy N-terminális His jelzést és enterokináz felismerési szekvenciát (az N-terminálistól a C-terminálisig): Met-Lys-His-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (=HEK), amit a rágcsáló OPG polipeptid 22-401-es aminosavai követnek, kódoló DNS szekvenciát a Ps4 promotor által szabályozott *lac* represszor szabályozása alá helyezzük, az alábbiak szerint. A pAMG22-His plazmidot (lásd az A. szekciót) NheI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd a nagy fragmenst (az A fragmenst) agaróz gélből izoláljuk, standard rekombináns DNS módszereket alkalmazva. A #1282-91-es és #1282-92-es oligonukleotidokat egyenként foszforilezzük, majd hagyjuk hogy oligonukleotid linkert képezzenek, a korábban ismertetett módszer alkalmazásával (lásd a B. szekciót). A #1282-91-es és #1282-92-es oligonukleotidok által képzett foszforilezett linker duplexet, amely NheI és KpnI tapadós végekkel rendelkezik, a KpnI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett és tisztított PCR terméket (lásd a D. szekciót), valamint a pAMG22-His vektor NheI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztett A fragmensét standard rekombináns DNS módszerekkel ligáljuk. A ligáló elegyet *Escherichia coli* GM120 gazdaszervezetbe transzformáljuk elektroporációval, a gyártó által ajánlott leírást alkalmazva Klónokat szerinttálunk, plazmid DNS-t izolálunk, majd DNS szekvenálást végzünk hogy igazoljuk a muOPG-HEK [22-401] gén DNS szekvenciáját. A DNS szekvenálással egy hibás mutációt fedeztünk fel a természetes muOPG szekvenciában, aminek az eredménye egyetlen aminosav csere (alanin-45 → treonin-45) a muOPG polipeptidben.

Meghatározzuk a rekombináns pAMG21 plazmidot hordozó Gm120 sejtekben a rekombináns muOPG-HEK[22-401] (A45T) expresszióját, a C. szekcióban leírtakhoz hasonló módszerekkel, azzal az eltéréssel, hogy a szintetikus autoinducer hozzáadása mellett 0,4 mmol/l végkoncentrációjú IPTG-t adunk hozzá az indukció elérése céljából.

91. számú szekvencia

#1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACG ACA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC
TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT GTG ATA AAT
GTG CTC CGG GTA C-3'

92. számú szekvencia

#1282-92

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TGT CGT CGT
CGT CG-3'

S. Humán OPG met-arg-gly-ser-(his)₆ [22-401]

Nyolc oligonukleotidot terveztünk (1338-09-től 1338-16-ig) egy 175 bázispárból álló, átlapoló, kétszálú DNS előállításához. Az oligonukleotidokat egymáshoz illesztjük, ligáljuk, majd az 5' és 3' oligonukleotidokat használjuk PCR primerként nagy mennyiségű 175 bázispár méretű fragmens előállításához. A PCR végterméket ClaI és KpnI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, így egy olyan fragmenst kapunk, amellyel a humán OPG 28 N-terminális kodonját lehet helyettesíteni. A ClaI és KpnI restrikciós endonukleázokkal helyettesített PCR terméket a szintén ClaI és KpnI restrikciós endonukleázokkal emésztett pAMG21-huOPG [27-401] plazmidba építjük be. A ligált DNS-t kompetens *Escherichia coli* 393 gazdasejtekbe transzformáljuk. A keletkező klónokat átvizsgáljuk, hogy képesek-e termelni a rekombináns fehérjeterméket, és tartalmazzák-e a helyen nukleinsav szekvenciával rendelkező génfüziót. A fehérje expressziós szintjét 50 ml-es rázott lombikos kísérletekkel határozzuk meg. A teljes sejt lizátumokban és az ultrahangos besugárzással kapott üledekben vizsgáljuk a konstrukció expresszióját, Coomassie blue festékkel festett PAGE géleken, valamint Western blot elemzéssel, rágszáló anti-OPG ellenanyagot használva erre a célra. A huOPG Met-Arg-Gly-Ser-(His)₆ [22-401] expressziója következtében nagy zárványtestek keletkeznek, és a fehérjét az oldhatatlan (üledék) frakcióban lehet lokalizálni).

93. számú szekvencia

#1338-09

ACA AAG ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA

94. számú szekvencia

#1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT CGC
ATC AC

95. számú szekvencia

#1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC GAC
GAA GA

96. számú szekvencia

#1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC CCA
AAC A

97. számú szekvencia

#1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT

98. számú szekvencia

#1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT CGT AGT GCA GGT ATT
TCG GC

99. számú szekvencia

#1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA TTT
TAT T

100. számú szekvencia

#1338-16

CCT CCT TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT GTG
TTT GT

T. Humán OPG met-lys [22-401] és met(lys)₃ [22-401]

A humán OPG [22-401] met-lys és a met-(lys)₃ verzióinak előállításához átlapoló oligonukleotidokat tervezünk, hogy a megfelelő számú lizincsoportot adjuk hozzájuk. Az első PCR reakcióban a templát a humán OPG 22-401 gént tartalmazó plazmid DNS készítmény. Az első PCR-rel adjuk hozzá a lizin csoporto(ka)t. A második PCR-ben használjuk az első PCR terméket, és az első restrikciós hasítási helyig, a ClaI-ig terjedő szekvenciákat adunk hozzá.

A végső PCR géntermékeket ClaI és KpnI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, ami a huOPG 28 N-terminális kodonját helyettesíti, majd a pAMG21-hu OPG [27-401] plazmidba ligáljuk, amit szintén megemésztettünk a két említett restrikciós endonukleázzal. A ligált DNS-t kompetens *Escherichia coli* 393 sejtekbe

transzformáljuk. A keletkező klónokat átvizsgáljuk, hogy képesek-e termelni a rekombináns fehérjeterméket, és tartalmazzák-e a helyes nukleinsav szekvenciával rendelkező génfüziót. A fehérje expressziós szintjét 50 ml-es rázott lombikos kísérletekkel határozzuk meg. A teljes sejt lizátumokban és az ultrahangos besugárzással kapott üledékben vizsgáljuk a konstrukció expresszióját, Coomassie blue festékkel festett PAGE géleken, valamint Western blot elemzéssel, rágsáló anti-OPG ellenanyagot használva erre a célra. Egyik konstrukcióval sem kaptuk a fehérje expresszió kimutatható szintjét, és zárványtestek sem láthatók. A DNS szekvenciákat szekvenálással igazoljuk.

A Met-Lys huOPG [22-401] előállítására használt oligonukleotid primerek:

101. számú szekvencia

#1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA
GGA GGA ATA AAA TG

102. számú szekvencia

#1338-18

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAG AAA CTT TTC CTC CAA AAT
ATC

103. számú szekvencia

#1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C

A met-(Lys)₃-huOPG [22-401] előállítása során használt oligonukleotid primerek:

104. számú szekvencia

#1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA
GGA GGA ATA AAA TG

105. számú szekvencia

#1338-19

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAA AAA AAG AAA CTT TTC CTC
CAA AAT ATC

106. számú szekvencia

#1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C

U. Humán és rágszáló OPG [22-401]/Fc fúziók

Négy OPG-Fc fúziót hoztunk létre, amelyekben a humán IgG1 Fc régióját humán vagy rágszáló Osteoprotegerin 22-401-es aminosavai N-terminálisán (ezt a továbbiakban Fc/OPG [22-401] néven említjük), vagy a C-terminálisán (ezt a továbbiakban OPG [22-401]/Fc néven említjük) fuzionáltatjuk. Az Fc fúziókat a 7. példában ismertetett pFc-A3 fúziós vektorral készítjük el.

Mindegyik fúziós gént standard PCR technikával állítunk elő. A PCR reakciókhoz a megcélzott géneket tartalmazó plazmid készítményeket használjuk templátként. Átfedő oligonukleotidokat terveztünk, amelyekkel az egyik gén C-terminális részét kombináljuk a másik gén N-terminális részével. Ez az eljárás lehetővé teszi, hogy a két gént helyes leolvasási fázisban fuzionáltassuk, a megfelelő PCR reakciók végrehajtása után. Induláskor az egyes gének egyik "fúziós" oligonukleotidját tesszük a PCR reakcióelegybe, a megcélzott gént hordozó vektor egy univerzális primerjével. A komplementer "fúziós" oligonukleotidot használjuk egy univerzális primerrel együtt a Másik gén PCR reakciójában. Ennek az első PCR reakciónak a végén két külön terméket kapunk, amelyekben az egyes génekben megvan a fúziós hely, elegendő átfedést hozva létre ahhoz, hogy a második PCR-t végre lehessen hajtani, és a kívánt fúziót létre lehessen hozni. A második PCR reakcióban az első két PCR terméket kombináljuk az univerzális primerekkel és az átfedő régiókon keresztül a teljes hosszúságú DNS szekvenciát elő lehet állítani.

A végső PCR géntermékeket XbaI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd a pAMG21 vektorba ligáljuk, amit előzőleg szintén megemésztettünk az említett két restrikciós endonukleázzal. A ligált DNS-t kompetens *Escherichia coli* 393 sejtekbe transzformáljuk. A keletkező klónokat átvizsgáljuk, hogy képesek-e termelni a rekombináns fehérjeterméket, és tartalmazzák-e a helyes nukleinsav szekvenciával rendelkező génfúziót. A fehérje expressziós szintjét 50 ml-es rázott lombikos kísérletekkel határozzuk meg. A teljes sejt lizátumokban és az ultrahangos besugárzással kapott üledékben vizsgáljuk a konstrukció expresszióját, Coomassie blue festékkel festett PAGE géleken, valamint Western blot elemzéssel, rágszáló anti-OPG ellenanyagot használva erre a célra.

Fc/huOPG [22-401]

Az Fc/huOPG [22-401] fúzióss peptid expresszióját Coomassie blue festékkel festett PAGE gélen, valamint Western blottal mutatjuk ki. A sejtek nagyon nagy zárványtesteket tartalmaznak, és a termék legnagyobb része az oldhatatlan (üledék) frakcióban található. Az alábbi primereket használjuk ennek az OPG-Fc fúzióknak az előállítására:

107. számú szekvencia

#1318-48

CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TT

108. számú szekvencia

#1318-49

CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG CGT GT

Fc/muOPG [22-401]

A fúziós peptid expresszióját Coomassie blue festékkel festett PAGE gélen, valamint Western blottal mutatjuk ki. A sejtek nagyon nagy zárványtesteket tartalmaznak, és a termék legnagyobb része az oldhatatlan (üledék) frakcióban található. Az alábbi primereket használjuk ennek az OPG-Fc fúzióknak az előállítására:

109. számú szekvencia

#1318-50

CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT ACC TGC

110. számú szekvencia

#1318-51

CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT

muOPG [22-401]/Fc

A fúziós peptid expresszióját Coomassie blue festékkel festett PAGE gélen, valamint Western blottal mutatjuk ki. A keletkező rekombináns termék mennyisége mint azoknak az OPG fúziós fehérjéknek az esetében, amelyeknek az Fc régiója az N-terminális pozícióban található. Nyilvánvaló zárványtestek nem mutathatók ki, és a

termék legnagyobb része az oldhatatlan (üledék) frakcióban található. Az alábbi primereket használjuk ennek az OPG-Fc fúzióknak az előállítására:

111. számú szekvencia

#1318-54

GAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC

112. számú szekvencia

#1318-55

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G

huOPG [22-401]/Fc

A fúziós peptid expresszióját nem lehetett Coomassie blue-val festett gélen kimutatni, jóllehet egy gyenge Western pozitív jel kimutatható. Nyilvánvaló zárványtestek nincsenek jelen. Ennek az OPG-Fc fúzióknak az előállítására az alábbi primereket alkalmazzuk:

113. számú szekvencia

#1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC

114. számú szekvencia

#1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG

V. Hamán OPG met [22-401]-Fc fúzió (P25A)

Ebben a konstrukcióban egy, a 25-ös pozícióban végrehajtott prolin → alanin aminosav cserét kombinálunk a huOPG met [22-401]-Fc fúzióval. A plazmidot ClaI és KpnI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, amivel a gén N-terminálisáról 28 kodont távolítunk el, majd a kapott kis (200 bázispárnál kisebb méretű) fragmenst gélen tisztítjuk. Ezt, a prolin → alanin cserét tartalmazó fragmenst azután az említett két restrikciós endonukleázzal emésztett pAMG21-huOPG [22-401]-Fc fúziós plazmidba ligáljuk. A ligált DNS-t kompetens *Escherichia coli* 393 sejtekbe transzformáljuk. A keletkező klónokat átvizsgáljuk, hogy képesek-e termelni a rekombináns fehérjeterméket, és tartalmazzák-e a helyes nukleinsav szekvenciával rendelkező

génfüziót. A fehérje expressziós szintjét 50 ml-es rázott lombikos kísérletekkel határozzuk meg. A teljes sejt lizátumokban és az ultrahangos besugárzással kapott üledekben vizsgáljuk a konstrukció expresszióját, Coomassie blue festékkel festett PAGE géleken, valamint Western blot elemzéssel, rágesáló anti-OPG ellenanyagot használva erre a célra. A fúziós fehérje expressziós szintje a Coomassie blue festékkel festett PAGE gélén és a Western bloton is kimutatható. A fehérje az oldhatatlan (üledék) frakcióban található. A sejtekben nagy zárványtestek találhatók.

W. Humán OPG met [22-401] (P25A)

A humán OPG 22-401-es aminosavait egy N-terminális metioninnal együtt kódoló, és a 25-ös pozícióban levő prolin helyett alanint kódoló DNS szekvenciát, amely a pAMG21 prokarióta expressziós vektorban a luxPR promotor szabályozása alatt áll, az alábbiak szerint állítjuk elő: A #1289-84 és #1289-85 szintetikus oligonukleotidokat egymáshoz illesztjük, így kapunk egy oligonukleotid linker duplexet, amely XbaI és KpnI tapadós végeket tartalmaz. A szintetikus linker duplex optimális *Escherichia coli* kodonokat tartalmaz, és egy N-terminális metionint kódol. A linker tartalmaz még egy SpeI restrikciós hasítási helyet, amely nincs jelen az eredeti szekvenciában. A linker duplexet irányítottan szűrjük be a pAMG21-huOPG-22-401 plazmid XbaI és KpnI hasítási helyeire, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet *Escherichia coli* GM221 gazdaszervezetbe juttatjuk be transzformációval. A klónokat először átvizsgáljuk, hogy termelik-e a rekombináns fehérjét. A pozitív klónokból plazmid DNS-t izolálunk, és DNS szekvenálást végzünk a HuOPG-Met [22-401](P25A) gén DNS szekvenciájának igazolására. Az alábbi oligonukleotidokat használjuk az XbaI-KpnI linker készítésére:

115. számú szekvencia

#1289-84

CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC AAA ATA TCT
TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG
TCC GCC GGG TAC-3'

116. számú szekvencia

#1289-85

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC TAG TTT CTT
CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG CAA AAG TTT CCA TAT GTT ATT
CCT CCT T-3'

X.Humán OPG met [22-401] (P26A) és (P26D)

A humán OPG 22-401-es aminosavait egy N-terminális metioninnal együtt kódoló, és a 26-os pozícióban levő prolin helyett alanint kódoló DNS szekvenciát, amely a pAMG21 prokarióta expressziós vektorban a luxPR promoter szabályozása alatt áll, az alábbiak szerint állítjuk elő: A #1289-86 és #1289-87 szintetikus oligonukleotidokat egymáshoz illesztjük, így kapunk egy oligonukleotid linker duplexet, amely XbaI és SpeI tapadós végeket tartalmaz. A szintetikus linker duplex optimális *Escherichia coli* kodonokat tartalmaz, és egy N-terminális metionint kódol. A linker duplexet irányítottan szűrjük be a pAMG21-huOPG-22-401 plazmid XbaI és SpeI hasítási helyeire, standard módszerek alkalmazásával. A ligáló elegyet *Escherichia coli* GM221 gazdaszervezetbe juttatjuk be transzformációval. A klónokat először átvizsgáljuk, hogy termelik-e a rekombináns fehérjét. A pozitív klónokból plazmid DNS-t izolálunk, és DNS szekvenálást végzünk a HuOPG-Met [22-401](P26A) gén DNS szekvenciájának igazolására. A szekvenált klónok közül az egyikben a 26-os pozícióban levő prolint alanin helyett aszparaginsav helyettesíti, és ennek a klónnak a huOPG-met [22-401] (P26D) jelzést adtuk. Az alábbi oligonukleotidokat használjuk az XbaI-SpeI linker készítésére:

117. számú szekvencia

#1289-86

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC TGC TAA ATA
TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA-3'

118. számú szekvencia

#1289-87

5'-CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA GGA AAA GTT
TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT-3'

Y. Humán OPG met [22-194] (P25A)

A humán OPG 22-194-es aminosavait egy N-terminális metioninnal együtt kódoló, és a 25-ös pozícióban levő prolin helyett alanint kódoló DNS szekvenciát, amely a pAMG21 prokarióta expressziós vektorban a luxPR promoter szabályozása alatt áll, az alábbiak szerint állítjuk elő: A pAMG21-huOPG [27-194] és a pAMG21-huOPG [22-401] (P25A) plazmidot KpnI és BamHI restrikciós endonukleázzal emésztjük. A 450 bázispár méretű fragmenst izoláljuk, a pAMG21-huOPG [27-194] plazmidból, és a 6,1 kilobázis méretű fragmenst izoláljuk a pAMG21-huOPG [27-401] (P25A) plazmidból. Ezeket a fragmenseket összeligáljuk, majd a ligáló elegyet *Escherichia coli* GM221 gazdaszervezetbe juttatjuk be transzformációval. A klónokat először átvizsgáljuk, hogy termelik-e a rekombináns fehérjét. A pozitív klónokból plazmid DNS-t izolálunk, és DNS szekvenálást végzünk a HuOPG-Met [22-194](P25A) gén DNS szekvenciájának igazolására.

9. Példa

Az OPG tisztítása

A. Az emlős OPG-Fc fúziós fehérjék tisztítása

Az OPG—Fc fúziós fehérjét expresszáló 293-as sejtekkel előállított 5 liter kondicionált táptalajt az alábbiak szerint állítjuk elő. Mélyhűtve tárolt sejteket 10 ml 293S táptalajban (DMEM-nagy koncentrációjú glükóz, 1X L-glutamin, 10% hővel inaktivált borjúmagzat szérum (FBS) és 100 µg/ml higromicin) olvasztjuk fel, majd egy nap elteltével friss táptalajt adunk hozzá. Három nap elteltével a sejteket két T175 lombikba osztjuk szét, 1:10 és 1:20 hígításban. Két további 1:10 arányú megosztást végzünk, hogy 200 T175 lombikot készítsünk. Ennél a pontnál a sejtek a megolvasztás után 5 nappal voltak. A sejteket közel összenövésig szaporítjuk (körülbelül 3 nap), ekkor a szérumot tartalmazó táptalajt leszívjuk, a sejteket egyszer mossuk lombikonként 25 ml PBS-sel és 25 ml SF táptalajt (DMEM-magas koncentrációjú glükóz, 1X L-glutamin) adunk mindegyik lombikhoz. A sejteket 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában tartjuk három napig, mikoris a táptalajt összegyűjtjük, centrifugáljuk, majd 0,45 µm-es cellulóz-nitrát szűrőlapokon bocsátjuk át (Corning).

Az OPG-Fc fúziós fehérjét Protein G Sepharose oszlopon (Pharmacia) tisztítjuk, amit PBS-sel hozunk egyensúlyba. Az oszlop mérete a kiindulási anyag térfogatától függ. Az előzőekben ismertetett módon készített kondicionált táptalajt az oszlopra töltjük, az oszlopot PBS-sel mossuk, majd a tiszta fehérjét 100 mmol/l glicinnel (pH=2,7) oldjuk le az oszlopról. A frakciókat 1 mol/l TRIS-t (pH=9,2) tartal-

mazó csövekbe vesszük, azért, hogy a lehető leggyorsabban semlegesítsük. A fehérjetartalmú frakciókat egyesítjük, töményítjük, vagy Amicon Centricon 10 vagy Centriprep 10 berendezéssel, majd PBS-be diafiltráljuk. A tiszta fehérjét -80°C -on tároljuk.

Ezzel az eljárással rágsáló [22-401]-Fc-t, rágsáló [22-180]-Fc-t, rágsáló [22-194]-Fc-t, rágsáló [22-185]-Fc-t, humán [22-401]-Fc-t és humán [22-201]-Fc-t tisztítunk.

Szokványos kromatográfia

CHO sejtek kondicionált táptalaját 23-szorosra töményítjük egy Amicon spirál berendezésben (S10Y10), majd 20 mmol/l TRIS-be ($\text{pH}=8,0$) diafiltráljuk. A diafiltrált táptalajt azután egy Q-Sepharose HP (Pharmacia) oszlopra visszük, amit 20 mmol/l TRIS-szel ($\text{pH}=8,0$) hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot azután addig mossuk, amíg a 280 nm-en mért abszorbanciája eléri az alapértéket. A fehérjét 20 oszloptérfogatnyi gradienssel (0-300 mmol/l nátrium-klorid, TRIS-ben ($\text{pH}=8,0$)). Az OPG fehérjét az oszlop-frakciók Western blotjával mutatjuk ki.

Az OPG-t tartalmazó frakciókat egyesítjük, majd 300 mmol/l nátrium-klorid, 0,2 mmol/l DTT végkoncentrációt állítunk be. Egy NINTA superose (Qiagen) oszlopot 20 mmol/l TRIS ($\text{pH}=8,0$), 300 mmol/l nátrium-klorid, 0,2 mmol/l DTT összetételű oldattal hozzuk egyensúlyba, majd az egyesített frakciókat az oszlopra visszük. Az oszlopot addig mossuk az egyensúlyba hozó pufferrel, ameddig elérjük az alapvonal értéket. A fehérjéket az oszlopról 0-30 mmol/l egyensúlyba hozó pufferben készült imidazol gradienssel oldjuk le. A megmaradt fehérjéket 1 mol/l imidazzal mossuk le. Ismét Western blottot használunk az OPG-t tartalmazó frakciók kimutatására.

A NINTA oszlopról lejtött, egyesített frakciókat 10 mmol/l kálium-foszfát ($\text{pH}=7,0$), 0,2 mmol/l DTT összetételű oldatba dializáljuk. A dializált poolt azután kerámia hidroxipatit oszlopra (Bio-Rad) visszük, amit előzőleg 10 mmol/l foszfát pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlop mosása után a fehérjét 20 oszloptérfogat 10-100 mmol/l kálium-foszfát gradienssel eluáljuk. Ezt követi azután 20 oszloptérfogat 100-400 mmol/l foszfát gradiens.

Az OPG-t SDS-poliakrilamid gélek Coomassie blue festékkel való festésével és Western blottal mutatjuk ki. A frakciókat egyesítjük, majd PBS-be diafiltráljuk és -

80 °C-on tároljuk. A tisztított fehérjék monomer formában futnak, és a PBS-be való diafiltrálás után is monomerek maradnak. A monomer akkor stabil, ha lefagyasztva, vagy pH=5 mellett 4 °C-on tároljuk. Ha azonban 4 °C-on PBS-ben tároljuk, akkor egy hét alatt dimerek, majd trimerek és tetramerek képződnek.

B. A humán OPG met [22-401] tisztítása *Escherichia coli*-ből

A bakteriális sejttömeget 10 mmol/l EDTA-ban szuszpendáljuk 15 tömeg/térfogat %-ban, alacsony nyíróerejű homogenizátort használva 5 °C-on. A sejteket azután két homogenizálással tárjuk fel (103 Mpa, 5 °C). A kapott homogenizátumot 5000 x g-vel centrifugáljuk egy óra hosszat, 5 °C-on. A centrifugálás során kapott üledéket kis nyíróerejű vízbe való homogenizálással mossuk az eredeti homogenizációs térfogattal, majd az előzőek szerint centrifugáljuk. A mosott üledéket azután 30 percig szobahőmérsékleten 15 tömeg/térfogat %-ban szolubilizáljuk 6 mol/l guanidin-HCl, 10 mmol/l ditiotritol, 10 mmol/l TRIS-HCl (pH=8,5) összetételű pufferben. Ezt az oldatot harmincszorosra hígítjuk 50 mmol/l CAPS-ot (pH=10,5), 1 mmol/l redukált glutationt tartalmazó 2 mol/l koncentrációjú karbamid oldatban, majd 72 óra hosszat 5 °C-on kevertetjük. Az OPG-t 25 °C-on úgy tisztítjuk ebből az oldatból, hogy a pH-ját először ecetsavval 4,5-re állítjuk, majd SP-HP Sepharose gyantából készült oszlopon kromatografáljuk, amely oszlopot előzőleg 25 mmol/l nátrium-acetáttal (pH=4,5) hoztunk egyensúlyba. Az oszlop eluálását lineáris nátrium-klorid gradienssel (50-550 mmol/l) végezzük, ugyanebben a pufferben, 20 oszloptérfogatot használva 0,1 oszloptérfogat/perc sebességgel. A csak a kívánt OPG formát tartalmazó csúcsfrakciókat egyesítjük, majd 5 °C-on tároljuk, vagy foszfáttal puffereelt sóoldatra cseréljük a puffert, ultraszűrővel töményítjük, majd 5 °C-on tároljuk. Ezt az anyagot fordított fázisú HPLC-vel, SDS-PAGE-val, limulus amebocita lizátum esszéivel vizsgáljuk endotoxin jelenlétében, valamint N-terminális szekvenálással. Emellett különböző technikák, azaz például tömespektrometria, pH/hőmérséklet stabilitás, fluoreszcencia, cirkuláris dikroizmus, differenciális pásztázó kalorimeria és proteáz profil esszé is használható a fehérje térszerkezetének vizsgálatára.

