

ÖZET

RPE HÜCRELERİ ÜRETİM YÖNTEMLERİ

Mevcut açıklama, laminin-521'in retina pigment epiteli (RPE) hücreleri elde edilmesinde kullanılması ile ilgilidir. Pluripotent insan embriyonik kök hücreleri rekombinant laminin-521 (laminin-11) ile kaplı plakalar üzerinde, tamamen tanımlanmış ve ksenon bulunmayan şartlarda, kültürlenir. Birinci hücre kültür ortamı bir büyüme faktörü içerir, ikinci hücre kültür ortamı büyüme faktörü içermez. Kök hücreler önce birinci hücre kültür ortamına, daha sonra ikinci hücre kültür ortamına uzun bir süre için yerleştirilir. Birkaç hafta sonra kök hücrelerden klinik sınıf RPE hücreleri elde edilir.

İSTEMLER

1. Retina pigment epiteli (RPE) elde etme yöntemi olup

5 bir laminin içeren bir substrat üzerinde bir veya daha fazla kök hücrenin kültürlenmesini, ki burada laminin, laminin-521 ve/veya laminin-511'dir, ayrıca başka bir moleküle veya reseptöre bağlanma aktivitesine sahip olan bir, iki veya üç işlevsel alan içeren bozulmamış bir protein veya bir protein fragmanıdır,

10 kök hücrelerin bir büyüme faktörü içeren birinci hücre kültür ortamına maruz bırakılmasını, ki burada büyüme faktörü sıfırdan 3.9 ng/ml'ye kadar olan bir miktarda FGF2'dir, ayrıca birinci hücre kültür ortamı tamamen kimyasal olarak tanımlanmış olup kseno içermez,

15 birinci zaman periyodundan sonra, birinci hücre kültür ortamının kaldırılmasını ve kök hücrelerin, büyüme faktörü içermeyen bir ikinci hücre kültür ortamına maruz bırakılmasını, ki burada ikinci hücre kültür ortamı tamamen kimyasal olarak tanımlanmış olup kseno içermez, ve

20 RPE hücrelerini elde etmek için periyodik olarak ikinci hücre kültür ortamının değiştirilmesini içermektedir.

2. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada laminin etkin bir rekombinant laminindir.

3. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada substrat ayriyeten 25 bir kaderin içermektedir.

4. İstem 3'e uygun bir yöntem olup, burada kaderin bir e-kaderindir.

5. İstem 3'ne uygun bir yöntem olup, burada laminini kaderine ağırlık oranı yaklaşık 5:1'den yaklaşık 15:1'e kadardır.

6. İstem 4'e uygun bir yöntem olup, burada laminin laminin- 30 521 ve kaderin e-kaderindir.

7. İstem 6'e uygun bir yöntem olup, burada laminin-521'in e-kaderine ağırlık oranı yaklaşık 5:1'den yaklaşık 15:1'e kadardır.
8. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada birinci hücre
5 kültür ortamı TeSR2 ortamı veya Nutristem ortamıdır.
9. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada ikinci hücre kültür ortamı TeSR2 ortamı veya Nutristem ortamıdır ve ikinci hücre kültür ortamı FGF2 içermez.
10. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada substrat, birinci
10 hücre kültür ortamı ve ikinci hücre kültür ortamı hayvansal kökenli herhangi bir madde içermez.
11. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada birinci zaman periyodu yaklaşık bir haftadır.
12. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada ikinci hücre
15 kültür ortamının periyodik olarak değiştirilmesi işlemi her hafta yapılır ve RP hücreleri toplam yaklaşık sekiz hafta sonra elde edilir.
13. İstem 1'e uygun bir yöntem olup, burada kök hücreler, RPE hücreleri elde edebilmek için birinci hücre kültür ortamında yaklaşık bir hafta ve ikinci hücre kültür
20 ortamında yaklaşık yedi hafta süreyle tutulurlar.

TARİFNAME

RPE HÜCRELERİ ÜRETİM YÖNTEMLERİ

BULUŞUN ALT YAPISI

5 Bu uygulama hücre biyolojisi, hücre farklılaşması, moleküler biyoloji, proteinler, rekombinant insan proteinleri, nükleik asitler ve lamininler ile ilgilidir.

Bazal