10. Példa

A rekombináns OPG biológiai aktivitása

A hisztológia és a hisztomorfometria alapján úgy tűnik, hogy az OPG hepatikus túlexpressziója transzgenikus egerekben a csontszövet jelentős növekedését eredményezi (lásd 4. ábra). Ennek az *in vivo* hatásnak a potenciális mechanizmusába való további betekintéshez a rekombináns OPG különböző formáit vizsgáljuk az oszteoklaszt képződésnek egy *in vitro* tenyésztési modelljében (oszteoklaszt klépződési vizsgálat). Ezt a tenyésztési rendszert eredetileg Udagawa tervezte [Udagawa és mtsai: *Endocrinology* **125**, 1805-1813 (1989); *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**, 7260-7264 (1990)], amelyben csontvelő sejtek és csontvelő sztróma sejtvonalakból származó sejtek kombinációját alkalmazza. Az ezekben a vizsgálatokban használt tenyésztési módszernek a módosítását korábban publikálták [Lacey és mtsai: *Endocrinology* **136**, 2367-2376 (1995)]. Ebben a módszerben a csontvelő sejteket, amiket egerek combcsontjából és sípcsontjából mosunk ki, éjszaka át tenyésztő táptalajban tenyésztjük (alfa MEM 10% hővel inaktivált borjúmagzat szérum), amit 500 E/ml CSF-1-gyel (telepstimuláló faktor-1, másnéven M-CSF) egészítünk ki. Ez a faktor a hematopoietikus növekedési faktor, amely a monocita/makrofág csoport utódaira specifikus. Ezt az inkubálást követően a nem-tapadó sejteket összegyűjtjük, gradiens tisztításnak vetjük alá, majd együtti tenyésztjük az ST2 csontvelő sejtvonalból származó sejtekkel (1×10^6 nem-tapadó sejt : 1×10^5 ST2 sejt/ml táptalaj). A táptalajt 100 nmol/l dexametazonnal, a D3 biológiailag aktív metabolitjával (1,25 D3 dihidroxivitamin, azaz 1,25(OH)₂D₃, 10 nmol/l) egészítjük ki. Az oszteoklaszt megjelenésének fokozására 250 nmol/l proszttaglandin E₂-t adunk ugyanahhoz a tenyésztetthez. Az együtt-tenyésztési periódus általában 8-10 napig tart, és a táptalajt, minden komponens frissen való hozzáadásával, 3-4 naponként felújítjuk. Különböző intervallumokban a tenyészetekben megvizsgáljuk a tartarát savas foszfatáz (TRAP) jelenlétét, vagy egy hisztokémiai festékkel (Sigma Kit # 387A, Sigma, St. Louis, MO), vagy TRAP oldat vizsgálattal. Az oldatban végzett vizsgálat magában foglalja az oszteoklaszt-tartalmú tenyészeteket egy citrát pufferben (100 nmol/l, pH=5,0), amely 0,1% Triton X-100-at tartalmaz. A tartarát rezisztens savas foszfatáz aktivitást azután a p-nitrofenilfoszfát (20 nmol/l) p-nitrofenollá való alakulása alapján mérjük, 80 nmol/l nátrium-tartarát jelenlétében, ami 3-5 perces szobahőmérsékleten való inkubálás során keletkezik. A reakciót 0,5 mol/l végkoncentrációjú nátrium-hidroxid hozzáadásával állítjuk le. A 450 nm-en mért optikai sűrűséget mérjük, majd az eredményeket ábrázoljuk.

A korábbi vizsgálatok során [Udagawa és mtsai: *Endocrinology* **125**, 1805-1813 (1989); *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**, 7260-7264 (1990)], az oszteoklaszt képződési vizsgálat alkalmazásával ki lehetett mutatni, hogy ezek a sejtek a ^{125}I -kalcitonin receptorát expresszálják (autoradiográfia), és lukakat okozhatnak a csontok felszínén, ami azután a TRAP pozitivitással kombinálódva megerősíti, hogy a többmagvú sejteknek oszteoklaszt fenotípusuk van. További bizonyíték, amely alátámasztja azoknak a többmagvú sejteknek az oszteoklaszt fenotípusát, amelyek *in vitro* keletkeznek az oszteoklaszt képződési esszé során, az az, hogy a sejtek αv és $\beta 3$ integríneket expresszálnak, immunocitokémiával és kalcitonin receptorral, valamint TRAP mRNS-sel *in situ* hibridizálással (ISH).

A huOPG [22-401] fúziót CHO sejtek kondicionált táptalajából tisztítjuk, majd ezt követően az oszteoklaszt képződési vizsgálatban használjuk. A huOPG [22-401]-Fc 100 ng/ml koncentrációjánál az oszteoklaszt képződés virtuálisan 100%-osan gátlódik. A mikrotiter lemezek lukaiban a lizált tenyészetekben a TRAP szintjét szintén gátolja az OPG jelenléte, ID_{50} értéke körülbelül 3 ng/ml (20. ábra). Úgy tűnik, hogy a TRAP aktivitás szintje a lizátumokban korrelál a TRAP citokémiával látható oszteoklasztok relatív számával (lásd a 19A-19G, valamint a 20. ábrán). A tisztított humán IgG1-et és TNFbp-t is vizsgáltuk ebben a modellben, és kiderítettük, hogy nincs gátló vagy serkentő hatásuk, sugallva ezzel, hogy a huOPG [22-401]-Fc gátló hatásai a fúziós fehérje OPG részéből ered. A humán és rágcsáló molekulák további formáit is vizsgáltuk, az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat

A különböző OPG formák hatása az *in vitro* oszteoklaszt képződésre

<u>OPG konstrukció</u>	<u>Relatív <i>in vitro</i> biológiai aktivitás</u>
muOPG [22-401]-Fc	+++
muOPG [22—194]-Fc	+++
muOPG [22—185]-Fc	++
muOPG [22-180]-Fc	-
muOPG [22-401]	+++
muOPG [22-401] C195	+++
muOPG [22-401] C202	+

muOPG [22-401] C277	-
muOPG [22-401] C319	+
muOPG [22-401] C400	+
muOPG [22-185]	-
muOPG [22-194]	++
muOPG [22-200]	++
muOPG [22-212]	-
muOPG [22-293]	+++
muOPG [22-355]	+++
huOPG [22-401]-Fc	+++
huOPG [22-201]-Fc	+++
huOPG [22-401]-Fc P26A	+++
huOPG [22-401]-Fc Y28F	+++
huOPG [22-401]	+++
huOPG [27-401]-Fc	++
huOPG [29-401]-Fc	++
huOPG [32-401]-Fc	±

+++ : $ED_{50} = 0,4-2$ ng/ml

++ : $ED_{50} = 2-10$ ng/ml

± : $ED_{50} = 10-100$ ng/ml

- : $ED_{50} > 100$ ng/ml

Az összesített adatok azt sugallják, hogy a rágcsáló és humán OPG 22-401 aminosav szekvenciák teljesen aktívak *in vitro*, mind az Fc doménhez fuzionáltatva, mind fúzió nélkül. Dózisfüggő módon gátolnak, és maximális aktivitásuk felét a 2-10 ng/ml tartományban fejtik ki. A rágcsáló C-terminális csonkítása a 180-as treonin csoportnál inaktiválja a molekulát, míg a 185-ös ciszteinnél és az után végzett csonkítás teljes aktivitást eredményez. A 185-ös pozícióban található ciszteincsoportról az jósolható, hogy SS3 kötést hoz létre az OPG 4-es régiójában. Ennek a csoportnak egyéb TNFR-rel rokon fehérjékről való eltávolításáról korábban kimutatták, hogy megszünteti a biológiai aktivitást [Yan és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 266, 12099-12104 (1994)]. A mi megfigyelésünk szerint a muOPG [22-180]-Fc inaktív,

míg a muOPG [22-185]-Fc aktiv, ami összhangban van ezekkel a megfigyelésekkel. Ez azt sugallja, hogy a 22-185-ös aminosav csoportok az OPG aktivitáshoz szükséges régiót határozzák meg.

Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a transzgenikusan expresszált OPG-hez hasonlóan a rekombináns OPG fehérje is elnyomja az oszteoklaszt képződést, oszteoklaszt-képződési esszével vizsgálva. Az időbeli lefutási kísérletek, amelyekben a TRAP+, $\beta 3$ +, F480+ sejtek megjelenését vizsgáljuk olyan tenyészetekben, amelyeket folyamatosan érintkezésben tartunk OPG-vel, azt mutatják, hogy az OPG blokkolja a TRAP+ és $\beta 3$ + sejtek megjelenését, de nem gátolja a F480+ sejtek megjelenését. Ezzel ellentétben a TRAP+ és $\beta 3$ + sejtek már a tenyészet létrehozása utáni 4. napon megjelennek a kontroll tenyészetekben. Csak F480+ sejtek találhatók az OPG-vel kezelt tenyészetekben, és úgy tűnik, hogy mennyiségileg ugyanolyan számban vannak jelen mint a kontroll tenyészetekben. Tehát az OPG *in vitro* hatásainak mechanizmusa magában foglalja az oszteoklaszt differenciálódás egy blokádját, a monocita-makrofágok megjelenése utáni lépésben, de a TRAP vagy $\beta 3$ integrinek expresszálo sejtek megjelenése előtt. Ezek a megfigyelések összességükben azt mutatják, hogy az OPG nem zavarja az általános növekedést és a csontvelőből származó monocita-makrofágok differenciálódását, inkább azt sugallja, hogy az OPG specifikusan blokkolja az oszteoklasztok szelektív differenciálódását a monocita-makrofág prekursorokból.

Annak pontosabb meghatározására, hogy az oszteoklaszt differenciálódási bioszintézis útban az OPG hol gátol, az *in vitro* tenyésztési módszerek egy variációját alkalmazzuk. Ebben a már ismertetett variációban [Lacey és mtsai: *Endocrinology* **136**, 2367-2376 (1995)] csontvelő makrofágokat használunk oszteoklaszt prekursorokként. Az oszteoklaszt prekursorokat úgy állítjuk elő, hogy vesszük a nem-tapadó velősejteket CSF-1/M-CSF-ben való, éjszakán át végzett inkubálás után, majd a sejteket további 4 napig 1000 - 2000 E/ml CSF-1 jelenlétében. Négynapos tenyésztés után, ezt nevezzük növekedési fázisnak, a nem-tapadó sejteket eltávolítjuk. A tapadó sejteket, amelyek csontvelő makrofágok, azután 2 napig különböző kezeléseket kapnak, 1000 - 2000 E/ml CSF-1 jelenlétében. Ezt a kétnapos periódust nevezzük az intermediér differenciálódási periódusnak. Ezután a sejtrétegeket újra leöblítjük, majd ST-2 sejteket (1×10^5 sejt/ml), dexametazont (100 nmol/l) és 1,25 (OH) $_2$ D3-at (10 nmol/l) adunk hozzá legalább legalább 8 napig, amit differenciálódási periódusnak

nevezünk. Ez alatt az időszak alatt tesztanyagokat is hozzáadhatunk. Megjelennek az oszteoklaszt differenciálódás fenotípusos markerei ennek a terminális periódusnak a végén [Lacey és mtsai: *Endocrinology* **136**, 2367-2376 (1995)].

A huOPG [22-401]-Fc-nek (100 ng/ml) vizsgáljuk a hatásait az oszteoklaszt képződésre ebben a modellben, az intermedier, terminális vagy egy alternatíva szerint mindkét differenciálódási periódusban. Mind TRAP citokémiát mint oldatban végzett vizsgálatokat végzünk. Az oldatban végzett vizsgálat eredményeit a 21. ábrán mutatjuk be. A huOPG [22-401]-Fc gátolta a TRAP aktivitását, ha mind az intermedier, mind a terminális fázisban alkalmazzuk, illetve ha csak a terminális differenciálódási fázisban alkalmazzuk. Ha az intermedier fázisban alkalmazzuk, majd a tenyészetekből mosással eltávolítjuk, akkor a huOPG [22-401]-Fc nem gátolja a TRAP aktivitás megjelenését a tenyészet lizátumokban. A citokémiai adatok ugyanazt az eredményeket adják mint az oldatban végzett vizsgálat adatai. Összességében ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a huOPG [22-401]-Fc-nek a terminális differenciálódási periódusnak csak a végén kell jelen lennie ahhoz, hogy kifejtse összes szuppresszív hatását az oszteoklaszt képződésre.

B. *In vivo* interleukin-1 α és interleukin-1 β kísérletek

Az interleukin-1 fokozza a csontreszorpciót, mind szisztémásan mind lokálisan, ha szubkután injekciózzuk egerek koponyatetője fölé [Boyce és mtsai: *Endocrinology* **125**, 1142-1150 (1989)]. A szisztémás hatásokat hisztológiailag megbecsülhetjük a hiperkalcémia és a lokális hatások mértéke alapján, ha felbecsüljük az oszteoklasztok által közvetített válasz relatív nagyságrendjét. Ezeknek a kísérleteknek az a célja, hogy meghatározzuk, vajon a rekombináns muOPG [22-401]-Fc képes-e módosítani az interleukin-1 lokális és/vagy szisztémás hatásait, ha szubkután a koponyatető ugyanazon pontjára injekciózzuk mint az interleukin-1-et.

Interleukin-1 β kísérletek

Négyhetes hím egereket (ICR Swiss white) az alábbi kezelési csoportokba osztjuk (5 egér per csoport): Kontrollcsoport: interleukin-1- β -val kezelt állatok (az egereke naponta egy 2,5 μ g interleukin-1- β injekciót kapnak); alacsony dózisú muOPG [22-401]-Fc-vel kezelt állatok (az egerek naponta 3, 1 μ g muOPG [22-401]-Fc injekciót kapnak); alacsony dózisú muOPG [22-401]-Fc és interleukin-1- β ; magas

dózisú OPG [22-401]-Fc-vel kezelt állatok (az egerek naponta 3, 10 μg muOPG [22-401]-Fc injekciót kapnak; magas dózisú muOPG [22-401]-Fc és interleukin-1- β . Mindegyik egér azonos számú injekciót kapott, amely vagy az aktív faktort vagy csak a hordozót (0,1% szarvasmarha szérumalbumin foszfáttal puffertelt sóoldatban) tartalmazza. Mindegyik állatot az utolsó injekció utáni napon öljük le. A testsúlyokat és a vér ionos kalcium-szintjét megmérjük az első injekciók előtt, a második injekció után négy órával, és 24 órával a harmadik interleukin-1 injekció után, közvetlenül azelőtt, hogy az állatokat leöljük. A leölés után a koponyatetőket eltávolítjuk, majd paraffinos metszet készítéséhez feldolgozzuk.

Interleukin-1 α kísérletek

Négyhetes him egereket (ICR Swiss white) az alábbi kezelési csoportokba osztjuk (5 egér per csoport): Kontrollcsoport: interleukin-1- α -val kezelt állatok (az egereke naponta egy 2,5 μg interleukin-1- α injekciót kapnak); alacsony dózisú muOPG [22-401]-Fc-vel kezelt állatok (az egerek naponta 3, 1 μg muOPG [22-401]-Fc injekciót kapnak); alacsony dózisú muOPG [22-401]-Fc és interleukin-1- α (a dózist lásd fent); magas dózisú OPG [22-401]-Fc-vel kezelt állatok (az egerek naponta 3, 10 μg muOPG [22-401]-Fc injekciót kapnak; magas dózisú muOPG [22-401]-Fc és interleukin-1- α . Mindegyik egér azonos számú injekciót kapott, amely vagy az aktív faktort vagy csak a hordozót (0,1% szarvasmarha szérumalbumin foszfáttal puffertelt sóoldatban) tartalmazza. Mindegyik állatot az utolsó injekció utáni napon öljük le. A testsúlyokat és a vér ionos kalcium-szintjét megmérjük az első injekciók előtt, a második injekció után négy órával, és 24 órával a harmadik interleukin-1 injekció után, közvetlenül azelőtt, hogy az állatokat leöljük. Megmérjük az állatok testsúlyát az első injekció előtt, a második injekció után négy órával és a harmadik interleukin-1 injekció után 24 órával, közvetlenül azelőtt, hogy az állatokat leöljük. A leölés után a koponyatetőket eltávolítjuk, majd paraffinos metszet készítéséhez feldolgozzuk.

Hisztológiai módszerek

A koponyatető mintákat cink-formalinban fixálunk, hangyasavval kalciummentesítjük, etanollal dehidratáljuk, majd paraffinba ágyazzuk. 5 μm vastag szekciókat vágunk a koponyatetőből, a lamdoid szutúra szomszédságában, majd vagy hematoxilinnel és eozinnal festjük, vagy tartarát rezisztens savas foszfátáz aktivitással (Sigma Kit# 387A) reagáltatjuk, és hematoxilinnel ellenfestjük. A

csontfelszívódást az interleukin-1- α -val kezelt állatokban hisztomorfometriás módszerekkel becsüljük meg, az Osteomeasure-t (Osteometrics, Atlanta, GA) használva, a hisztológiai tulajdonságokat egy digitalizáló táblára vite, egy mikroszkópra szerelt camera lucida berendezéssel. Az oszteoklasztok számát, az oszteoklasztal borított felszíneket és az erodált felszíneket meghatározzuk a koponyatető csont csontvelő üregében. A koponyatető injekciózott és nem-injekciózott oldalát külön-külön mérjük.

Eredmények

Az interleukin-1- α és az interleukin-1- β hiperkalcémiát okoz a használt dózisokban, főleg a második napon, feltehetőleg szisztémás fokozott csontfelszívódást okozva. A hiperkalcémiás választ muOPG [22-401]-Fc-vel lehet blokkolni az interleukin-1- β -val kezelt állatokban, és jelentősen csökkenteni lehet az interleukin-1- α -val kezelt egerekben, amely hatás a 2. napon a legjelentősebb (22A-22B. ábra).

Az interleukin-1- α -val és interleukin-1- β -val kezelt egerek koponyatetejének hisztológiai elemzése azt mutatja, hogy a csak az interleukin-1-gyel végzett kezelés jelentős növekedést okoz a csontfelszívódás indikátoraiban, beleértve az alábbiakat: oszteoklasztok száma, oszteoklasztal fedett felszín, és az erodált felszín (az oszteoklasztok működése következtében mély szélsípkézést mutató felszínek, 23B. ábra, 2. táblázat). Az interleukin-1- α -ra vagy interleukin-1- β -ra adott válaszként a csontfelszívódás növekedése hasonló a koponyatető injekciózott és nem-injekciózott oldalán. A muOPG [22-401]-Fc injekciók csökkentik a csontfelszívódást mind az interleukin-1- α mind az interleukin-1- β injekciókkal kezelt állatokban, valamint a csak a hordozóval kezelt állatokban, de ez a redukció a koponyatetőnek csak a muOPG [22-401]-Fc-vel injekciózott oldalán látható.

Ezeknek a megfigyeléseknek a legvalószínűbb magyarázata az, hogy a muOPG [22-401]-Fc gátolja a csontfelszívódást, amely következtetést alátámasztja mind a teljes oszteoklaszt szám csökkenés, mind a csontfelszívódás számára hozzáférhető csontfelszínnek százaléka, a muOPG [22-401]-Fc injekció helyével szomszédos koponyatető régióban. A muOPG [22-401]-Fc hatásai lokálisan leginkább hisztológiával láthatók, de az a tény, hogy a muOPG [22-401] tompítja az interleukin-1 által indukált hiperkalcémiát, azt sugallja, hogy a muOPG [22-401] sokkal finomabb hatással van a szisztémás csontfelszívódásra.

2. táblázat

Az OPG hatása a csontfelszívródás változaira interleukin-1-gyel injektált egerekben

	A csontfelszín felszínének %-a (átlag ± SD)		oszteoklasztos (átlag ± SD)		A csontfelszín erodált felszínének %-a (átlag ± SD)		Az oszteoklasztok száma/ mm ² szövetterület (átlag ± SD)	
	Nem-injekciózott oldal	Injekciózott oldal	Nem-injekciózott oldal	Injekciózott oldal	Nem-injekciózott oldal	Injekciózott oldal	Nem-injekciózott oldal	Injekciózott oldal
1. kísérlet								
Kontroll	12,56±3,44	9,54±2,46	8,07±3,90	9,75±3,90	32,51±11,09	23,50±10,83		
IL-1-β (2,5 μg/nap)	17,18±1,30	16,40±2,16	40,66±4,28	37,53±10,28	71,80±18,76	69,89±5,16		
OPG (40 μg/nap)	10,12±3,71	5,04±1,66	9,73±4,33	4,19±3,61	32,73±11,09	15,24±7,54		
OPG+IL-1-β	18,61±2,46	#13,26±2,50	44,87 ±8,63	#25,94±6,82	69,42±36,29	#47,13±24,26		
2. kísérlet								
Kontroll	11,56±4,22	11,95±2,97	12,67±5,04	10,03±5,13	51,72±23,93	56,03±30,70		
IL-1-α (5 μg/nap)	28,81±4,84	23,46±5,76	37,51±5,16	41,10±12,53	113,60±18,04	102,70±32,90		

OPG (40 μg/nap)	14,40±1,00	#4,26±2,54	11,55±4,14	#4,29±3,16	72,28±14,11	22,65±16,68
OPG+IL1-α	29,58±8,80	#17,83±3,34	33,66±9,21	#24,38±8,88	146,10±42,37	#66,56±15,62

27475

Eltér a nem-injekciózott odaltól $p < 0,05$ (páros t-teszt)

C. A muOPG [22-401]-Fc szisztémás hatása növekedésben levő egerekre

3-4 hetes, 9,2-15,7 g súlyú him BDF1 egereket tíz egérből álló csoportokra osztunk. Ezeket az egereket szubkután injekciózuk sóoldattal vagy muOPG [22-401]-Fc-vel, 2,5 mg/kg *bid*, 14 napig (5 mg/kg/nap). Az egereket autoradiografáljuk a kezelés előtt, a 7. és a 14. napon. Az egereket az utolsó injekció után 14 nappal leöljük. A jobb combcsontot eltávolítjuk, cink-formalinban fixáljuk, hangyasavban kalcium-mentesítjük, majd paraffinba ágyazzuk. Metszeteket készítünk a disztális combcsonti metaphysis középső régiójából és a combcsont szárából. Hisztomorfometriával meghatározzuk a csontsűrűséget hat szomszédos, a növekedési lemez metaphyseális határától kinyúló régióban, a primer és a szekunder spongiosán keresztül, a combcsonti diaphysis-be (szár). Mindegyik régió mérete $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$.

Radiográfiás változások

Hétnapos kezelés után bizonyíték van egy fokozott csontsűrűségű zónára a spongiosa-ban, amely kapcsolatban áll a növekedési lemezekkel az OPG-vel kezelt egerekben, a kontrollokkal összehasonlítva. A hatások különösen meglepőek a disztális combcsonti és a proximális sípcsonti metafázisokban (24A-24B.). Azonban a fokozott sűrűségű csikok jelen vannak a gerincoszlop testjeiben, a csípőkeresztben és a disztális csípőben. A 14. napon a homályos régió tovább terjed a combcsont és a sípcsont szárába, bár a radio-átlátszatlanság intenzitása eltűnt. Emellett a kísérlet végén nem volt különbség a combcsontok hosszában, vagy a hossz változásában a kísérlet időtartama alatt, implikálva, hogy az OPG nem változtatja meg a csont növekedését.

Hisztológiai változások

A disztális femorális metaphysis fokozott csontsűrűséget mutat a növekedési lemeztől 1,1-2,65 mm távolságban levő régiókban (25A. és 26A-26B. ábrák). Ez az a régió, ahol az egerekben a csont gyorsan eltűnik az oszteoklasztok által közvetített csontfelszívódás miatt. Ezekben a gyorsan növekvő fiatal egerekben az OPG kezeléssel az ebben a régióban megfigyelt csont-növekedés összhangban van a csontfelszívódás gátlásával.

D. Az Osteoprotegerin hatása a csontvesztésre, amit patkányokban petefészek-kiirtással indukáltunk

Tizenkét hetes Fisher patkányokon végzünk petefészek-kiirtást (OVX), vagy egy hamis operációt, majd kettős Röntgen abszorpciometriát (DEXA) méréseket végzünk a disztális combcsont metaphysis csontsűrűségének meghatározására. Háromnapos regenerálódási periódus után az állatok 14 napig naponta kapnak injekciót, az alábbiak szerint: Tíz, hamis operáción átesett állat kap hordozót (foszfáttal puffertelt sóoldat); Tíz OVX állat kap hordozót (foszfáttal puffertelt sóoldat); Hat OVX állat kap szubkután 5 mg/kg OPG-Fc-t; hat OVX állat kap szubkután 5 mg/kg pamidronátot (PAM); Hat OVX állat kap szubkután 40 µg/kg ösztrogént (ESTR). A kezelés megkezdése után 7 illetve 14 nappal az állatok csontjánaksűrűségét DEXA-val vizsgáljuk meg. Az utolsó injekció után két nappal az állatokat leöljük, majd a jobb sípcsontot és combcsontot hisztológiai kiértékelés céljából eltávolítjuk.

A csontsűrűség DEXA mérésével a csontsűrűség csökkenésének trendje mutatható ki az petefészek-kiirtás után, amit OPG-Fc-vel blokkolni lehet. Ennek hatásai hasonlóak az ismert felezívódás elleni ágensekével, mint amilyen például az ösztrogén és a pamidronát (27. ábra). Ez a hisztomorfometriás elemzés megerősített az OPG-Fc kezeléssel kapott megfigyeléseket, olyan csontsűrűségeket produkálva, amelyek jelentősen magasabbak az OVX patkányokban annál, mint ami a kezeletlen OVX patkányokban látható (28. ábra). Ezek az eredmények megerősítik az OPG aktivitását a petefészek-kiirtást követő endogén ösztrogén megvonással kapcsolatban álló csontvesztésben.

In vivo összefoglalás

A rekombináns OPG *in vivo* hatásai ugyanolyan irányúak mint az OPG transzgenikus egerekben megfigyelt változások. Az oszteoklaszt számok megfigyelt csökkenését az OPG transzgenikus egerekben úgy lehet reprodukálni, hogy rekombináns OPG-t injekciózunk lokálisan mind normális egerek, mind interleukin-1- α -val vagy interleukin-1- β -val kezelt egerek koponyateteje fölé. Az OPG transzgenikus egerek oszteopetroitikus fenotípust fejlesztenek ki, a csontvelőüreget progresszíven csonttal töltve fel, és a születés 1. napja után a növekedési lemezből kinyúló, nem-remodellezett porccal. Normális háromhetes (növekedő) egerekben az OPG kezelés a

csont retenciójához és nem-remodellezett porchoz is vezet az endochondrális csontképződés régióiban, amely hatásv radiográfiásan lehet megfigyelni és hisztológiailag lehet megerősíteni. Tehát a rekombináns OPG fenotipikus változásokat eredményez a normális állatokban, amelyek a transzgenikus állatokban megfigyeltekhez hasonlóak, és a változások összhangban vannak a a csontfelszívódás OPG-vel indukált gátlásával. Az oszteoklaszt-képződés *in vitro* vizsgálatai alapján ennek a gátlásnak egy jelentős része a károsított oszteoklaszt-képződés számlájára írható. Ezzel a hipotézissel összhangban az OPG patkányokban blokkolja a petefészek-irtás által indukált oszteoporózist. Ebben a modellben a csontvesztésről ismert, hogy az aktivált oszteoklasztok közvetítik, sugallva ezzel, hogy az OPG szerepet játszik a primer oszteoporózis kezelésében.

11. Példa

Az OPG pegilezett származékai

N-terminális PEG-OPG konjugátumok készítése redukzív alkilezéssel

HuOPG met [22-194] P25A-nak puffercserének vetjük alá, 25-50 mmol/l nátrium-acetát (pH=4,5-4,8) oldatban, majd 2-5 mg/ml koncentrációra töményítjük. Ezt az oldatot használjuk OPG redukzív alkilezés végrehajtására, monofunkciós PEG aldehidekkel, 5-7 °C-on. PEG monofunkciós aldehideket (lineáris vagy elágazó szénláncú, molekulásúly = 1-57 kDa, beszerezhető a Shearwater Polymers-től), adunk az OPG oldatokhoz, szilárd anyag formájában, 2-4 mól PEG-aldehid per mól OPG mennyiségben. A polimernek a fehérje-oldatban való feloldása után nátrium-cianoborhidridet adunk a kapott oldathoz 15-20 mmol/l végkoncentrációban, 1-1,6 mol/l hideg bidesztvízben frissen készített törzsoldatból. A reakció előrehaladását és az OPG PEGilezés előrehaladtát méretkizárásos HPLC-vel követjük egy G3000SW_{XL} oszlopon (Toso Haas), 100 mmol/l nátriumfoszfát, 0,5 mol/l nátrium-klorid, 10% etanol (pH=6,9) összetételű oldattal végezve az elúciót. A reakciót általában 16-18 óra hosszat hagyjuk lejátszódni, majd a reakcióelegyet 6-8-szorosra hígítjuk, és pH-ját 3,5-4-re csökkentjük. A reakcióelegyet ioncserélő kromatográfiával frakcionáljuk (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia), 20 mmol/l nátrium-acetát (pH=4) oldatban, 0,75 mol/l nátrium-klorid koncentrációig növekedő gradienssel, 25 oszloptérfogatot használva, 30 cm/ó áramlási sebességgel. A mono-, di- vagy poli-pegilezett OPG-ket egyesítjük, majd SEC HPLC-vel és SDS-PAGE-val jellemezzük. N-terminális szekvenálással

meghatároztuk, hogy a fő reakciótermék a legtöbb esetben 98%-ban N-terminálisán PEG-gel módosított OPG.

Általában ezt az eljárást használjuk az alábbi N-terminális PEG-OPG konjugátumok előállítására (ahol az OPG HuOPG met [22-194]P25A: 5 kDa MonoPEG, 10 kDa Mono elágazó PEG, 12 kDa monoPEG, 20 kDa monoPEG, 20 kDa mono elágazó PEG, 25 kDa monoPEG, 31 kDa monoPEG, 57 kDa monoPEG, 12 kDa diPEG, 31 kDa diPEG, 57 kDa diPEG, 25 kDa triPEG.

PEG-OPG konjugátumok előállítása acilezéssel

HuOPG met [22-194] P25A-t puffercserének vetünk alá, 50 mmol/l BICIN pufferbe (pH=8), majd 2-3 mg/ml-re töményítjük. Ezt az oldatot használjuk az OPG acilezés szobahőmérsékleten való elvégzésére, monofunkciós PEG N-hidroxiszukcinimidil észterekkel. PEG N-hidroxiszukcinimidil észtereket (lineáris vagy elágazó szénláncú, molekulasúly = 1-57 kDa, beszerezhető a Shearwater Polymers-től) adunk szilárd anyag formájában az OPG oldathoz 4-8 mól PEG N-hidroxiszukcinimidil észter per egy mól OPG mennyiségben. A reakció előrehaladását, és az OPG PEGilezés mértékét méretkizárásos HPLC-vel követjük egy G3000SW_{XL} oszlopon (Toso Haas), 100 mmol/l nátriumfoszfát, 0,5 mol/l nátrium-klorid, 10% etanol (pH=6,9) összetételű oldattal végezve az elúciót. A reakciót általában 1 óra hosszat hagyjuk lejátszódni, majd a reakcióelegyet 6-8-szorosra hígítjuk, és pH-ját 3,5-4-re csökkentjük. A reakcióelegyet ioncserélő kromatográfiával frakcionáljuk (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia), 20 mmol/l nátrium-acetát (pH=4) oldatban, 0,75 mol/l nátrium-klorid koncentrációig növekedő gradienssel, 25 oszloptérfogatot használva, 30 cm/ó áramlási sebességgel. A mono-, di- vagy poli-pegilezett OPG-eket egyesítjük, majd SEC HPLC-vel és SDS-PAGE-val jellemezzük. N-terminális szekvenálással meghatároztuk, hogy a fő reakciótermék a legtöbb esetben 98%-ban N-terminálisán PEG-gel módosított OPG.

Általában ezt az eljárást használjuk az alábbi N-terminális PEG-OPG konjugátumok előállítására: 5 kDa poliPEG, 20 kDa poliPEG, 40 kDa poli elágazó PEG, 50 kDa poliPEG.

A jelen találmányt az előnyben részesített megvalósítási módjai alapján ismertettük, de a találmány oltalmi köre nem korlátozódik az ismertetett megvalósítási

módokra, ezzel szemben a mellékelt igénypontok oltalmi körébe tartozó módosítások és ekvivalensekre is vonatkozik, amely igénypontokat úgy fogalmaztunk meg, hogy az összes ilyen módosításokra és ekvivalensekre is vonatkozzanak.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány szövegében említett szekvenciákat.

A SEKVENCIÁK JEGYZÉKE

(I) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

- (i) BENYÚJTÓ: Amgen Inc.
- (ii) A TALÁLMÁNY CÍME: Osteoprotegerin
- (iii) A SEKVENCIÁK SZÁMA: 168
- (iv) LEVELEZÉSI CÍM:

- (A) CÍMZETT: Amgen Inc.
- (B) UTCA: 1840 Dehavilland Drive
- (C) VÁROS: Thousand Oaks
- (D) ÁLLAM: Kalifornia
- (E) ORSZÁG: Amerikai Egyesült Államok
- (F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 91320

(v) SZÁMÍTÓGÉPES FORMA:

- (A) A HORDOZÓ TÍPUSA: FLOPPY LEMEZ
- (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC KOMPATIBILIS
- (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAM: PATENTIN RELEASE #1.0, VERSION
#1.30

(vi) A JELENLEGI BENYÚJTÁS ADATAI:

- (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA:
- (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA:
- (C) OSZTÁLYOZÁS:

(VIII) ÜGYVIVŐ/ÜGYNÖK INFORMÁCIÓ:

- (A) NÉV: Winter, Rphert B.
- (C) REFERENCIA/LAJSTROMSZÁM: A-378-CIP2

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 36 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

AAAGGAAGGAAAAAAGCGGCCGCTACANNNNNNNT 36

2. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 16 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

TCGACCCACGCGTCCG 16

3. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 12 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

GGGTGCGCAGGC 12

4. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 18 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

TGTAAAACGACGGCCAGT

18

5. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 18 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

CAGGAAACAGCTATGACC

18

6. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 20 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

CAATTAACCCTCACTAAAGG

20

7. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 23 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

GCATTATGAC CCAGAAACCG GAC 23

8. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 23 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

AGGTAGCGCC CTCCTCACA TTC 23

9. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 30 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

GACTAGTCCC ACAATGAACA AGTGGCTGTC 30

10. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 45 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATGAAACAGCCCAGTGACCATTC 45

11. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

GCCTCTAGAA AGAGCTGGGA C 21

12. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

GGCCGTGTTC CATTTATGAG C 21

13. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

14. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 14. számú szekvencia

GTTGCACTCC TGTTTCACGG TCTG

24

15. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia

CAAGACACCT TGAAGGGCCT GATG

24

16. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia

TAACTTTTAC AGAAGAGCAT CAGC

24

17. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 33 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia

AGCGCGGCCGCATGAACAAGTGGCTGTGCTGCC

33

18. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 31 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia

AGCTCTAGAGAAACAGCCCAGTGACCATTC

31

19. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 19. számú szekvencia

GTG AAG CTG TGC AAG AAC CTG ATG

24

20. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 20. számú szekvencia

ATC AAA GGC AGG GCA TAC TTC CTG

24

21. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 21. számú szekvencia

CAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTTG

24

22. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 33 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 22. számú szekvencia

AGCGCGGCCGCGGGGACCACAATGAACAAGTTG

33

23. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 33 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 23. számú szekvencia

AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGCTCAATGGC

33

24. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 39 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 24. számú szekvencia

ATAGCGGCCGCTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC

39

25. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 45 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 25. számú szekvencia

TCTAGAGTCGACTTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT 45

26. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 38 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 26. számú szekvencia

CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG 38

27. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 43 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia

CCTCTGCGGCCGCTAAGCAGCTTATTTTCACGGATTGAACCTG 43

28. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 38 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 28. számú szekvencia

CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG

38

29. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 24 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 29. számú szekvencia

TCCGTAAGAAACAGCCCAGTGACC

24

30. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 31 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 30. számú szekvencia

CCTCTGCGGCCGCTGTTGCATTTCTTTCTG

31

31. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 19 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 31. számú szekvencia

Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr

1

5

10

Gly His Gln Leu Leu

15

32. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 21 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia

TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT

21

33. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 34 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 33. számú szekvencia

CCT CTG CGG CCG CAC ACA CGT TGT CAT GTG TTG C

34

34. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 34. számú szekvencia

TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT

21

35. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 34 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 35. számú szekvencia

CTT CTG CGG CCG CCT TTT GCG TGG CTT CTC TGT T

34

36. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 37 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 36. számú szekvencia

CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G

37

PS001122

37. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 38 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 37. számú szekvencia

CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG AAT GG 38

38. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 37 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 38. számú szekvencia

CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G 37

39. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 33 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 39. számú szekvencia

CCT CTG CGG CCG CCA GGG TAA CAT CTA TTC CAC 33

40. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 35 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 40. számú szekvencia

CCG AAG CTT CCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GC

35

41. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 40 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 41. számú szekvencia

CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G40

42. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 42. számú szekvencia

TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT

21

43. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 35 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 43. számú szekvencia

CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC

35

44. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 44. számú szekvencia

TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT

21

45. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 35 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 45. számú szekvencia

CCT CTG TCG ACT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TT

35

46. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 35 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 46. számú szekvencia

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCTCTCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA
CCCGTTTAGA 60

GGCCCCAAGG GGTTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT
CAGCTTCCTT 120

TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC
180

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCCCTCCTT
240

TAATTAGTGA AAACAAATCT AGAATCAAAT CGATTAATCG ACTATAACAA
ACCATTTTCT 300

TGCGTAAACC TGTACGATCC TACAGGTACT TATGTTAAAC AATTGTATTT
CAAGCGATAT 360

AATAGTGTGA CAAAAATCCA ATTTATTAGA ATCAAATGTC AATCTATTAC
CGTTTTAATG 420

ATATATAACA CGCAAAACTT GCGACAAACA ATAGGTAAGG ATAAAGAGAT
GGGTATGAAA 480

GACATAAATG CCGACGACAC TTACAGAATA ATTAATAAAA TTAAAGCCTG
TAGAAGCAAT 540

AATGATATTA ATCAATGCIT ATCTGATATG ACTAAAATGG TACATTGTGA
ATATTATTTA 600

CTCGCGATCA TTTATCCTCA TTCTATGGTT AAATCTGATA TTTCAATTCT GGATAATTAC
660

CCTAAAAAAT GGAGGCAATA TTATGATGAC GCTAATTTAA TAAAATATGA
TCCTATAGTA 720

GATTATTCTA ACTCCAATCA TTCACCGATT AATTGGAATA TATTGAAAA
CAATGCTGTA 780

AATAAAAAAT CTCCAAATGT AATTAAAGAA GCGAAATCAT CAGGTCTTAT
CACTGGGTTT 840

AGTTTCCCTA TTCATACTGC TAATAATGGC TTCGGAATGC TTAGTTTTGC ACATTCAGAG
900

AAAGACAACT ATATAGATAG TTTATTTTAA CATGCGTGTA TGAACATACC
ATTAATTGTT 960

CCTTCTCTAG TTGATAATTA TCGAAAAATA AATATAGCAA ATAATAAATC
AAACAACGAT1020

TTAACCAAAA GAGAAAAAGA ATGTTTAGCG TGGGCATGCG AAGGAAAAAG
CTCTTGGGAT1080

ATTTCAAAAA TATTAGGCTG TAGTAAGCGC ACGGTCACIT TCCATTTAAC
CAATGCGCAA1140

ATGAAACTCA ATACAACAAA CCGCTGCCAA AGTATTTCTA AAGCAATTTT
AACAGGAGCA1200

ATTGATTGCC CATACTTTAA AAGTTAAGTA CGACGTCCAT ATTTGAATGT
ATTTAGAAAA1260

ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC
CTTCTGCTTA1320

ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCCGC ACCCTCCGGG
CCGTTGCTTC1380

GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGCCGGATTT GTCCTACTCA GGAGAGCGTT
CACCGACAAA1440

CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT TTCGTTTTAT
TTGATGCCTG1500

GCAGTCCCT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATAC 1537

47. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 48 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 47. számú szekvencia

CCGGCGGACATTTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTTCTTCATCCA

48

48. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 55 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 48. számú szekvencia

CGATTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC

55

49. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 49 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 49. számú szekvencia

TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC

49

50. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 1546 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 50. számú szekvencia

GCGTAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA

TCAAATAAAA 60

CGAAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTTTGTC

GGTGAACGCT 120

CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTCCGAAGCA

ACGGCCCCGA 180

GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA

GAAGGCCATC 240

CTGAACGGATG GCCTTTTTGC GTTCTACAA ACTCTTTTGT TTATTTTCT AAATACATTC
300

AAATATGGAC GTCGTACTTA ACTTTTAAAG TATGGGCAAT CAATTGCTCC
TGTTAAAATT 360

GCITTAGAAA TACTTTGGCA GCGGTTTGT GTATTGAGTT TCATTGCGC ATTGGTTAAA
420

TGGAAAGTGA CCGTGCGCTT ACTACAGCCT AATATTTTTG AAATATCCCA
AGAGCTTTTT 480

CCTTCGCATG CCCACGCTAA ACATTCTTTT TCTCTTTTGG TTAAATCGTT GTTGATTIA
540

TTATTTGCTA TATTTATTT TCGATAATTA TCAACTAGAG AAGGAACAAT TAATGGTATG
600

TTCATACACG CATGTAAAAA TAACTATCT ATATAGTTGT CTTTCTCTGA
ATGTGCAAAA 660

CTAAGCATTG CGAAGCCATT ATTAGCAGTA TGAATAGGGA AACTAAACCC
AGTGATAAGA 720

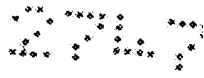
CCTGATGATT TCGCTTCTTT AATTACATTT GGAGATTTTT TATTACAGC ATTGTTTTCA
780

AATATATTCC AATTAATCGG TGAATGATTG GAGTTAGAAT AATCIACTAT
AGGATCATAT 840

TTTATTAAT TAACGTCATC ATAATATTGC CTCATTTTT TAGGGTAATT ATCCAGAATT
900

GAAATATCAG ATTTAACCAT AGAATGAGGA TAAATGATCG CGAGTAAATA
ATATTCACAA 960

TGTACCATTT TAGTCATATC AGATAAGCAT TGATTAAATAT CATTATTGCT
TCTACAGGCT1020



TTAATTTTAT TAATTATTCT GTAAGTGTCTG TCGGCATTTA TGTCTTTCAT
AQQCATCTCT1080

TTATCCTTAC CTATTGTTTG TCGCAAGTTT TCGGTGTTAT ATATCATTAA
AACGGTAATA1140

GATTGACATT TGATTCTAAT AAATTGGATT TTTGTCACAC TATTATATCG
CTTGAAATAC1200

AATTGITTAA CATAAGTACC TGTAGGATCG TACAGGTTTA CGCAAGAAAA
TGGTTTGTTA1260

TAGTCGATTA ATCGATTIGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA ATTAAAGGAG
GAATAACATA1320

TGGTTAACGC GTTGGAATTC GAGCTCACTA GTGTCGACCT GCAGGGTACC
ATGGAAGCTT1380

ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC CCGAAAGGAA
GCTGAGTTGG1440

CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCTTGG GGCCTCTAAA
CGGGTCTTGA1500

GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT TCACGC 1546

51. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 47 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 51. számú szekvencia

TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGC TAGCGTTAAC GCGTTGG47

52. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 49 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 52. számú szekvencia

AATTCCAACG CGTTAACGCT AGCATGATGG TGATGGTGAT GATGTTTCA

49

53. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 141 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 53. számú szekvencia

CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTC
ATAT-

AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGT
TGACATA

AATACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT

141

54. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 147 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 54. számú szekvencia

TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGGACGTTTTTTAT

50

TTAAGTATATTTTTTGTATGTCCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAG

100

ACCGCCACAACCTGTATTTATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC

147

55. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 55 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 55. számú szekvencia

CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTC

50

GGTAC

55

56. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 49 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 56. számú szekvencia

TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 49

57. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 668 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 57. számú szekvencia

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA
 CCCGTTTAGA 60

GGCCCCAAGG GGTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT
 CAGCTTCCTT 120

TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCTCCTT
240

TAATTAGTTA ACTCAAATCT AGAATCAAAT CGATAAATTG TGAGCGCTCA
CAATTGAGAA 300

TATTAATCAA GAATTTTAGC ATTTGTCAAA TGAATTTTTT AAAAATTATG AGACGTCCAT
360

ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA
AGGCCATCCG 420

TCAGGATGGC CTTCTGCTTA ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT
CCTGCCCCGCC 480

ACCCCTCCGGG CCGTTGCTTC GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA
540

GGAGAGCGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC
GACTGAGCCT 600

TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTCCCT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATACGTT
660

ACGCACGT

668

58. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 726 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 58. számú szekvencia

CCGTAAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA
TCAAATAAAA 60

CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTTTGTC
GGTGAACGCT 120

CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTGCGAAGCA
ACGGCCCGGA 180

GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA
GAAGGGGCCT 240

CCCACGCCC GTCTGCGGG CGGTATTTGA CGGTCCGTAG TTAAATTCGT CTTCGCCATC
300

CTGACGGATG GCCTTTTTGC GTTTCIACAA ACTCTTTTGT TTATTTTCT AAATACATTC
360

AAATATGGAC GTCTCATAAT TTTTAAAAA TTCATTTGAC AAATGCTAAA ATTCTTGATT
420

AATATTCTCA ATTGTGAGCG CTCACAATTT ATCGATTTGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA
480

ATTAAAGGAG GAATAACATA TGGTAAACGC GTTGGAATTC GAGCTCACTA
GTGTCGACCT 540

GCAGGGTACC ATGGAAGCTT ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA
AGAAGAAAGC 600

CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA
TAACTAGCATAACCCCTTGG 660

GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC
TTCACGCTCT 720

TCACGC

726

59. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 44 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 59. számú szekvencia

TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTIATTTTACTGATTGGAC 44

60. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 55 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 60. számú szekvencia

GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC 27

61. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 102 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 61. számú szekvencia

TATGGATGAA	GAAACTTCTC	ATCAGCTGCT	GTGTGATAAA
TGTCCGCCGG	50 GTACCCGGCG	GACATTTATC	ACACAGCAGC

TGATGAGAAG TTTCTTCATC100 CA

102

62. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 19 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 62. számú szekvencia

Met Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys

1

5

10

Pro Pro Gly Thr Tyr

15

63. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 84 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 63. számú szekvencia

TATGGAAACT TTTCTTCCAA AATATCTTCA TTATGATGAA GAAACTTCTC

50 ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC

84

64. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 78 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 64. számú szekvencia

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC
TTCATCATAAT50 TGAAGATATT TTGGAGGAAA AGTTTCCA
78

65. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 44 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 65. számú szekvencia

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTCACGGATT GAAC 44

66. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 38 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 66. számú szekvencia

GTGCTCCTGG TACCTACCTA AAACAGCACT GCACAGTG

38

67. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 84 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 67. számú szekvencia

TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA TTACGATCCG
GAAACTGGTC 50 ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC

68. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 78 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 68. számú szekvencia

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC
CGGATCGTAA 50 TGCAGGTATT TTGGAGGCAG AGTTTCCA

78

69. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 54 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 69. számú szekvencia

TATGGACCCA GAAACTGGTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA
TGTGCTCCGG 50 GTAC

54

70. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 48 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 70. számú szekvencia

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC TGGGTCCA

48

71. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 87 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 71. számú szekvencia

TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCATTACGAT
CCGGAAACTG 50 GTCATCAGCT GCTGTGTGAT AAATGTGCTC CGGGTAC

87

72. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 81 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 72. számú szekvencia

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC
CGGATCGTAA 50 TGCAGGTATT TTGGAGGCAG AGTTTCTTTC A

81

73. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 71 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 73. számú szekvencia

GTTCTCCTCA TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGA AACTCTGCCT
50 CCAAAATACC TGCATTACGA T

71

74. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 43 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 74. számú szekvencia

GTTCCTCCTCA TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCA

43

75. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 76 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 75. számú szekvencia

TACGCACTGG ATCCTTAATG ATGGTGATGG TGATGATGTA
AGCAGCTTAT 50 TTTCACGGAT GIAACCTGAT TCCCTA

76

76. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 47 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 76. számú szekvencia

GTTCCTCCTCA TATGAAATAC CTGCATTACG ATCCGGAAAC TGGTCAT 47

77. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 43 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 77. számú szekvencia

GTTCTCCTAT TAATGAAATA TCTTCATTAT GATGAAGAAA CTT

43

78. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 40 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 78. számú szekvencia

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT

40

79. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 40 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 79. számú szekvencia

GTTCTCCTCA TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA

80. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 43 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 80. számú szekvencia

TACGCACTGG ATCCTTATGT TGCATTTCCT TTCTGAATTA GCA 43

81. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 18 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 81. számú szekvencia

CCGGAAACAG ATAATGAG 18

82. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 18 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 82. számú szekvencia

GATCCTCATT ATCTGTTT

18

83. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 30 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 83. számú szekvencia

CCGGAAACAG AGAAGCCACG CAAAAGTAAG

30

84. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 30 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 84. számú szekvencia

GATCCTTACT TTTGCGTGGC TTCTCTGTTT

30

85. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 12 bázispár

- (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
 - (ii) A molekula típusa: cDNS
 - (xi) A szekvencia leírása: 85. számú szekvencia
- TATGTTAATG AG 12

86. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 14 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
 - (ii) A molekula típusa: cDNS
 - (xi) A szekvencia leírása: 86. számú szekvencia
- GATCCTCATT AACA 14

87. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 21 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
 - (ii) A molekula típusa: cDNS
 - (xi) A szekvencia leírása: 87. számú szekvencia
- TATGTTCCGG AAACAGTTAA G 21

88. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 23 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 88. számú szekvencia

GATCCTTAAC TGTTCCTCGGA ACA

23

89. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 36 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 89. számú szekvencia

TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATAAG

36

90. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 38 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 90. számú szekvencia

GATCCTTATT TTTGAGTTGA TTCACTGTTT CCGGAACA

38

91. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 100 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 91. számú szekvencia

CTAGCGACGA CGACGACAAA GAAACTCTGC CTCCAAAATA
CCTGCATTAC 50 GATCCGGAAA CTGGTCATCA GCTGCTGTGT
GATAAATGTG CTCCGGGTAC100

92. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 92 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 92. számú szekvencia

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC
CGGATCGTAA 50 TGCAGGTATT TTGGAGGCAG AGTTTCTTTG
TCGTCGTCGT CG 92

93. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 26 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 93. számú szekvencia

ACAAACACAA TCGATTIGAT ACTAGA

26

94. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 50 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 94. számú szekvencia

TTTGTTTTAA CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATATGAGAGG
ATCGCATCAC 50

95. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 50 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 95. számú szekvencia

CATCACCATC ACGAAACCTT CCCGCCGAAA TACCTGCACT
ACGACGAAGA 50

96. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 49 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 96. számú szekvencia

AACCTCCAC CAGCTGCTGT GCGACAAATG CCCGCCGGGT ACCCAAACA
49

97. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 26 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 97. számú szekvencia

TGTTTGGGTA CCCGGCGGGC ATTTGT

26

98. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 50 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 98. számú szekvencia

CGCACAGCAG CTGGTGGGAG GTTTCCTTCGT CGTAGTGCAGG
TATTTCGGC 50

99. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 49 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 99. számú szekvencia

GGGAAGGTTT CGTGATGGTG ATGGTGATGC GATCCTCTCA TATTTTATT
49

100. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 50 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 100. számú szekvencia

CCTCCTTTAA TTAGTTAAAA CAAATCTAGT ATCAAATCGA TTGTGTTTGT
50

101. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 59 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 101. számú szekvencia

ACAAACACAA TCGATTGAT ACTAGATTG TTTTAACTAA
TTAAAGGAGGA50 ATAAAATG

59

102. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 48 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 102. számú szekvencia

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAGAAA CTTTTCCTCC AAAATATC

48

103. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 31 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 103. számú szekvencia

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

104. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 59 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 104. számú szekvencia

ACAAACACAA TCGATTGAT ACTAGATTG TTTTAACTAA
TTAAAGGAGG 50 AATAAAATG

105. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 54 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 105. számú szekvencia

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAAAAAA AAGAACTTT
TCCTCCAAAA 50 TATC

54

106. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 31 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 106. számú szekvencia

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

31

107. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 44 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 107. számú szekvencia

CAGCCCCGGGT AAAATGGAAA CGTTTCCTCC AAAATATCTT CATT

44

108. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 44 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 108. számú szekvencia

CGTTTCCATT TTACCCGGGC TGAGCGAGAG GCTCTTCTGC GTGT

44

109. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 45 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 109. számú szekvencia

CGCTCAGCCC GGGTAAAATG GAAACGTTGC CTCCAAAATA CCTGC 45

110. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 39 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 110. számú szekvencia

CCATTTTACC CGGGCTGAGC GAGAGGCTCT TCTGCGTGT

39

111. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 36 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 111. számú szekvencia

GAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

36

112. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 34 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 112. számú szekvencia

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTCACGG ATTG

113. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 36 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 113. számú szekvencia

AAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

36

114. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 35 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 114. számú szekvencia

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTACTG ATTGG

35

115. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 102 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 115. számú szekvencia

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAACTTT TGCTCCAAAA
TATCTTCATT 50 ATGATGAAGA AACTAGTCAT CAGCTGCTGT
GTGATAAATG TCCGCCGGGT100 AC

116. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 94 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 116. számú szekvencia

CCGGCGGACA	TTTATCACAC	AGCAGCTGAT	GACTAGTTTC
TTCATCATAA	50 TGAAGATATT	TTGGAGCAAA	AGTTTCCATA
TGTTATTCCT	CCTT	94	

117. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 62 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 117. számú szekvencia

CTAGAAGGAG	GAATAACATA	TGGAAACTTT	TCCTGCTAAA
TATCTTCATT	50 ATGATGAAGA	AA	

62

118. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 62 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 118. számú szekvencia

CTAGTTTCTT CATCATAATG AAGATATTTA GCAGGAAAAG
TTTCCATATG 50 TTATTCCTCC TT

62

119. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 51 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 119. számú szekvencia

Tyr His Tyr Tyr Asp Gln Asn Gly Arg Met Cys Glu Glu Cys

1 5 10

His Met Cys Gln Pro Gly His Phe Leu Val Lys His Cys Lys

15 20 25

Gln Pro Lys Arg Asp Thr Val Cys Hys Lys Pro Cys Glu Pro

30 35 40

Gly Val Thr Tyr Thr Asp Asp Trp His

45 50

120. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 2432 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 120. számú szekvencia

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTGTTGCCC AGACCTTATA TAAAACGTCA
TGTTGCCTG 60

GGCAGCAGAG AAGCACCTAG CACTGGCCCA GCGGCTGCCG CCTGAGGTTT
CCAGAGGACC 120

ACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGT GCA CTC CTG GTG TTC TTG GAC ATC 168
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile
1 5 10 15

ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC TTT CCT CCA AAA TAC TTG CAT TAT 216
Ile Gln Trp Thr Thr Gln Gln Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr
20 25 30

GAC CCA GAA ACC GGA CGT CAG CTC TTG TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC 264
Asp Pro Gln Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly
35 40 45

ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTC AGG AGG AAG ACA CTG TGT GTC 312
Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val
50 55 60

CCT TGC CCT GAC TAC TCT TAT ACA GAC AGC TGG CAC ACG AGT GAT GAA 360
Pro Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Gln
65 70 75

TGC GTG TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG GAA CTG CAG ACC GTG AAA CAG 408
Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Gln Leu Gln Thr Val Lys Gln
80 85 90 95

GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG TGC GAA TGT GAG GAA GGG CGC 456
Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Gln Cys Gln Gln Gly Arg
100 105 110

TAC CTG GAG CTC GAA TTC TGC TTG AAG CAC CGG AGC TGT CCC CCA GGC 504
Tyr Leu Gln Leu Gln Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly
115 120 125

TTG GGT GTG CTG CAG GCT GGG ACC CCA GAG CGA AAC ACG GTT TGC AAA 552
Leu Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Gln Arg Asn Thr Val Cys Lys
130 135 140

AGA TGT CCG GAT GGG TTC TTC TCA GGT GAG ACG TCA TCG AAA GCA CCC 600

Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro

145 150 155

TGT AGG AAA CAC ACC AAC TGC AGC TCA CTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG 648

Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln

160 165 170 175

AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAT GTA TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCA 696

Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala

180 185 190

ACT CAA AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG TGC GAA GAG GCA TTC TTC 744

Thr Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe

195 200 205

AGG TTT GCT GTG CCT ACC AAG ATT ATA CCG AAT TGG CTG AGT GTT CTG 792

Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu

210 215 220

GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG AAT GCA GAG AGT GTA GAG AGG 840

Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg

225 230 235

ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCG CAA GAG CAA ACT TTC CAG CTA CTT AAG 888

Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys

240 245 250 255

CTG TGG AAG CAT CAA AAC AGA GAC CAG GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC 936

Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile

260 265 270

CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGT GTG CAA CGG CAT ATC GGC CAC 984

Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His

275 280 285

GCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTC CGC ATC TTG ATG GAG AGC TTG CCT 1032

Ala Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro

290 295 300
 GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAC GAG ATT GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC 1080
 Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asp Gln Ile Gln Arg Thr Arg Lys Thr Cys
 305 310 315
 AAA CCC AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA CTG AGC TTG TGG AGG ATC AAA 1128
 Lys Pro Ser Gln Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys
 320 325 330 335
 AAT GGA GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC CTG ATG TAC GCA CTC AAG CAC 1176
 Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His
 340 345 350
 TTG AAA GCA TAC CAC TTT CCC AAA ACC GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG 1224
 Leu Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys
 355 360 365
 ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATG TAC CGA TTG TAT CAG AAA 1272
 Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys
 370 375 380
 CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT CAA TCA GTG AAG ATA AGC 1320
 Leu Phe Leu Gln Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser
 385 390 395
 TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTTCTT CAGGATGGGC CAACACTGAT
 1376
 Cys Leu
 400
 GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGCAGTT GATTCTTTTC
 TCATCAGTTG1436
 GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCCAACACA CACACTGGGG AGTCTGAGTC
 AGGAGAGTGA1496
 GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGGTGTAC ACCTAGAAAG
 TCAAGCACCC1556

TGAGAAAGAG GATATTTTIA TAACCTCAAA CATAGGCCCT TTCCTTCCTC
TCCTTATGGA1616

TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTCATCCC TAGATGAAGG
CCTCTTTTAT1676

TTATTTTTTT ATTCTTTTTT TCGGAGCTGG GGACCGAACC CAGGGCCTTG
CGCTTGCGAG1736

GCAAGTGCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCCCTGAA GGCTCTTTC
TTTCTGCCTC1796

TGATAGICTA TGACATTCTT TTTTCTACAA TTCGTATCAG GTGCACGAGC
CTTATCCCAT1856

TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATTTTCC CTCIGAAGAT
TTGATTCCGAG1916

TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGGTAG GTTATGGTAG TTTATTTAAC
AGACTGCCAC1976

CAAGAGTCCA GTGTTTCTTG TTCCCTCGTA GTTGTACCTA AGCTGACTCC
AAGTACATTT2036

AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTC CTTCTATCAA CATGGGCTAG
CTTTGTTTCA2096

GGGCACTAAA AGAACTACT ATATGGAGAA AGAATTGATA TTGCCCCCAA
CGTTCAACAA2156

CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCCTGG TTCAGTGTCT ACTGACTATG
CGCCCTCTTA2216

TTACTGCAIG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAATAATAA TAATAGAAAT
AAAATCTAGA2276

CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAACTTAA GAAGCTTTGA
GATTTCAAGTT2336

GTGTTAAAGG CTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTTCTGTA AAAGTTACTA
ATATATCTGT2396

AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCAG

2432

121. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 401 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 121. számú szekvencia

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

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

122. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 1324 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 117. számú szekvencia

CCTTATATAA ACGICATGAT TGCCTGGGCT GCAGAGACGC ACCTAGCACT
GACCCAGCGG 60

CTGCCTCCTG AGGTTTCCCG AGGACCACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC GCA 113
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Al 1 5

CTC CTG GTG CTC CTG GAC ATC ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT
Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu
10 15 20

CCT CCA AAG TAC TTG CAT TAT GAC CCA GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG 209
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu
25 30 35 40

TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG 257
Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val
45 50 55

AGG AGG AAG ACA TTG TGT GTC CCT TGC CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC 305
Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp
60 65 70

AGC TGG CAC ACC AGT GAT GAG TGT GTG TAT TGC AGC CCA GTG TGC AAG 353
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
75 80 85

GAA CTG CAG TCC GTG AAG CAG GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG 401
Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
90 95 100

TGT GAG TGT GAG GAA GGG CGT TAC CTG GAG ATC GAA TTC TGC TTG AAG 449
Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
105 110 115 120

CAC CGG AGC TGT CCC CCG GGC TCC GGC GTG GTG CAA GCT GGA ACC CCA 497
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro
125 130 135

GAG CGA AAC ACA GTT TGC AAA AAA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA GGT 545

Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly
140 145 150

GAG ACT TCA TCG AAA GCA CCC TGT ATA AAA CAC ACG AAC TGC AGC ACA 593
Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr
155 160 165

TTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAC GTG 641
Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val
170 175 180

TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCC ACG CAA AAG TGT GGA ATA GAT GTC ACC 689
Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr
185 190 195 200

CTG TGT GAA GAG GCC TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACC AAG ATT ATA 737
Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile
205 210 215

CCA AAT TGG CTG AGT GTT TTG GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG 785
Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val
220 225 230

AAT GCC GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCA CAA GAG 833
Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu
235 240 245

CAA ACC TTC CAG CTG CTG AAG CTG TGG AAA CAT CAA AAC AGA GAC CAG 881
Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln
250 255 260

GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGC 929
Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser
265 270 275 280

GTG CAG CGG CAT CTC GGC CAC TCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTT CTT 977
Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu
285 290 295

OCC TTG ATG GAG AGC CTG CCT GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAA GAG ATT 1025

Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile

300 305 310

GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC AAA TCG AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA 1073

Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu

315 320 325

CTC AGT TTA TGG AGG ATC AAA AAT GGT GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC 1121

Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly

330 335 340

CTG ATG TAT GCC CTC AAG CAC TTG AAA ACA TCC CAC TTT CCC AAA ACT 1169

Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr

345 350 355 360

GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG ACC ATG AGG TTC CTG CAC AGC TTC ACA 1217

Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr

365 370 375

ATG TAC AGA CTG TAT CAG AAG CTC TTT TTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG 1265

Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln

380 385 390

GTT CAA TCC GTG AAA ATA AGC TGC TTA TAACTAGGAA TGOTCACTGG 1312

Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

395 400

GCTGTTTCTT CA

1324

123. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 401 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Számtípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 123. számú szekvencia

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile
1 5 10 15

Gln Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
20 25 30

Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
50 55 60

Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65 70 75 80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Gln
85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
100 105 110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser
115 120 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys
130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145 150 155 160

Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Ile Gln Lys
165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr

180 185 190
 Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195 200 205

 Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 210 215 220

 Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 225 230 235 240

 Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 245 250 255

 Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Glu Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
 260 265 270

 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser
 275 280 285

 Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 290 295 300

 Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
 305 310 315 320

 Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 325 330 335

 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
 340 345 350

 Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
 355 360 365

 Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
 370 375 380

 Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys

385 390 395 400

Leu

124. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 1355 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (ix) Tulajdonság:
 - (A) Név/kulcs: CDS
 - (B) Lokalizáció: 94..1296
- (xi) A szekvencia leírása: 124. számú szekvencia

GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCAC CGGAGCGCTC
GCCCAGCCGC 60

CGCTCCAAGC CCCTGAGGTT TCCGGGGACC ACA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 114

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

1 5

GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG 162

Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr

10 15 20

TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG 210

Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu

25 30 35

TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA 258

Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr

40 45 50 55

GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA 306

Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr

60 65 70

GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC 354

Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys

75 80 85

AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC 402

Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg

90 95 100

GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG 450

Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu

105 110 115

AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT GGA ACC 498

Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

120 125 130 135

CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA 546

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser

140 145 150

AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT 594

Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser

155 160 165

GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC 642

Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn

170 175 180

ATA TGT TCC GGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT 690

Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val

185 190 195

ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT 738

Thr Leu Cys Gln Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe

200 205 210 215

ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA 786

Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys

220 225 230

GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA 834

Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln

235 240 245

GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC 882

Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala

250 255 260

CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC 930

Glu Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Gln Asn

265 270 275

AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT 978

Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu

280 285 290 295

CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC 1026

Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Gln Asp

300 305 310

ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC CTG AAG 1074

Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys

315 320 325

CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG 1122

Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys

330 335 340

GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT CCC AAA 1170

Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys

345 350 355

ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC AGC TTC 1218

Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe

360 365 370 375

ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA GGT AAC 1266

Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn

380 385 390

CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA TAACTGGAAA TGGCCATTGA 1316

Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

395 400

GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGATAA 1355

125. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 401 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 125. számú szekvencia

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

20 25 30

Gln Gln Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro

50 55 60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys

65	70	75	80
Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu			
85	90	95	
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr			
100	105	110	
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe			
115	120	125	
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg			
130	135	140	
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys			
145	150	155	160
Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys			
165	170	175	
Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr			
180	185	190	
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg			
195	200	205	
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val			
210	215	220	
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Gln Arg Ile			
225	230	235	240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu			
245	250	255	
Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln			
260	265	270	

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 275 280 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 290 295 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
 305 310 315 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
 340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
 355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
 370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
 385 390 395 400

Leu

126. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 139 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Számtípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (xi) A szekvencia leírása: 126. számú szekvencia

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys

1 5 10 15

Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro

20 25 30

Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala

35 40 45

Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys

50 55 60

Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr

65 70 75 80

Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn

85 90 95

Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His

100 105 110

Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly

115 120 125

Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys

130 135

127. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 48 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 127. számú szekvencia

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA

48

128. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 219 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (xi) A szekvencia leírása: 128. számú szekvencia

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala

1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn

35 40 45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro

50 55 60

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro

65 70 75 80

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His

85 90 95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly

100 105 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg

115 120 125
 Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 130 135 140
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
 165 170 175
 Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
 195 200 205
 Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr
 210 215

129. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 280 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 129. számú szekvencia

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys

35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

 Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

 Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Glu Glu
 145 150 155 160

 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu

245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr
 275 280

130. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 207 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (xi) A szekvencia leírása: 130. számú szekvencia

Met Leu Arg Leu Ile Ala Leu Leu Val Cys Val Val Tyr Val Tyr Gly
 1 5 10 15

Asp Asp Val Pro Tyr Ser Ser Asn Gln Gly Lys Cys Gly Gly His Asp
 20 25 30

Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Cys Cys Ala Ser Cys His Pro Gly Phe Tyr
 35 40 45

Ala Ser Arg Leu Cys Gly Pro Gly Ser Asn Thr Val Cys Ser Pro Cys
 50 55 60

Glu Asp Gly Thr Phe Thr Ala Ser Thr Asn His Ala Pro Ala Cys Val
 65 70 75 80

Ser Cys Arg Gly Pro Cys Thr Gly His Leu Ser Glu Ser Gln Pro Cys
 85 90 95

Asp Arg Thr His Asp Arg Val Cys Asn Cys Ser Thr Gly Asn Tyr Cys
100 105 110

Leu Leu Lys Gly Gln Asn Gly Cys Arg Ile Cys Ala Pro Gln Thr Lys
115 120 125

Cys Pro Ala Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Arg Ala Gly Asp Thr
130 135 140

Leu Cys Glu Lys Cys Pro Pro His Thr Tyr Ser Asp Ser Leu Ser Pro
145 150 155 160

Thr Glu Arg Cys Gly Thr Ser Phe Asn Tyr Ile Ser Val Gly Phe Asn
165 170 175

Leu Tyr Pro Val Asn Glu Thr Ser Cys Thr Thr Thr Ala Gly His Asn
180 185 190

Glu Val Ile Lys Thr Lys Glu Phe Thr Val Thr Leu Asn Tyr Thr
195 200 205

131. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 227 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 131. számú szekvencia

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr

225

132. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 197 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Számtípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 132. számú szekvencia

Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

1 5 10 15

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu

20 25 30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr

35 40 45

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser

50 55 60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His

65 70 75 80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr

85 90 95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr

100 105 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly

115 120 125

Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His

130 135 140
 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Gln Lys
 145 150 155 160
 Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Gln Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
 165 170 175
 Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
 180 185 190
 Arg Ala Leu Leu Val
 195

133. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 208 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (xi) A szekvencia leírása: 133. számú szekvencia

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
 1 5 10 15
 Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
 20 25 30
 Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
 35 40 45
 Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
 50 55 60
 Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65 70 75 80
 Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu

85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg 100

105 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu

115 120 125

Gly Val Leu Glu Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg

130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys

145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Glu Lys

165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr

180 185 190

Glu Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

195 200 205

134. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 224 aminosav
 - (B) Típus: aminosav
 - (C) Számtípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 134. számú szekvencia

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys

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

135. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 205 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Szál típus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 135. számú szekvencia

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Phe Leu Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

Ser Leu Gly Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro

20 25 30

Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val

35 40 45

Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His pro Cys Glu Pro

50 55 60

Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr

65 70 75 80

Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro

85 90 95

Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln

100 105 110

Asp Ser Ser His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly

115 120 125

His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys

130 135 140

Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp

145 150 155 160

Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr
165 170 175

Glu Arg Thr Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp
180 185 190

Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val
195 200 205

136. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 191 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 136. számú szekvencia

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Glu Asn Ser Cys Asp Asn Cys Glu
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu
180 185 190

137. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 54 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 137. számú szekvencia

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA
TGTCCGCCGG 50 GTAC

54 138. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 380 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 138. számú szekvencia

Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His

1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His

20 25 30

Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser

35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro

50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His

65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe

85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala

100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe

115 120 125

Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn

130 135 140

Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His

145 150 155 160

Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile

165 170 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr

180 185 190

Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly

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

139. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hozes: 380 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 139. számú szekvencia

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile
165 170 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr
180 185 190

Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly
195 200 205

Thr Lys Val Asn Ala Gln Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser
210 215 220

Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn
225 230 235 240

Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys
245 250 255

Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu
260 265 270

Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala
275 280 285

Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile
290 295 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
305 310 315 320

Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe
325 330 335

Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His
340 345 350

Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
355 360 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
370 375 380

140. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 30 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 140. számú szekvencia

TGGACCACCC AGAAGTACCT TCATTATGAC 30

141. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 30 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 141. számú szekvencia

GTCATAATGA AGGTACTTCT GGGTGGTCCA 30

142. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 31 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (xi) A szekvencia leírása: 142. számú szekvencia

GGACCACCCA GCTTCATTAT GACGAAGAAA C 31

143. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 31 bázispár

- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 143. számú szekvencia

GTTCCTTCGT CATAATGAAG CTGGGTGGTC C

31

144. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 29 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 144. számú szekvencia

GTGGACCACC CAGGACGAAG AAACCTCTC

29

145. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 29 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 145. számú szekvencia

GAGAGGTTTC TTCGTCCTGG GTGGTCCAC

29

146. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) Hossz: 29 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 146. számú szekvencia

CGTTTCCTCC AAAGTTCCTT CATTATGAC

29

147. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 29 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 147. számú szekvencia

GTCATAATGA AGGAACTTTG GAGGAAACG

29

148. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 32 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 148. számú szekvencia

GGAAACGTTT CCTGCAAAGT ACCTTCATTA TG

32

149. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 32 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 149. számú szekvencia

CATAATGAAG GTACTTTGCA GGAAACGTTT CC

32

168. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 16 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 168. számú szekvencia

Met Lys His His His His His His Ala Ser Val Asn Ala

1

5

10

Leu Glu

15



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Polipeptid, ~~vagy~~ amely a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 22-401 aminosavait vagy ennek fragmensét vagy csonkolt részét tartalmazza, amelyhez egy vagy több vízdoldható polimer kapcsolódik, és ahol az említett polipeptid, annak fragmense vagy csonkolt része gátolja az oszteoklaszt-képződést.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 22-401 aminosavait tartalmazza.

3. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 22-401 aminosavainak egy fragmensét tartalmazza.

4. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely ^(125. számú szekvencia) a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia 22-401 aminosavainak egy csonkolt részét tartalmazza.

5. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amelyben a fragmens vagy csonkítás a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 180-401-es aminosavainak, vagy azok egy részének deléciója vagy C-terminális csonkolása.

6. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, ahol a fragmens vagy csonkolt rész a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 22-185 aminosavait tartalmazza.

7. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, ahol a vízdoldható polimer az alábbiak közül választott egy vagy több anyag: polietilén-glikol, etilén-glikol/propilén-glikol kopolimer, karboximetil-cellulóz, dextrans és polivinil-alkohol.

8. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, ahol a vízdoldható polimer a polipeptid egy meghatározott pozíciójában kapcsolódik.

9. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely kettő vagy több kapcsolódó vízoldható polimert tartalmaz.

10. A 7. igénypont szerinti polipeptid, amely az amino terminuson polietilén-glikollal módosított.

11. A 7. vagy 10. igénypont szerinti polipeptid, amelynél a polietilén-glikol molekulatömege az alábbiak közül egy vagy több lehet: 5 kD, 10 kD, 12 kD, 20 kD, 25 kD, 31 kD és 57 kD.

12. Térhálós oszteoprotegerin (OPG) dimer, amelyet egy vagy több vízoldható polimer képez, amelyek két olyan polipeptidhez kapcsolódnak illetve polipeptidet kötnek össze, amely polipeptidek a 9C-9D ábrákon látható aminosav-szekvencia (125. számú szekvencia) 22-401 aminosavait vagy ennek fragmensét vagy csonkolt részét tartalmazzák, és ahol az említett dimer gátolja az oszteoklaszt-képződést.

13. Gyógyászati készítmény, amely az 1. igénypont szerinti polipeptid vagy a 12. igénypont szerinti OPG dimer gyógyászatiilag hatásos mennyiségét tartalmazza egy gyógyászatiilag elfogadható hordozóban, adjuvánsban, szolubilizáló anyagban, stabilizáló anyagban és/vagy antioxidánsban.

14. Az 1. igénypont szerinti polipeptid vagy a 12. igénypont szerinti OPG dimer alkalmazása csontrendellenesség kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

15. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a csontrendellenesség nagymértékű csontvesztés.

16. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a csontrendellenesség egy vagy több, az alábbi csoportba tartozó rendellenesség: oszteoporózis, a csont Paget féle megbetegedése, hiperkalcémia, hiperparatiroidizmus, szteroid által indukált oszteopénia, reumás arthritis következtében létrejövő csontvesztés; oszteomiélfísz

következtében létrejövő csontvesztés; oszteolitikus metasztázis és periodontális csontvesztés.

17. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ^{a gyógyászati készítmény} azzal ^{terápiásan} jellemezve, hogy ^{hatékony mennyiséget adunk be} egy vagy több, az alábbi csoportból választott anyagból: BMP-1 - BMP-12 csontmorfogenikus fehérjék, a TGF- β család tagjai, IL-1 inhibitor, TNF α inhibitor, a paratiroid hormon és annak analógjai, a paratiroid hormonnal rokon fehérje és annak analógjai, az E sorozatba tartalmazó prosztaglandinok, a biszfoszfonátok, valamint a csonterősítő ásványi anyagok.

A meghatalmazott
Szentméri Tibor
százados, katonai ügyvivő
az S.B.G & K. Széchenyi Utcai Gyógyító Intézet
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

2011.02.03.

178 + 46 = 224 oldal

148 178 208 238 268 298
 FRI-1 ALLVFLDIIEWTTQETFPFKYLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHC TVRKTLCVPCPD
 SW: TNR2_HUMAN HALPAQVAFTFYAFEPGSTCRLEYYDQTAQMCCSKCSPGQHAHVCTKTSDTWCSCED
 30 40 50 60 70 80

328
 FRI-1 YSYTDSWHTS
 :||: |:
 SW: TNR2_HUMAN STYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPL
 90 100 110 120 130 140

FRI-1 69 YLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHC TVRKTLCV PCPDY SYTDSW
 | |. ... |. ||: |. | : | | || : |. |.
 TNFR profil 6 YHYDQNGRMCEECHMCQPGHFLVKHCKQPKRDTVCHKPCEPGVTYTDW

FRI-1 116 H
 |
 TNFR profil 56 H
 Z érték = 8.29

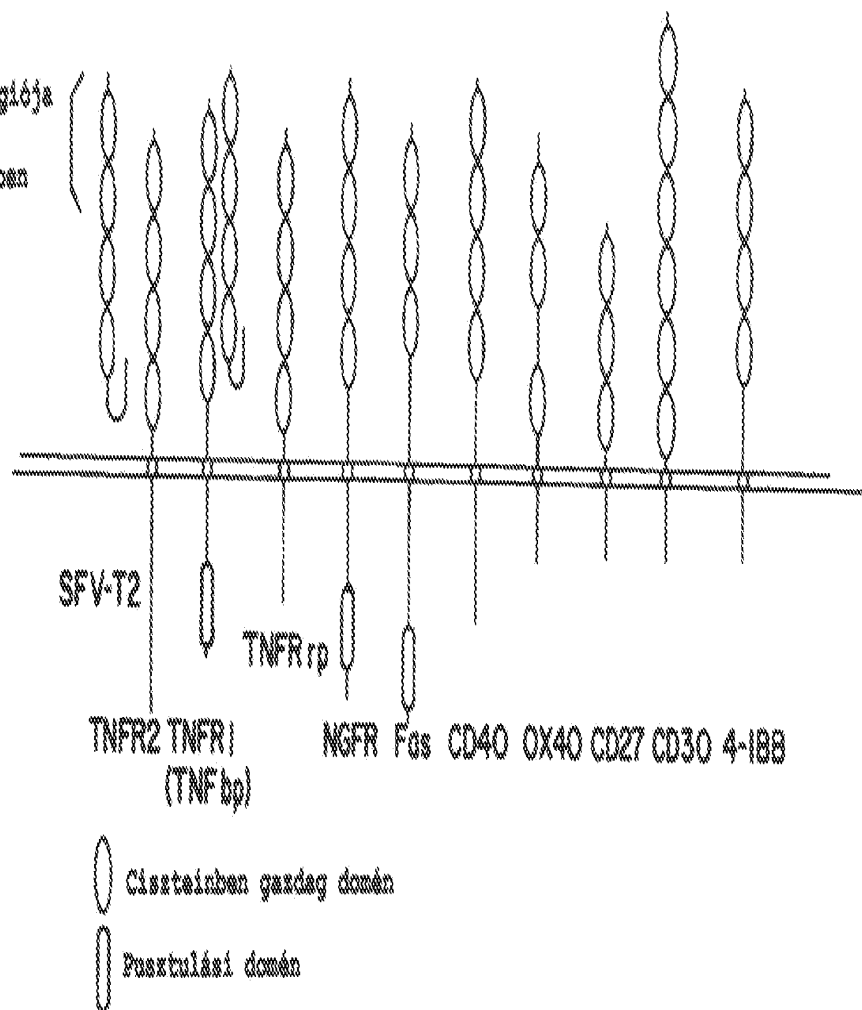
1A. ábra

1B. ábra

P0301122

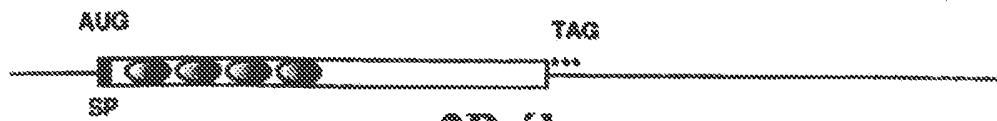
1/46

A homológia régiója
az FRI-1-ben



IC. ábra

2A.ábra

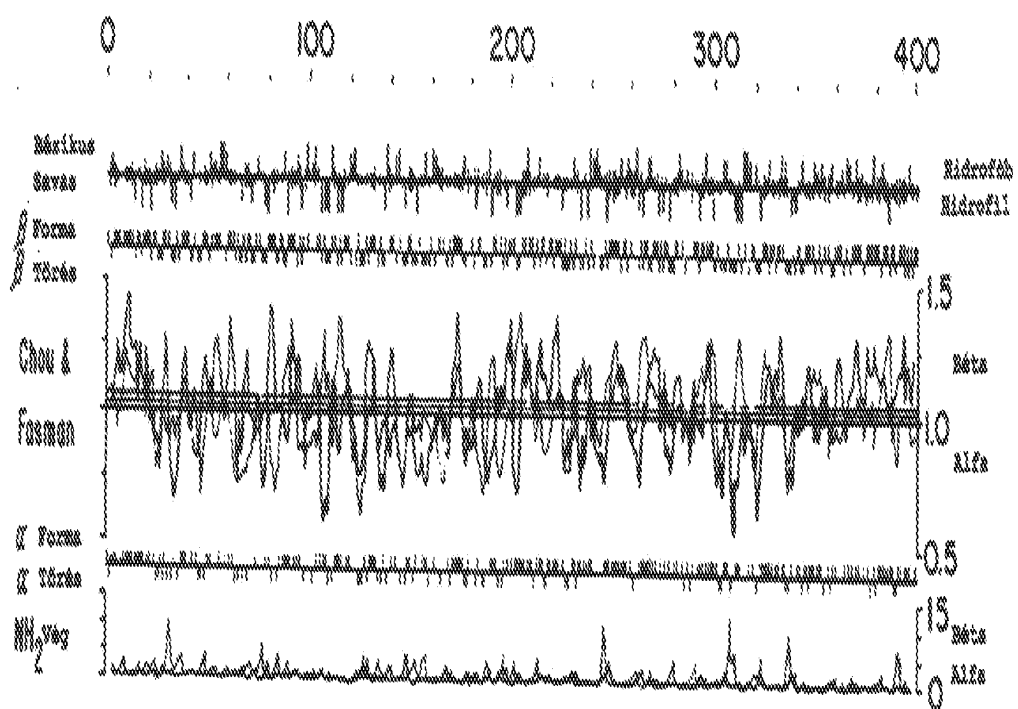


2B.ábra

10 30 50
 ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTGTTGCCAGACCTTATATAAAACGTCATGTTTCGCCTG
 70 90 110
 GGCAGCAGAGAAGCACCTAGCACTGGCCAGCGGCTGCCGCTGAGGTTTCCAGAGGACC
 130 150 170
 ACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGTGCACTCCTGGTGTCTTGGACATCATTTGAATGGACA
 M N K W L C C A L L V F L D I I E W T
 190 210 230
 ACCCAGGAAACCTTTCTCCAAAATACCTTGCAATTATGACCCAGAAACCGACGTCAGCTC
 T Q E T F P P K Y L H Y D P E T G R Q L
 250 270 290
 TTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTAAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAG
 L C D K C A P G T Y L K Q H C T V R R K
 310 330 350
 ACACTGTGTGTCCTTGGCCCTGACTACTCTTATACAGACAGCTGGCACACGAGTGTATGAA
 T L C V P C P D Y S Y T D S W H T S D E
 370 390 410
 TGCCTGTACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGAAGTGCAGACCGTGAAACAGGAGTGCACCCGC
 C V Y C S P V C K E L Q T V K Q E C M R
 430 450 470
 ACCCACAACCGAGTGTGCGAATGTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTTCTGCTTG
 T H N R V C E C E E G R Y L E L E F C L
 490 510 530
 AAGCACCGGAGCTGTCCCCCAGGCTTGGGTGTGCTGCAGGCTGGGACCCAGAGCGAAAC
 K H R S C P P G L G V L Q A G T P E R N
 550 570 590
 ACGGTTTGCAAAAGATGTCCGGATGGGTCTTCTCAGGTGAGACGTCATCGAAAGCACCC
 T V C K R C P D G F P S G E T S S K A P
 610 630 650
 TGTAGGAAACACACCAACTGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCA
 C R K H T M C S S L G L L L I Q K G M A
 670 690 710
 ACACATGACAATGTATGTTCCGGAAACAGAGAAGCAACTCAAAATTGTGGAATAGATGTC
 T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V
 730 750 770
 ACCCTGTGCGAAGAGGCATTCTTCAGGTTTGTGCTGTGCCTACCAAGATTATACCGAATTGG
 T L C E E A F F R F A V P T K I I P N W
 790 810 830
 CTGAGTGTCTGTGACAGTGTGCTGGGACCAAGTGAATGCAGAGAGTGTAGAGAGG
 L S V L V D S L P G T K V N A E S V E R
 850 870 890
 ATAAAACGGAGACACAGCTCGCAAGAGCAAACTTTCCAGCTACTTAAGCTGTGGAAGCAT
 I K R R H S S Q E Q T F Q L L K L W K H
 910 930 950
 CAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATCATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC
 Q N R D Q E M V K K I I Q D I D L C E S
 970 990 1010
 AGTGTGCAACGGCATATCGCCACCGCAACCTCACCACAGAGCAGCTCCGCATCTTGATG
 S V Q R H I G H A M L T T E Q L R I L M

2C.ábra

1030 1050 1070
 GAGAGCTTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGACGAGATTGAGAGAACCAGAAAGACCTGC
 E S L P G K K I S P D E I E R T R K T C
 1090 1110 1130
 AAACCCAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTGAGCTTGTGGAGGATCAAAAATGGAGACCAA
 K P S E Q L L K L L S L W R I K N G D Q
 1150 1170 1190
 GACACCTTGAAGGGCCTGATGTACGCACTCAAGCACCTTGAAGCATAACCACTTTCCCAA
 D T L K G L M Y A L K H L K A Y H F P K
 1210 1230 1250
 ACCGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATCAGGTTCTTGCACAGCTTCACCATGTACCGA
 T V T H S L R K T I R F L H S F T M Y R
 1270 1290 1310
 TTGTATCAGAAACTCTTTCTAGAAATGATAGGGAATCAGGTTCAATCAGTGAAGATAAGC
 L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S
 1330 1350 1370
 TGCTTATAGTTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTTCTTCAGGATGGGCCAACACTGATGGAG
 C L
 1390 1410 1430
 CAGATGGCTGCTTCTCCGGCTCTTGAAATGGCAGTTGATTCTTTCTCATCAGTTGGTGG
 1450 1470 1490
 GAATGAAGATCCTCCAGCCCAACACACACACTGGGGAGTCTGAGTCAGGAGAGTGAGGCA
 1510 1530 1550
 GGCTATTTTGATAATTGTGCAAAGCTGCCAGGTGTACACCTAGAAAGTCAAGCACCCCTGAG
 1570 1590 1610
 AAAGAGGATATTTTTATAACCTCAAACATAGGCCCTTTCTCTCTCTCTTATGGATGAG
 1630 1650 1670
 TACTCAGAAGGCTTCTACTATCTTCTGTGTATCCCTAGATGAAGGCCTCTTTTATTTAT
 1690 1710 1730
 TTTTTTATTTCTTTTTTTCGGAGCTGGGGACCGAACCCAGGGCCTTGGGCTTGGGAGGCAA
 1750 1770 1790
 GTGCTCTACCACTGAGCTAAATCTCCAACCCCTGAAGGCCCTTTCTTTCTGCCTCTGAT
 1810 1830 1850
 AGTCTATGACATTTCTTTTTTCTACAATTCGTATCAGGTGCACGAGCCTTATCCCATTGT
 1870 1890 1910
 AGGTTTCTAGGCAAGTTGACCGTTAGCTATTTTTCCCTCTGAAGATTGATTCGAGTTGC
 1930 1950 1970
 AGACTTGGCTAGACAAGCAGGGGTAGGTTATGGTAGTTTATTTAACAGACTGCCACCAGG
 1990 2010 2030
 AGTCCAGTGTCTTGTTCCTCTGTAGTTGTACCTAAGCTGACTCCAAGTACATTTAGTA
 2050 2070 2090
 TGAAAAATAATCAACAAATTTTATTCCTTCTATCAACATTGGCTAGCTTTGTTTCAGGGC
 2110 2130 2150
 ACTAAAAGAACTACTATATGGAGAAAGAATTGATATTTGCCCCCAACGTTCAACAACCCA
 2170 2190 2210
 ATAGTTTATCCAGCTGTCATGCCTGGTTTCAGTGTCTACTGACTATGCGCCCTCTTATTAC
 2230 2250 2270
 TGCATGCAGTAATTCAACTGGAAATAGTAATAATAATAATAGAAATAAAATCTAGACTCC
 2290 2310 2330
 ATTGGATCTCTCTGAATATGGGAATATCTAACTTAAGAAGCTTTGAGATTTAGTTGTGT
 2350 2370 2390
 TAAAGGCTTTTATTAAGAGCTGATGCTCTTCTGTAAAAGTTACTAATATATCTGTAAGA
 2410 2430
 CTATTACAGTATPGCTATTTATATCCATCCAG



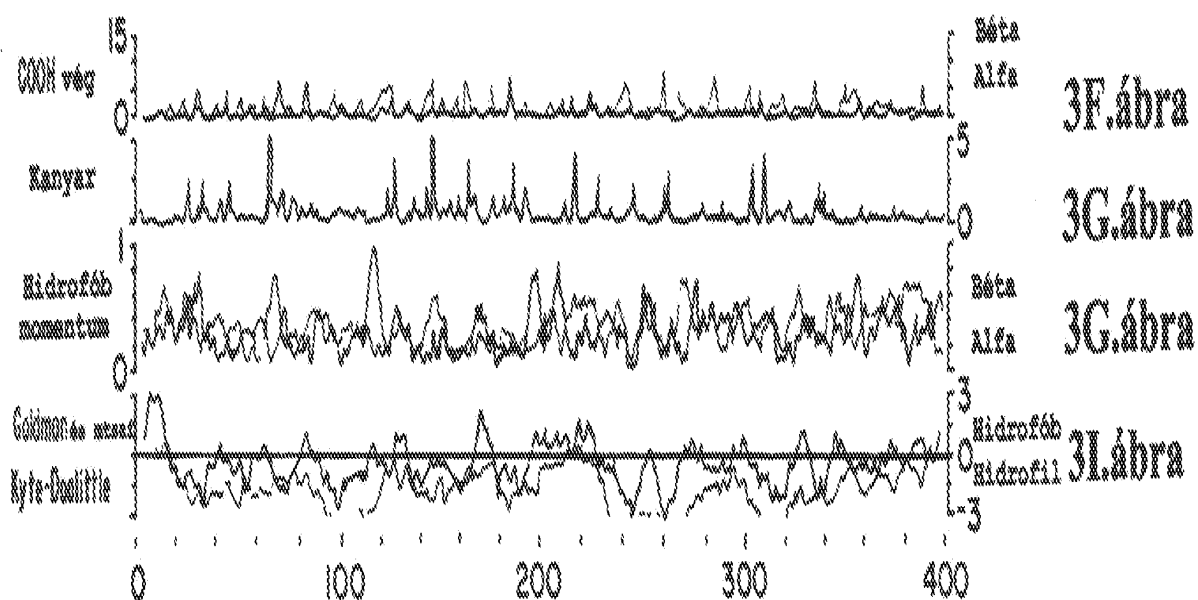
3A.ábra

3B.ábra

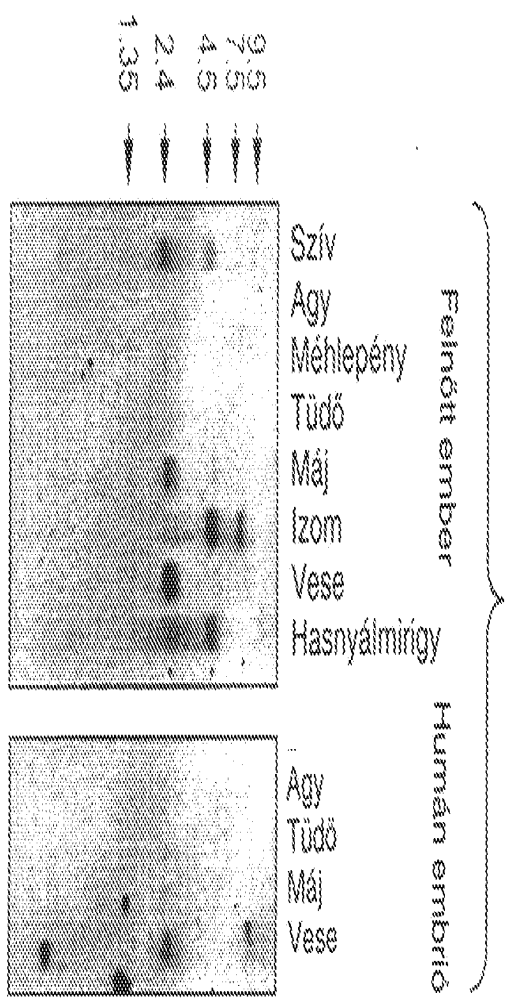
3C.ábra

3D.ábra

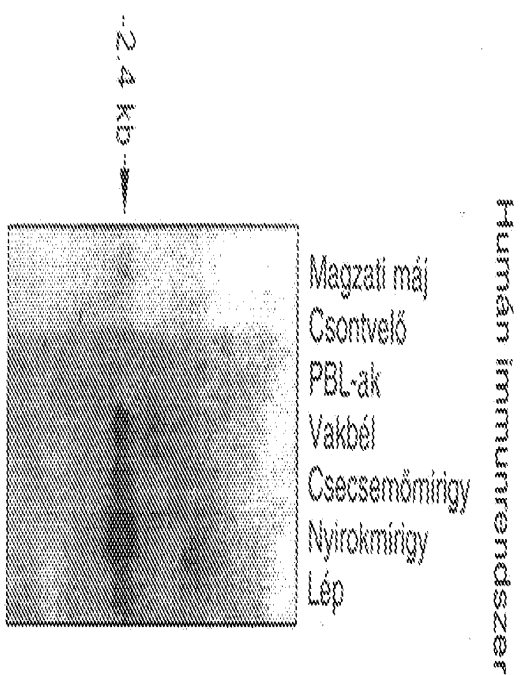
3E.ábra



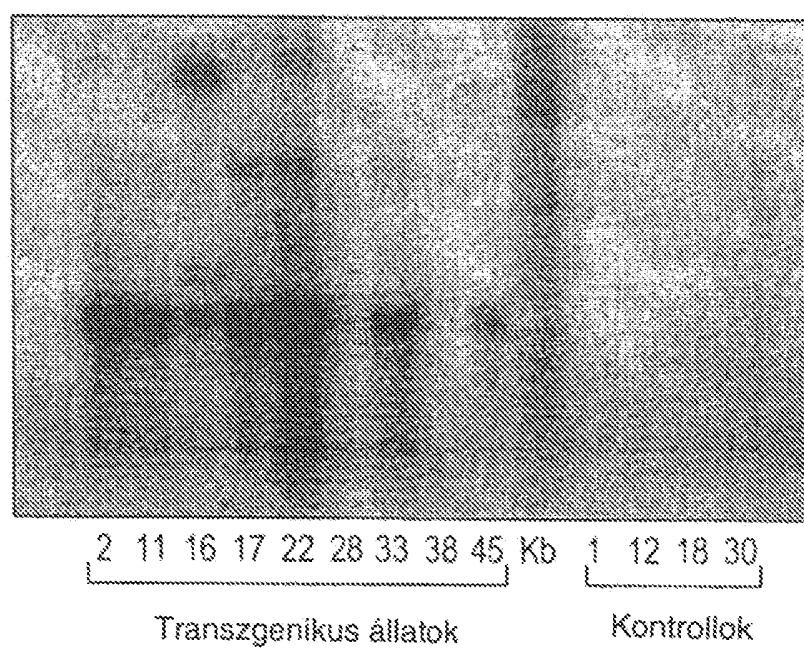
4A. ábra



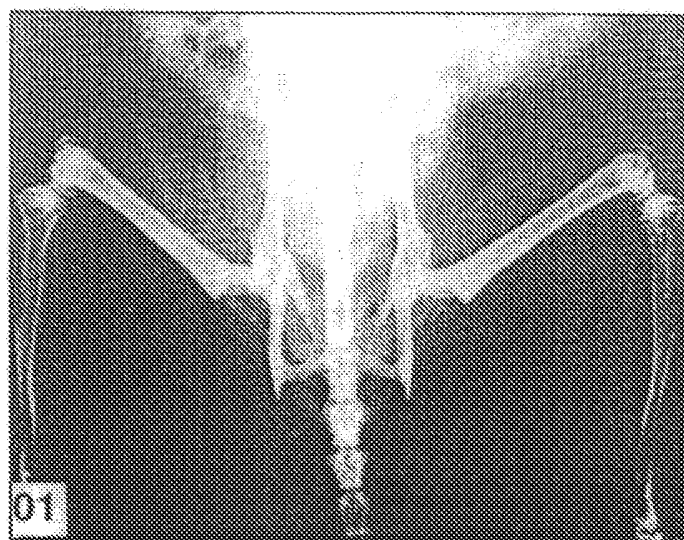
4B. ábra



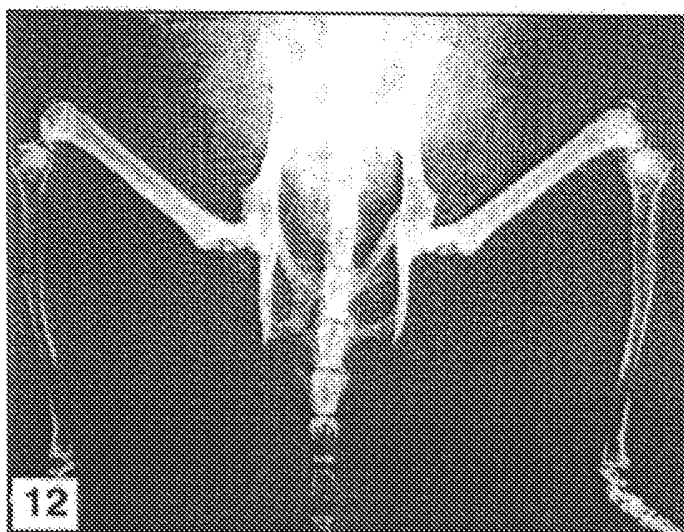
5. ábra



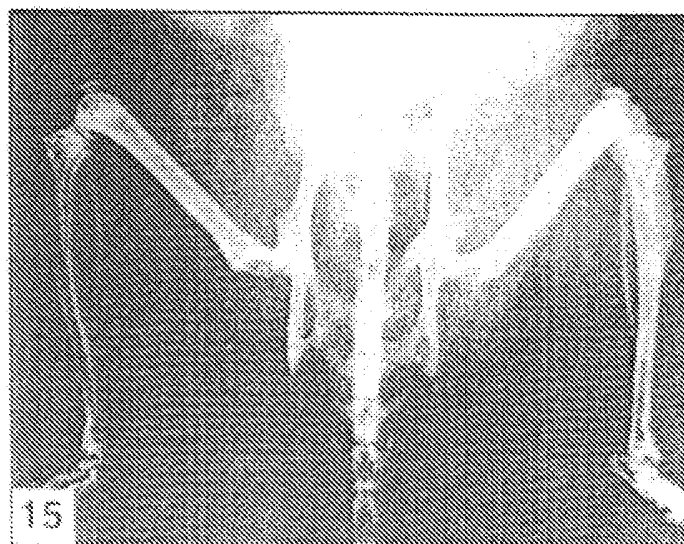
6A. ábra



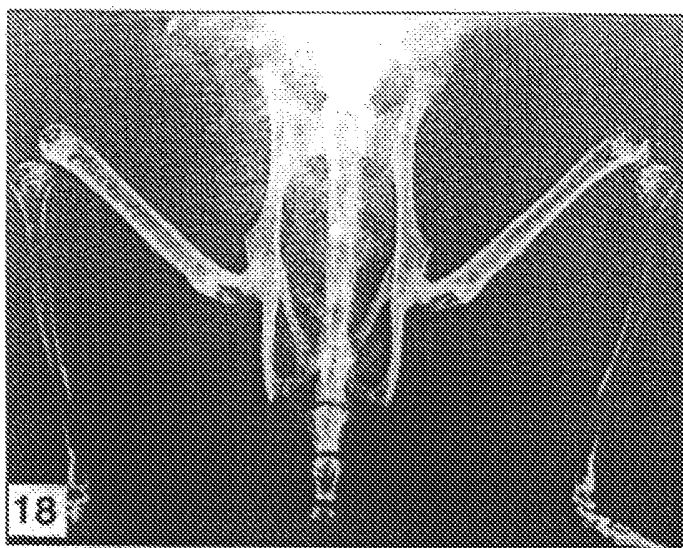
6B. ábra



6C. ábra



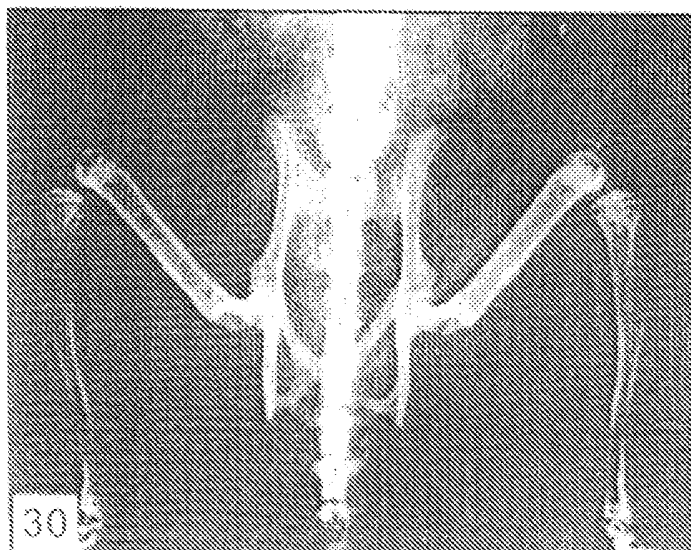
6D. ábra



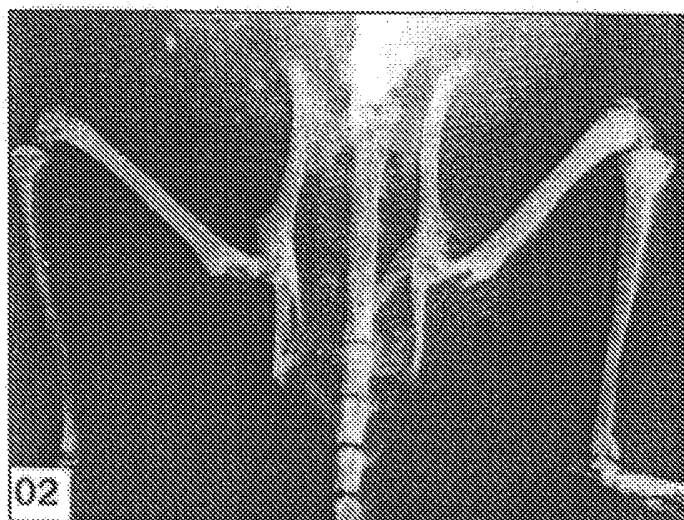
6E. ábra



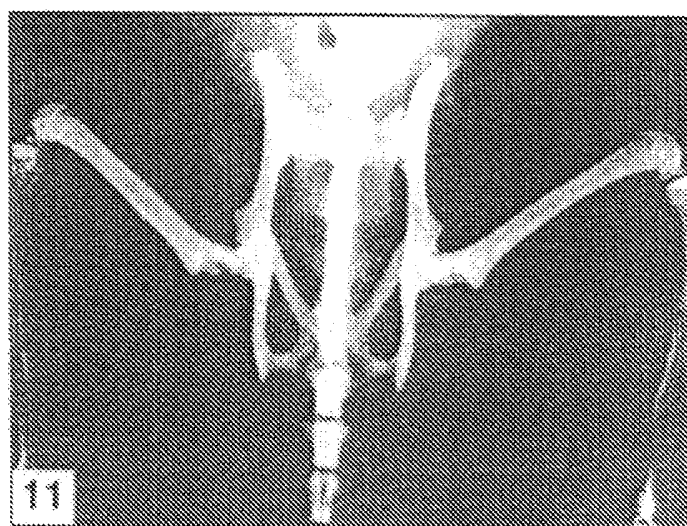
6F. ábra



6G. ábra



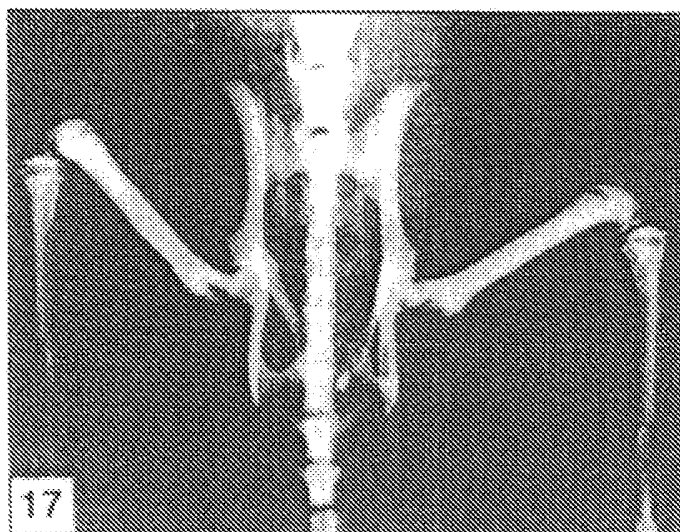
6H. ábra



6I. ábra



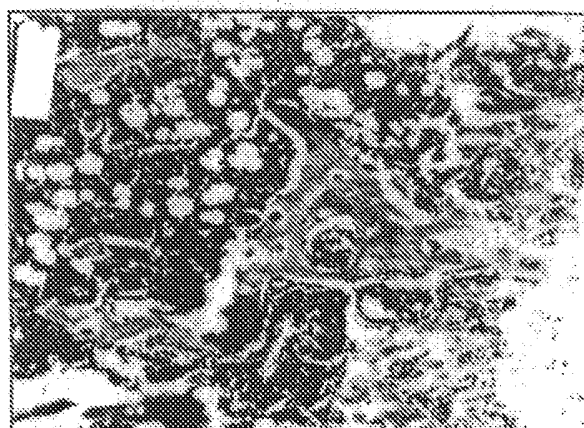
6J. ábra



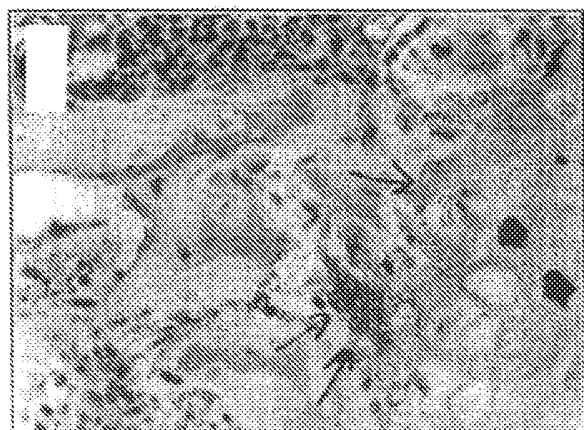
7A. ábra



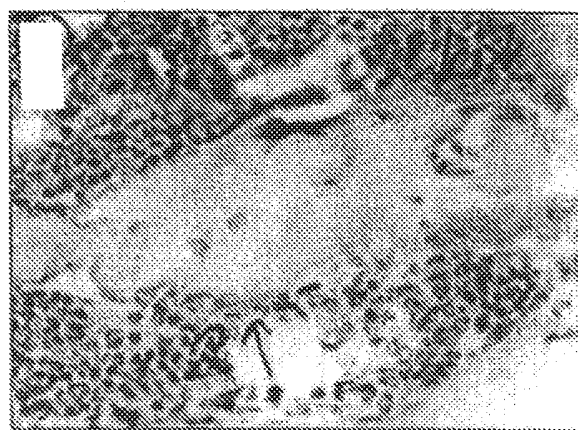
7B. ábra



7C. ábra



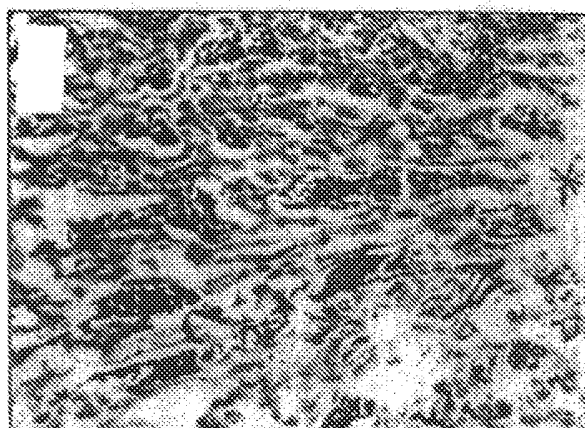
7D. ábra



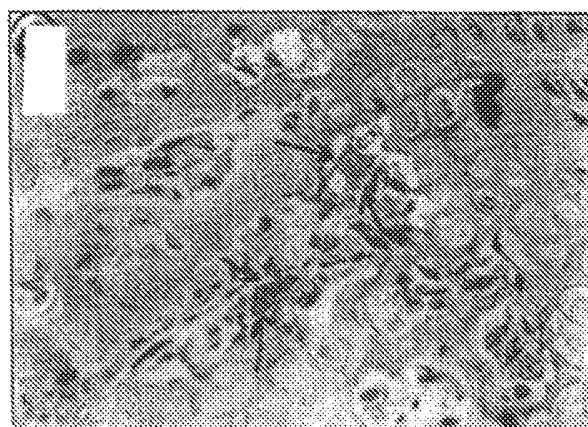
7E. ábra



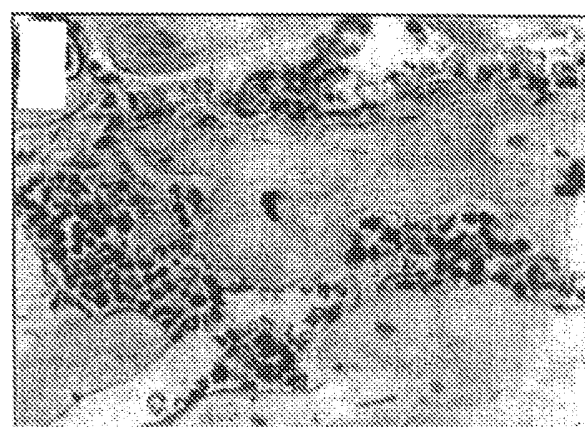
7F. ábra



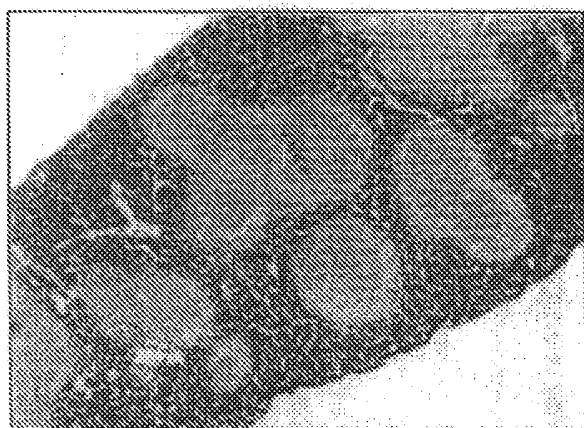
7G. ábra



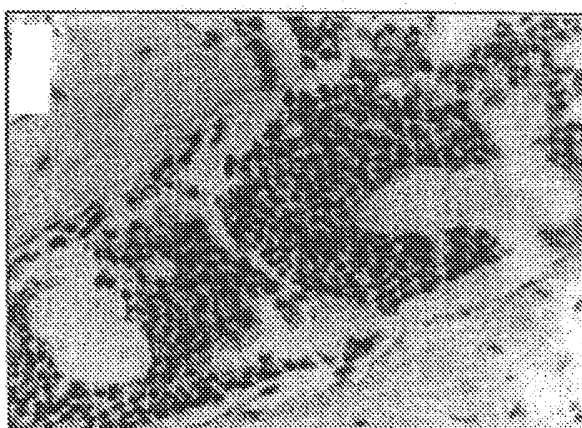
7H. ábra



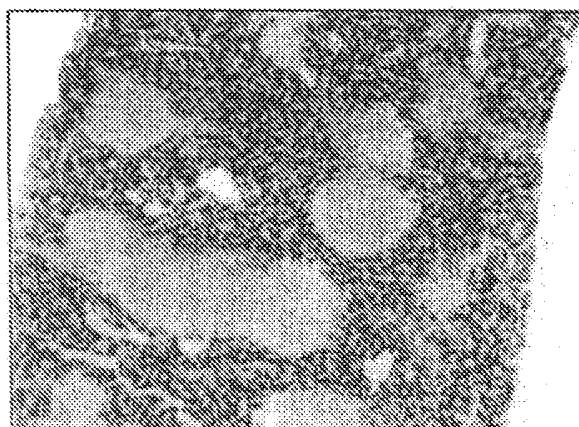
8A. ábra



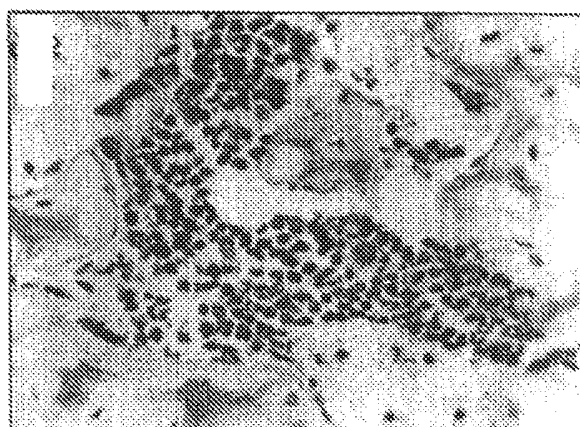
8B. ábra



8C. ábra



8D. ábra



9A. ábra

10 30 50
 CCTTATATAARACGTCATGATTGCCTGGCTGCAGAGACGCACCTAGCACTGACCCAGCG
 70 90 110
 GCTGCCCTCCTGAGGTTTCCCGAGGACCACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGCCCACTCCTG
 M N K W L C C A L L
 130 150 170
 GTGCTCCTGGACATCATTGAATGGACAACCCAGGAAACCCCTTCCTCCAAAGTACTTGCAT
 V L L D L L E W T T Q E T L P P K Y L H
 190 210 230
 TATGACCCAGAACTGGTCATCAGCTCCTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTA
 Y D P E T G H Q L L C D K C A P G T Y L
 250 270 290
 AAACAGCACTGCACAGTGAGGAGGAAGACATTGTGTGTCCCTTGCCCTGACCACTCTTAT
 K Q H C T V R R K T L C V P C P D H S Y
 310 330 350
 ACGGACAGCTGGCACACCACTGATGAGTGTGTGTATTGTCAGCCCAGTGTGCAAGGAACTG
 T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L
 370 390 410
 CAGTCCGTGAAGCAGGAGTGCAACCCGACCCACAACCCGAGTGTGTGAGTGTGAGGAAGGG
 Q S V K Q E C M R T H N R V C E C E E G
 430 450 470
 CGTTACCTGGAGATCGAATTCTGCTTGAAGCACCAGAGCTGTCCCCCGGGCTCCGGCGTG
 R Y L E I E F C L K H R S C P P G S G V
 490 510 530
 GTGCAAGCTGGAACCCAGAGCGAAACACAGTTTGCAAAAAATGTCCAGATGGGTTCTTC
 V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F
 550 570 590
 TCAGGTGAGACTTCATCGAAAGCACCCCTGTATAAAACACACGAACTGCAGCACATTGCGC
 S G E T S S K A P C I K H T M C S T F G
 610 630 650
 CTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCAACACATGACAACGTGTGTCCCGAAACAGAGAA
 L L L I Q K G M A T H D N V C S G N R E
 670 690 710
 GCCACGCAAAAGTGTGGAATAGATGTCACCCCTGTGTGAAGAGGCCTTCTTCAGGTTTGCT
 A T Q K C G I D V T L C E E A F F R F A
 730 750 770
 GTTCCTACCAAGATTATACCAAATTGGCTGAGTGTGTTTGGTGGACAGTTTGCTGGGACC
 V P T K I I P N W L S V L V D S L P G T

9B. ábra

790 810 830
 AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAGAGCAAACC
 K V N A E S V E R I K R R H S S Q E Q T
 850 870 890
 TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC
 F Q L L K L W K H Q N R D Q E M V K K I
 910 930 950
 ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGCAGCGCATCTCGGCCACTCGAACCTC
 I Q D I D L C E S S V Q R H L G H S M L
 970 990 1010
 ACCACAGAGCAGCTTCTTGCCTTGATGGAGAGCCTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGAA
 T T E Q L L A L M E S L P G K K I S P E
 1030 1050 1070
 GAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGCAAATCGAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTCAGT
 E I E R T R K T C K S S E Q L L K L L S
 1090 1110 1130
 TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG
 L W R I K N G D Q D T L K G L M Y A L K
 1150 1170 1190
 CACTTGA AAAACATCCCACCTTTC CCAAAACTGT CACCCACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG
 H L K T S H F P K T V T H S L R K T M R
 1210 1230 1250
 TTCCTGCACAGCTTCACAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTCTTTTGTAGAAATGATAGCG
 F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G
 1270 1290 1310
 AATCAGGTTCAATCCGTGAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTT
 N Q V Q S V K I S C L
 CTTCA

9C. ábra

10 30 50
GTATATATAACGTGATGAGCGTACGGGTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTCGCCCAGCCGC
70 90 110
CGYCTCCAAGCCCCCTGAGGTTTCCGGGGACCACAATGAACAAGTTGCTGTGCTGCGCGCT
130 150 170
CGTGTTCCTGGACATCTCCATTAAAGTGGACACCCAGGAAACGTTTCCTCCAAAOTACCT
V F L D I S L K W T T O E T F P P K Y L
190 210 230
TCATTATGACGAAGAAACCTCTCATCAGCTGTTGTGTGACAAATGTCCTCCTGGTACCTA
H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y
250 270 290
CCTAAAACAACACTGTACAGCAAAGTGAAGACCGTGTGCGCCCCCTGCCCCTGACCACTA
L K Q H C T A K W K T V C A P C P D H Y
310 330 350
CTACACAGACAGCTGGCACACCAGTGACGAGTGTCTATACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGA
Y T D S W H T S D E C L Y C S P V C K E
370 390 410
GCTGCAGTACGTCAAGCAGGAGTGCAATCGCACCCACAACCGCGTGTGCGAATGCAAGGA
L Q Y V K Q E C M R T H N R V C E C K E
430 450 470
AGGGCGCTACCTTGAGATAGAGTTCTGCTTGAAACATAGGAGCTGCCCTCCTGGATTG
G R Y L E I E F C L K H R S C P P G F G
490 510 530
AGTGGTGCAAGCTGGAACCCAGAGCGAAATACAGTTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTT
V V Q A G T P E R N T V C K R C P D G F
550 570 590
CTTCTCAAATGAGACGTCTATCTAAAGCACCCCTGTAGAAAACACACAAATGTCAGTGTCTT
F S M E T S S K A P C R R H T M C S V F
610 630 650
TGGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGGAAATGCAACACACGACAACATATGTTCCGGAAACAG
G L L L T Q K G N A T H D N I C S G N S
670 690 710
TGAATCAACTCAAAAATGTGGAATAGATGTTACCCCTGTGTGAGGAGGCATCTTCAGGTT
E S T Q K C G I D V T L C E E A F F R F
730 750 770
TGCTGTTCTTACAAAGTTTACGCCTAACTGGCTTAGTGTCTTGGTAGACAATTTGCCTGG
A V P T K F T P N W L S V L V D N L P G

9D. ábra

```

      790      810      830
CACCAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGAGAGGATAAACGGCAACACAGCTCACAAGAACA
T K V N A E S V E R I K R Q H S S Q E Q
      850      870      890
GACTTTCAGCTGCTGAAGTTATGGAAACATCAAACAAAGACCAAGATATAGTCAAGAA
T F Q L L K L W K H Q N K D Q D I V K K
      910      930      950
GATCATCCAAGATATTGACCTCTGTGAAAACAGCGTGCAGCGGCACATTGGACATGCTAA
I I Q D I D L C E N S V Q R H I G H A M
      970      990     1010
CCTCACCTTCGAGCAGCTTCGTAGCTTGATGGAAAGCTTACCGGGAAGAAAGTGGGAGC
L T F E Q L R S L M E S L P G K K V G A
     1030     1050     1070
AGAAGACATTGAAAAAACAATAAAGGCATGCAAACCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCT
E D I E K T I K A C K P S D Q I L K L L
     1090     1110     1130
CAGTTTGTGGCGAATAAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCACT
S L W R I K N G D Q D T L K G L M H A L
     1150     1170     1190
AAAGCACTCAAAGACGTACCACCTTCCCAAACCTGTCACTCAGAGTCTAAAGAAGACCAT
K H S K T Y H F P K T V T Q S L K K T I
     1210     1230     1250
CAGGTTCCCTTCACAGCTTCACAATGTACAAATTGTATCAGAAGTTATTTTGTAGAAATGAT
R F L H S F T M Y K L Y Q K L F L E M I
     1270     1290     1310
AGGTAACCAGGTCCAATCAGTAAAAATAAGCTGCTTATAACTGGAAATGCCATTGAGCT
G N Q V Q S V K I S C L
     1330     1350
GTTTCCTCACAATTGGCGAGATCCCATGGATGATAA

```

9E. abra

muosteo.fry	NNKWLCCALLVLLDIIEWTTQETLPPKYLHYDPETGRQLLCDKCA?GTYL	50
ratosteo.fry	NNKWLCCALLVFLDIIEWTTQETLPPKYLHYDPETGRQLLCDKCA?GTYL	50
huosteo.fry	NNKLLCCALVFLDIISLIEWTTQETLPPKYLHYDEETSHQLLCDKCA?GTYL	50
muosteo.fry	KQHCTVRRKTLCVPCPDHSYTDSDWHTSDKCVYCSPVCKELQSVKQECNRT	100
ratosteo.fry	KQHCTVRRKTLCVPCPDHSYTDSDWHTSDKCVYCSPVCKELQTVKQECNRT	100
huosteo.fry	KORCTAKWRTVCLAPCPDHSYTDSDWHTSDKCLYCSPVCKELQTVKQECNRT	100
muosteo.fry	NNRVCECEEGRYLEIEFCLKHNSCPFGISGVVQAGTFRNTVCKKCPDGFF	150
ratosteo.fry	NNRVCECEEGRYLEIEFCLKHNSCPFGLVLLQAGTFRNTVCKKCPDGFF	150
huosteo.fry	NNRVCECKEGRYLEIEFCLKHNSCPFGVGVVQAGTFRNTVCKKCPDGFF	150
muosteo.fry	SGETSSKAPCIKHYTNCSTFGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQKCGIDVT	200
ratosteo.fry	SGETSSKAPCKKHYTNCSTLGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQKCGIDVT	200
huosteo.fry	SNGETSSKAPCKKHYTNCSTVFGLLLTQKGNATHDNICSGNSESTQKCGIDVT	200

muosteo.frg	LCCEAFPRFAVPTKIIFNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRRHSSQEQT	250
ratosteo.frg	LCCEAFPRFAVPTKIIFNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRRHSSQEQT	250
huosteo.frg	LCCEAFPRFAVPTKIIFNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRRHSSQEQT	250

muosteo.frg	FQLLELWKRQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRHLCGHSNLTTEQLLALME	300
ratosteo.frg	FQLLELWKRQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRHLCGHSNLTTEQLLALME	300
huosteo.frg	FQLLELWKRQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRHLCGHSNLTTEQLLALME	300

muosteo.frg	SLPGKKISPEEIERTRKTCESSEQLLELLSLWRIKNGDQDTLKGSLMYALE	350
ratosteo.frg	SLPGKKISPEEIERTRKTCESSEQLLELLSLWRIKNGDQDTLKGSLMYALE	350
huosteo.frg	SLPGKKISPEEIERTRKTCESSEQLLELLSLWRIKNGDQDTLKGSLMYALE	350

muosteo.frg	HLKTSHPFKTVTHSLRKTIRFLHSPTHYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC	400
ratosteo.frg	HLKTSHPFKTVTHSLRKTIRFLHSPTHYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC	400
huosteo.frg	HLKTSHPFKTVTHSLRKTIRFLHSPTHYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC	400

muosteo.frg	L	401
ratosteo.frg	L	401
huosteo.frg	L	401

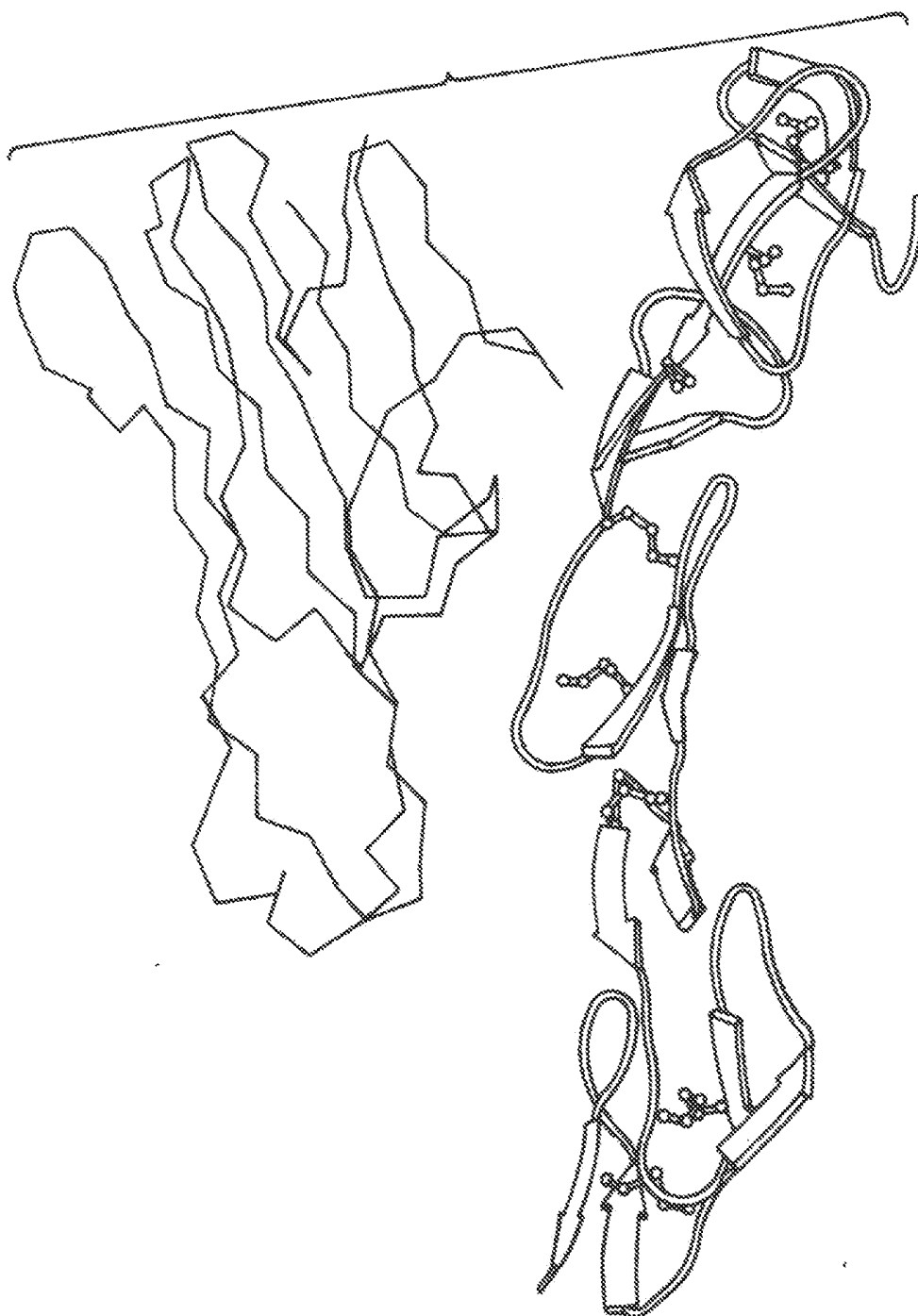
10. 3012

lcarr C[P]Q-GK[Y]IHPQNN[SI]C[CT]K[CH]K[GT]YL[YND]C[PG]FGQD[T]D[CR]E[CE]SGS[PT]A[S] 49
humsta P[P]KYLH[Y]DEETSHQLL[C]D[K]C[P]GTYL[KQH]C[TAK-WK]TVCA[P]C[PD]RY[YTD]S 49

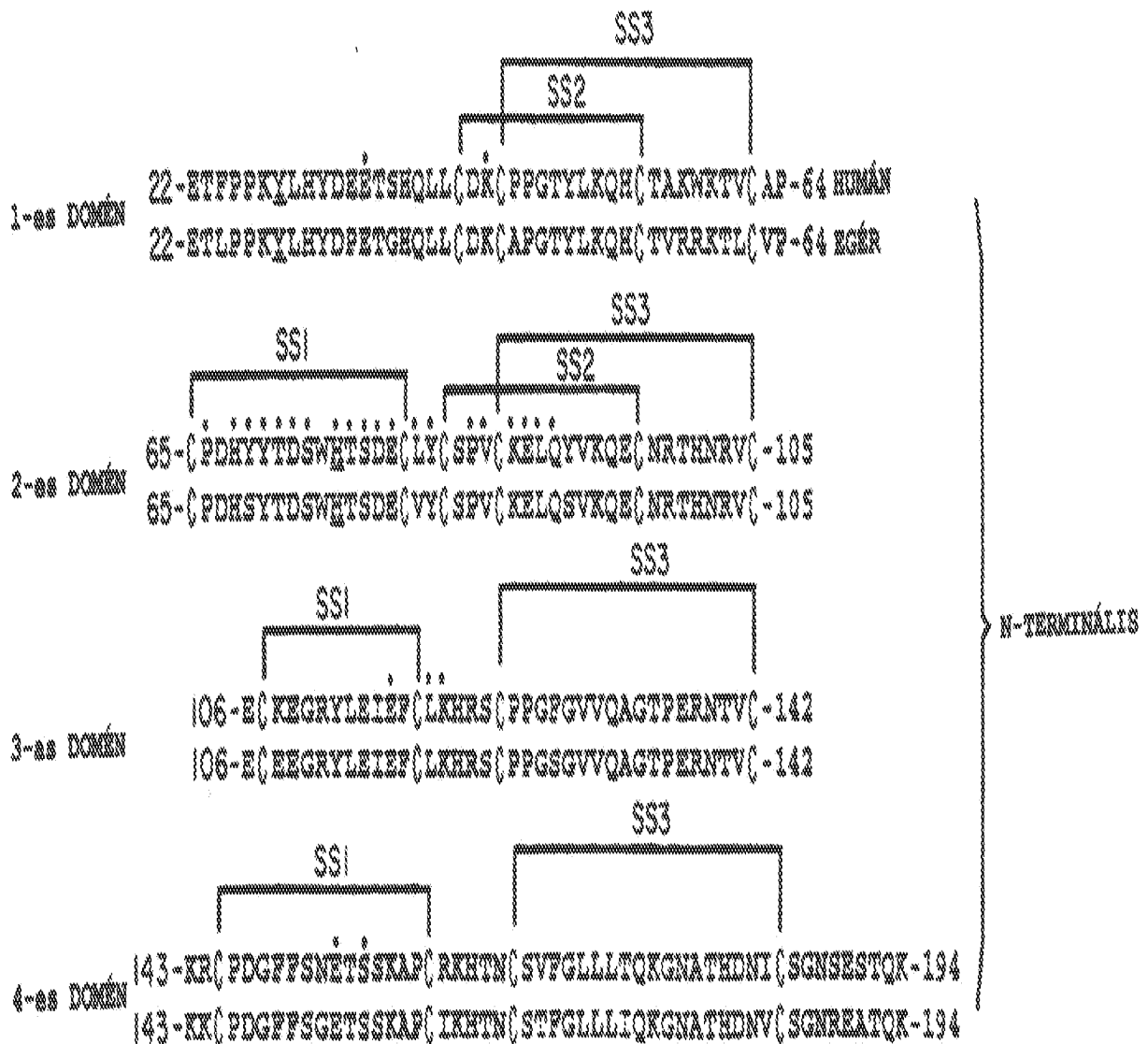
lcarr ENHLR[N]C[L]S[CS]-K[CR]K[EM]GQ[V]EISS[CT]VD[RD]T[VCG]C[CK]N[Q]Y[RHY]WSEN[L]P 98
humsta WNTSDE[C]L[Y]C[SP]V[C]-K[EL]QY[V]K-QE[CH]R[TH]N[VCE]C[KE]GR[Y]LEI---P-[F] 98

lcarr Q[C]P[N]C[S]L[C]L[N]G-T[V]HLS[C]QEKQ[NT]VCT-[CH]A[G]F[FL]R[E]---N[E]C[V]S[C] 119
humsta -[C]L[K]H[R]S[C]P[P]G[F]G[V]VQACTPER[NT]VCR[C]P[D]G[F]FSN[E]TSSKAP[C]RKH 119

11. ábra



12A. ábra



12B. abra

195-~~Q~~SDVTL~~C~~EAFFRFAVPTKPTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESSVERIKRQHSS-246

195-~~Q~~SDVTL~~C~~EAFFRFAVPTKIIPNWLSVLVDSLPGTKVNAESSVERIKRRHSS-246

247-QEQT~~F~~QLLKLWKNQNDQDIVKKIIQDIDL~~C~~ENSVQRNIGHANLTPEQLRSL-298

247-QEQT~~F~~QLLKLWKNQNRDQEMVKKIIQDIDL~~C~~ESSVQRHLGHSNLTTEQLLAL-298

299-MESLPGKKVGAEDIEKTIK~~A~~KPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLGLMHALK-350

299-MESLPGKKISP~~E~~EIERTRKTK~~S~~SEQLLKLLSLWRIKNGDQDTLGLMYALK-350

351-HSKTYHFPKTVTQSLKXTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKIS~~L~~-401

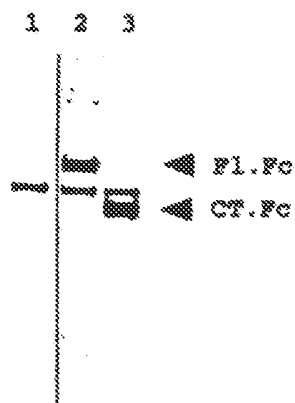
351-HLKTSHFPKTVTHSLKXTMRFLHSFTMYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKIS~~L~~-401

C-TERMINÁLIS

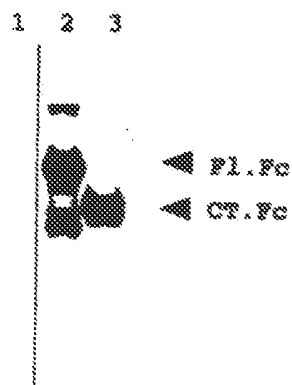
13A. ábra



13B. ábra



13C. ábra



1.4A. ábrák

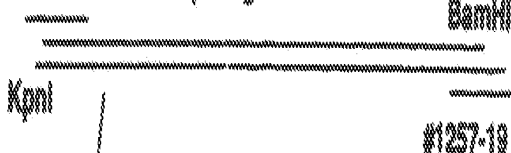


NdeI tapadós vég

KpnI tapadós vég

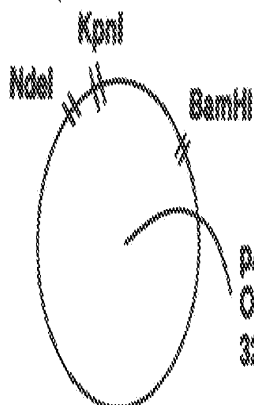
TATGGATGAAGAACTTCTCATCAGCTGCTGTGTGATAAATGTCCGCCGGGTAC
ACCTACTTCTTTGAAGAGTAGTCGACGACACACTATTTACAGGCGGCC

#1257-20 hu Osteoprotegerin PCR termék



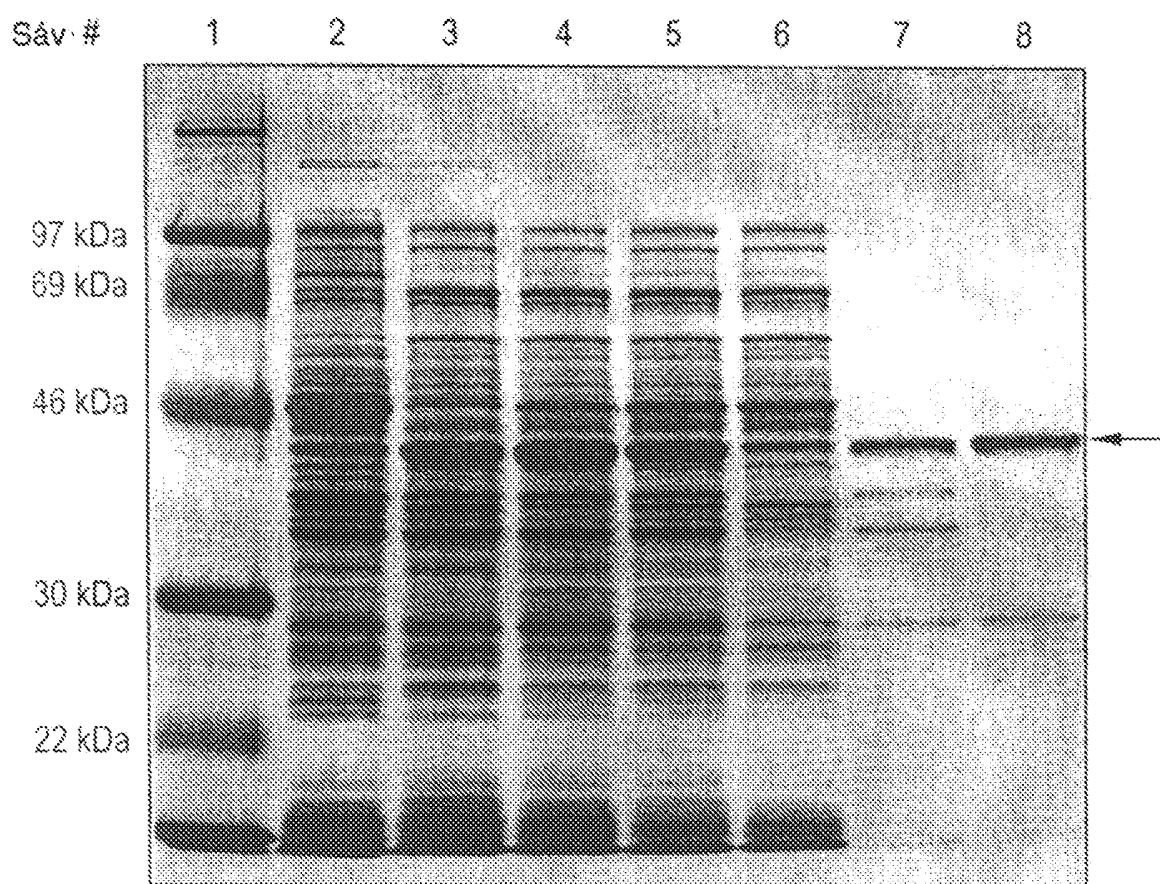
A fragmens

Oligo Linker & PCR termék

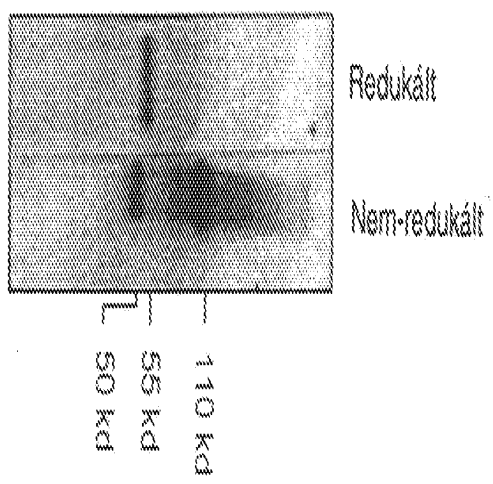


pAMG21-humán-
OSTEOPROTEGERIN-
32-401

14B. ábra



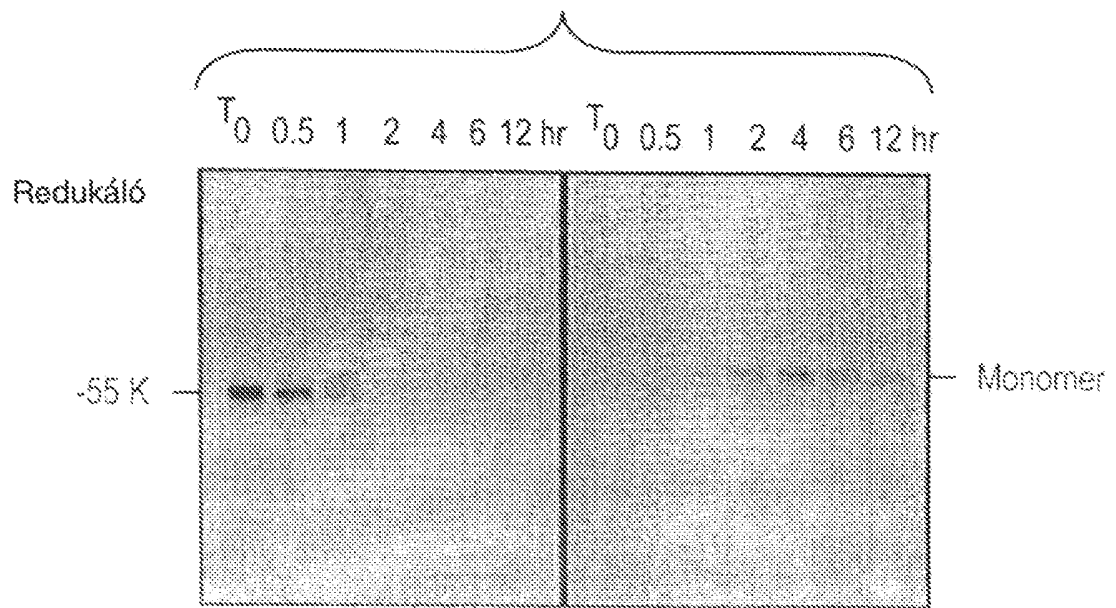
15. ábra

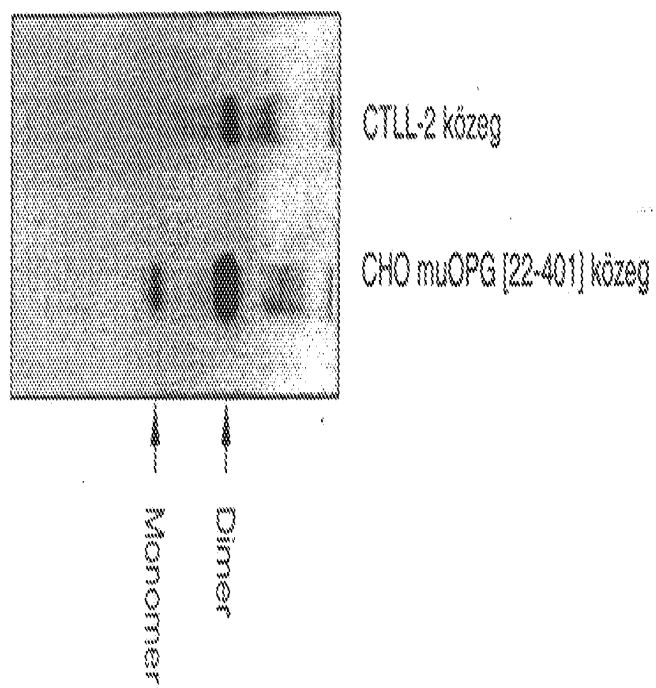


16A. ábra



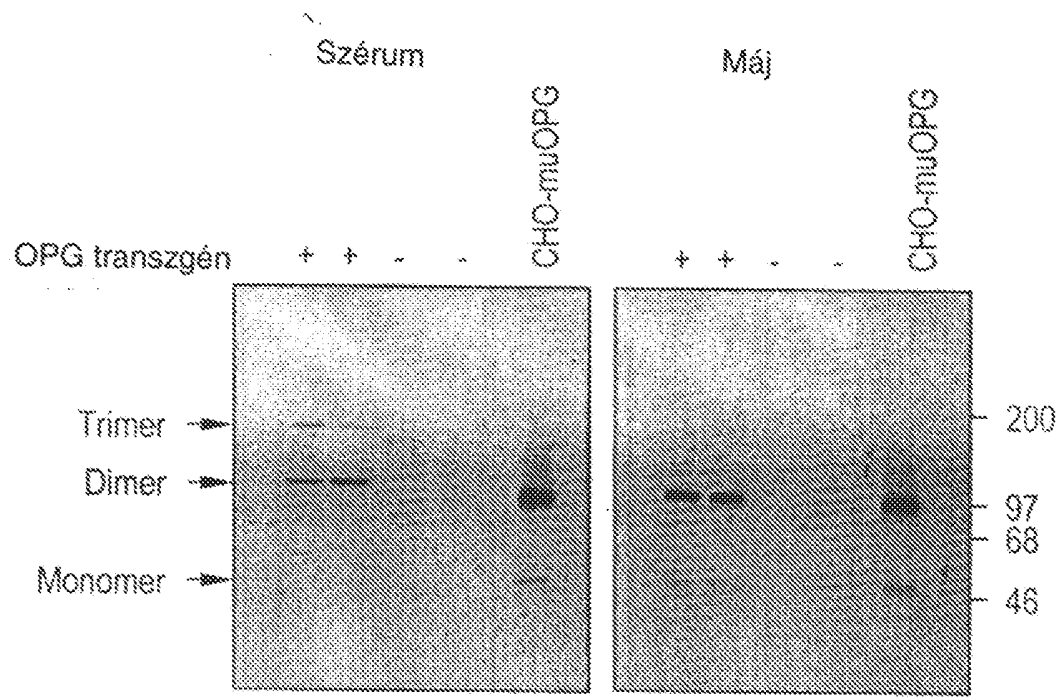
16B. ábra



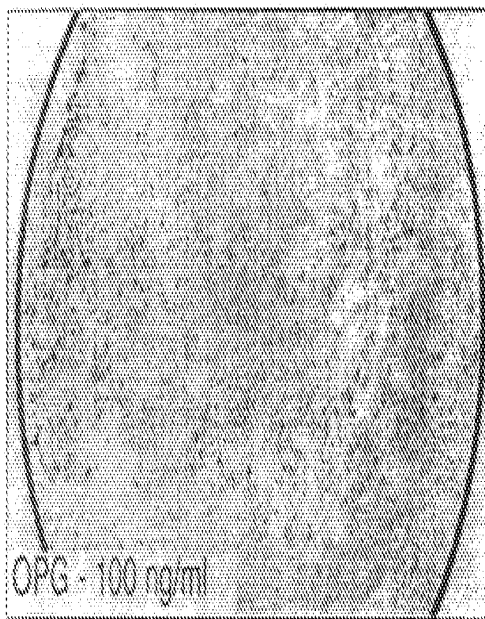


17. ábra

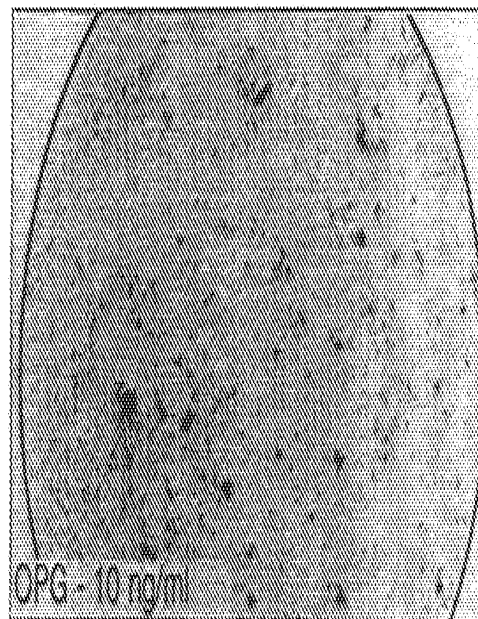
18. ábra



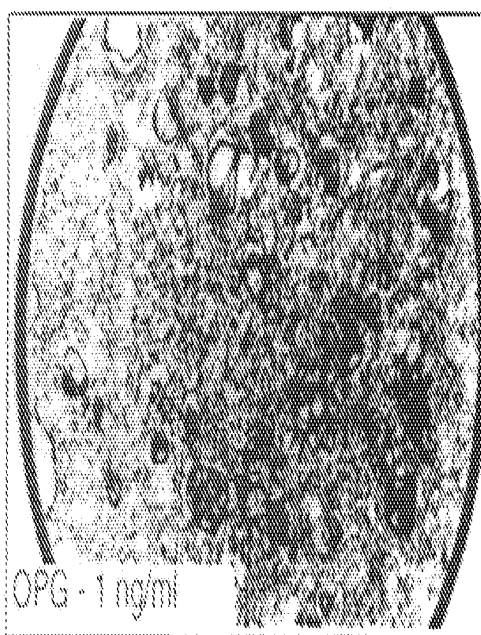
19A. ábra



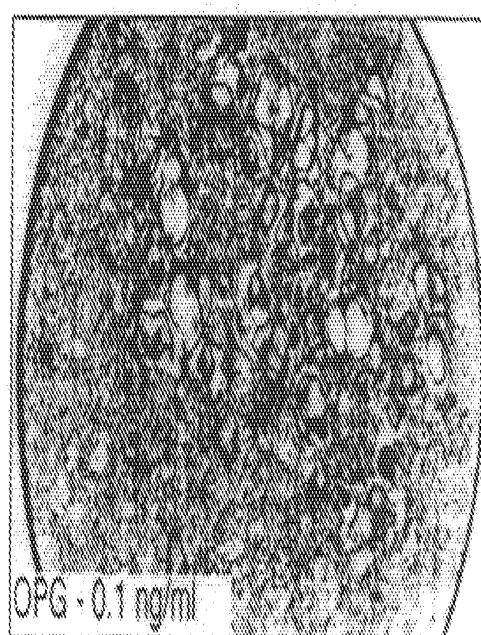
19B. ábra



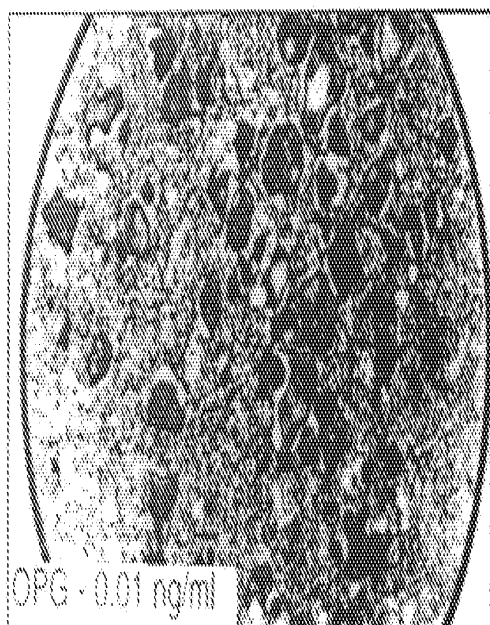
19C. ábra



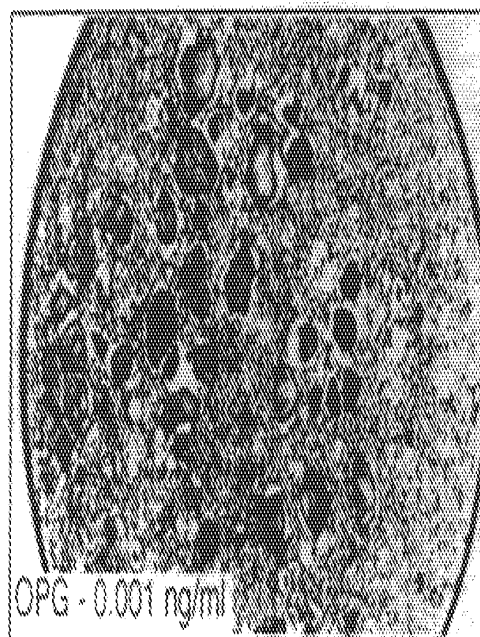
19D. ábra



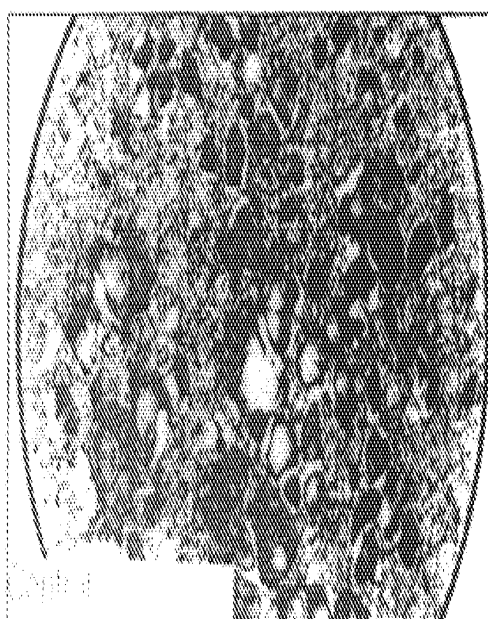
19E. ábra



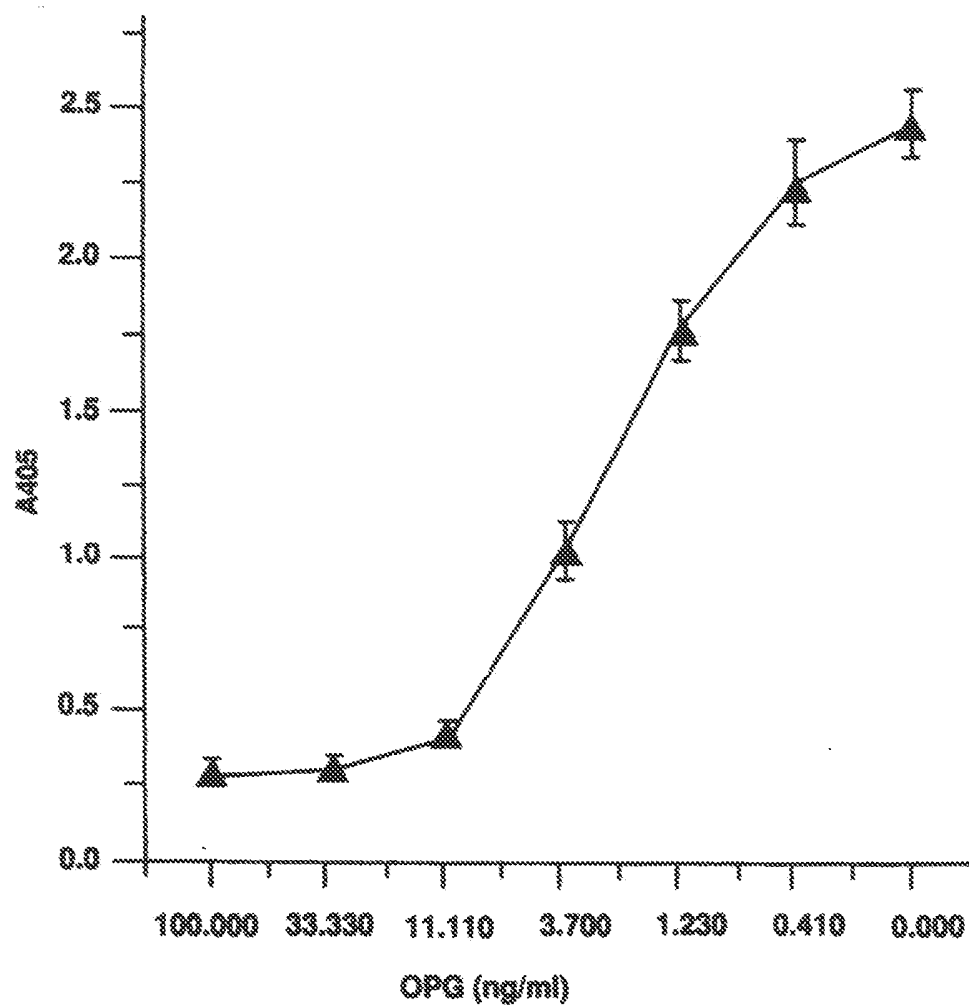
19F. ábra



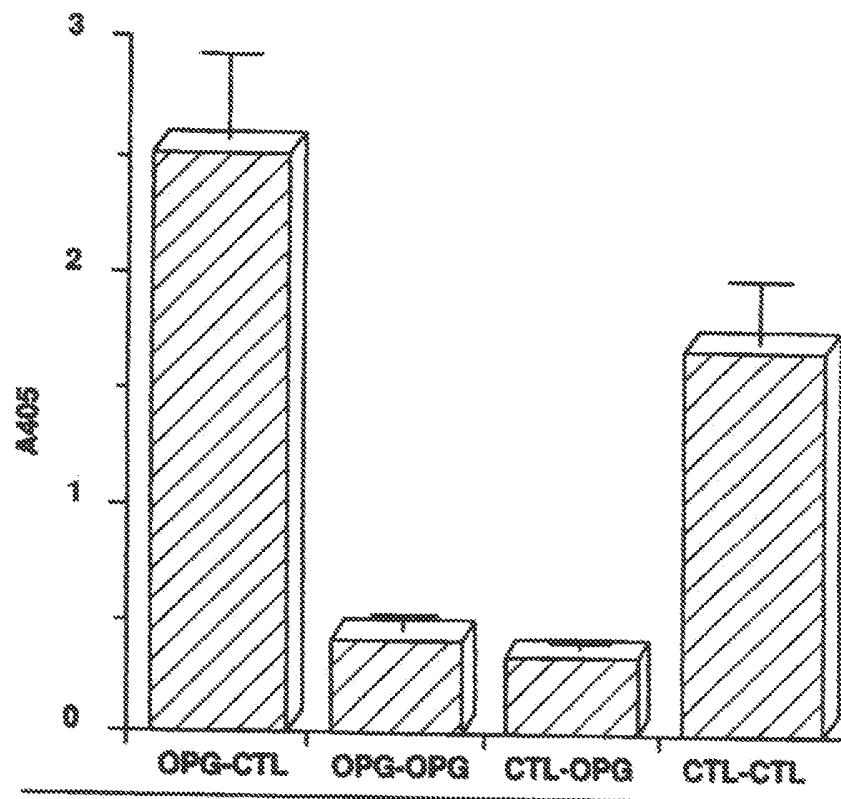
19G. ábra



20. ábra



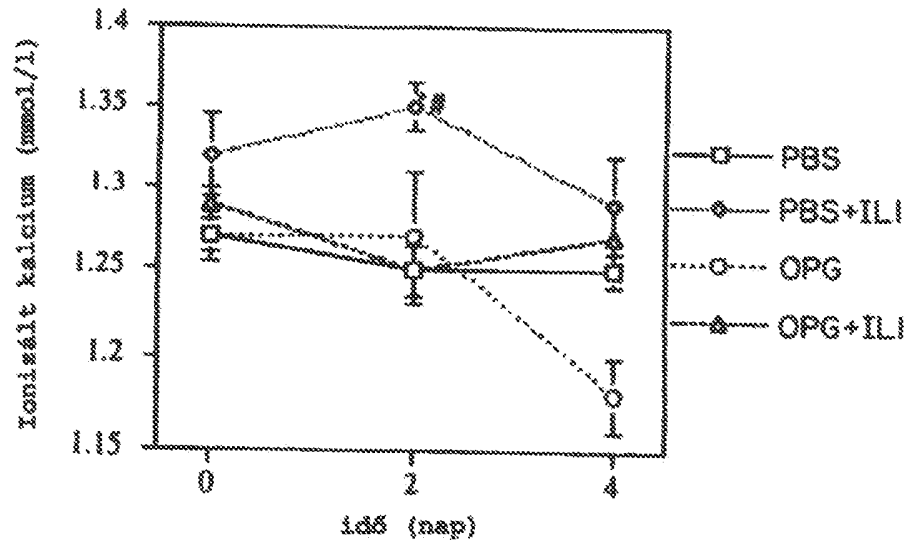
21. ábra



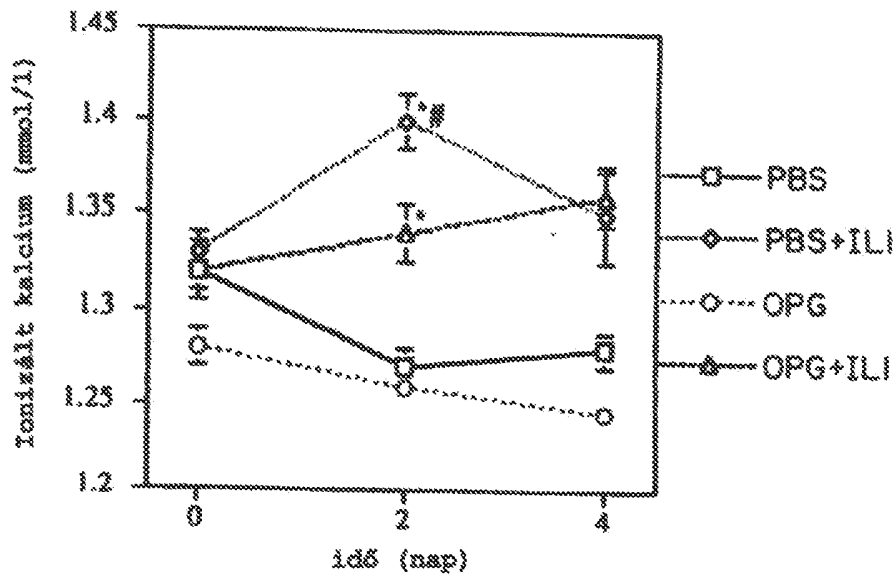
Ábramagyarázat

Növekedés Csontvelő sejtek CSF-1	Intermedier PGE2 + CSF-1	Terminális ST2 sejtek 1,25 (OH)2D3 Dexametazon
4 nap	2 nap	8-10 nap
Csoportok	OPG	OPG
CTL - CTL	---	---
OPG - CTL	100 ng/ml	---
OPG - OPG	---	100 ng/ml
OPG - OPG	100 ng/ml	100 ng/ml

22A. ábra



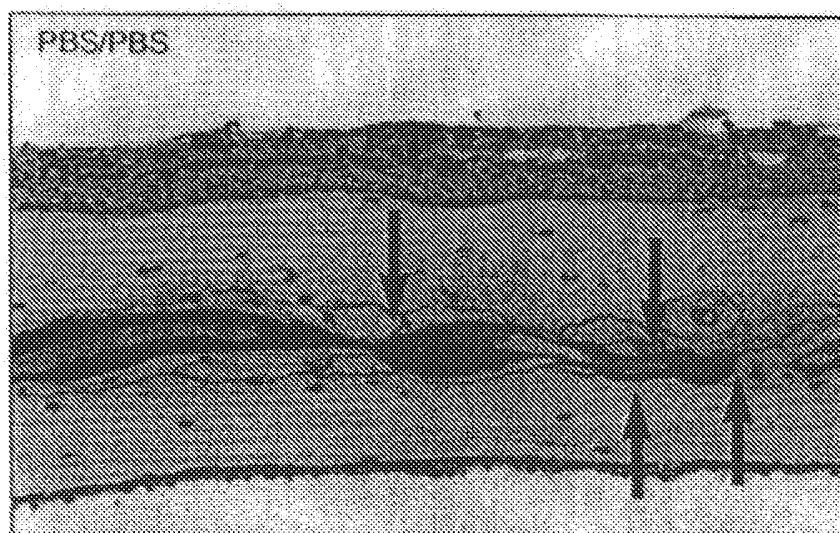
22B. ábra



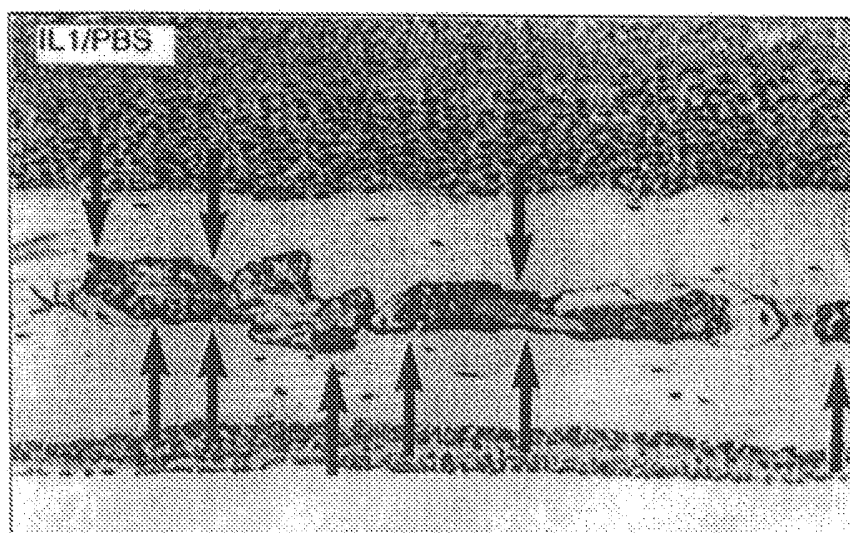
* Eltérés a PBS-től, $p < 0,05$

#Eltérés az OPG + IL-1-től, $p < 0,05$

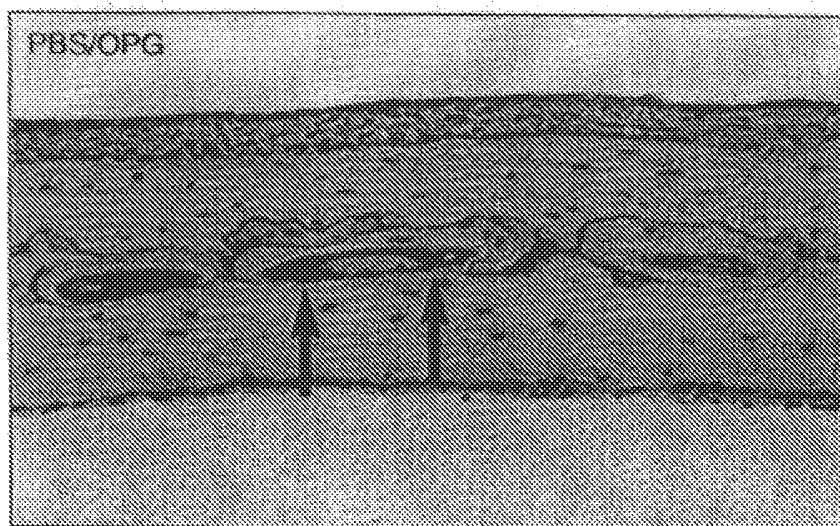
23A. ábra



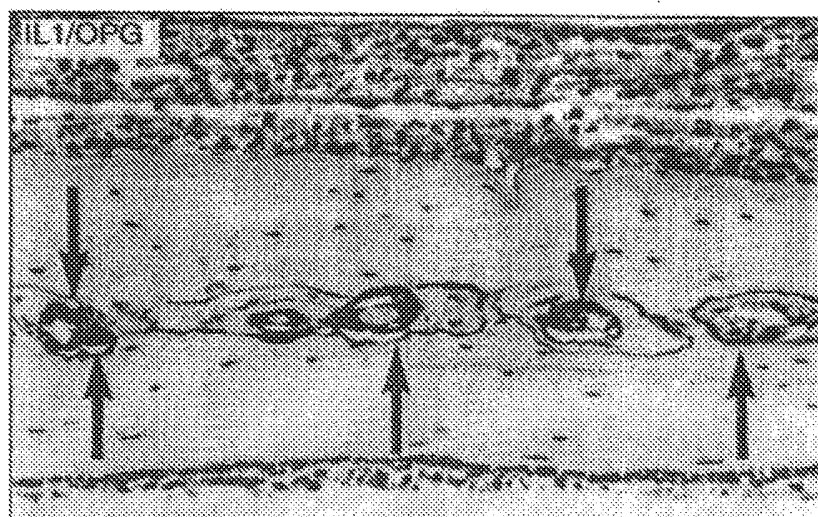
23B. ábra



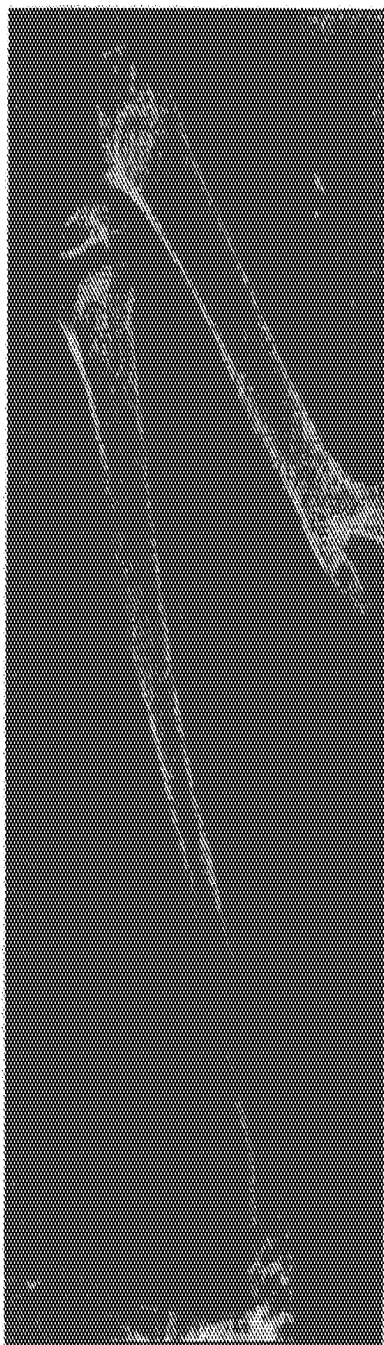
23C. ábra



23D. ábra



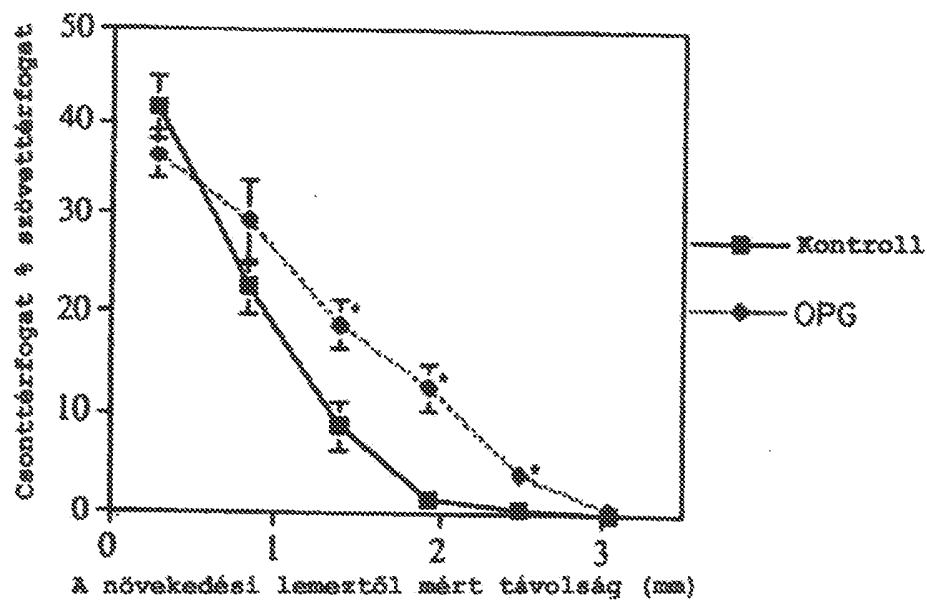
24A. ábra



24B. ábra



25. ábra



* Eltérés a kontrolltól $p < 0,01$

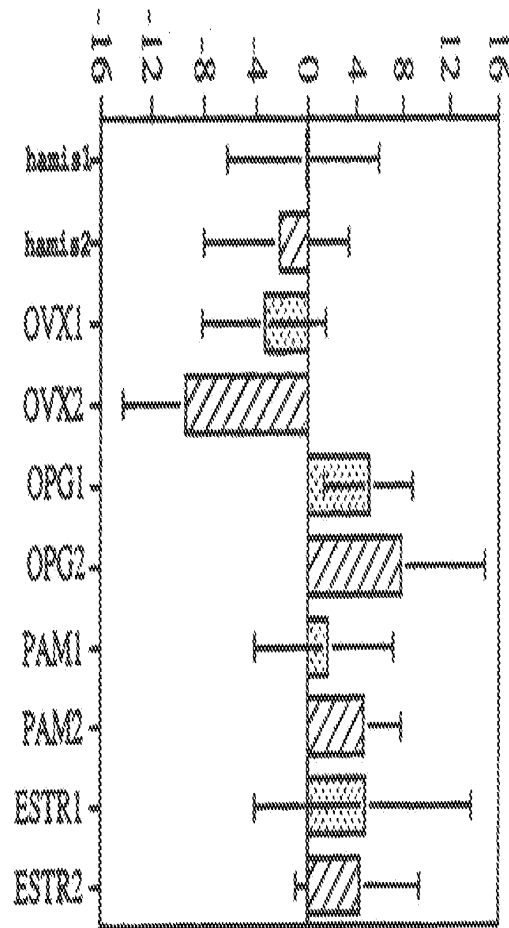
26A. ábra



26B. ábra



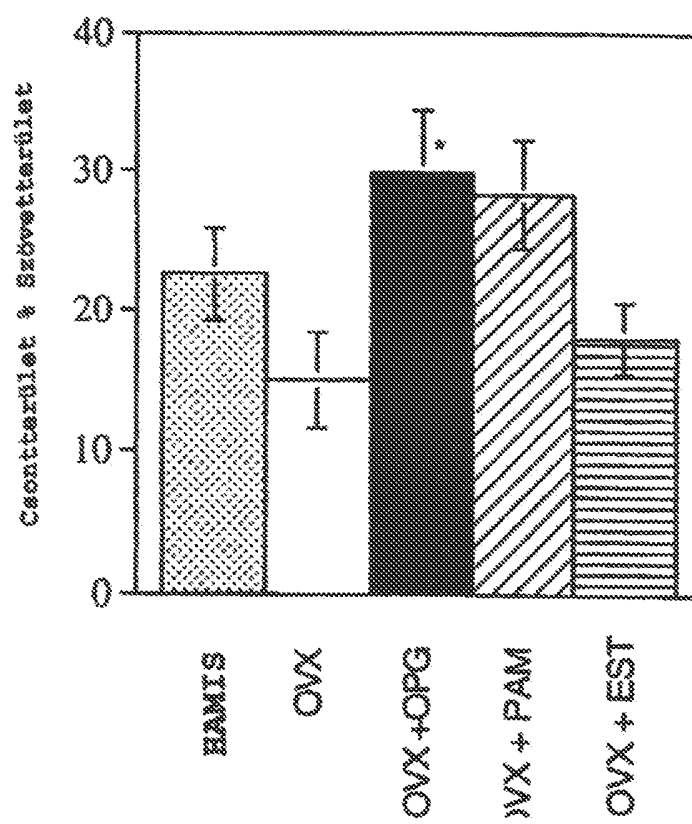
EMD 1-es változás



1. HET
2. HET

27. ábra

28. ábra



*Eltérés az OVX-től $p < 0,05$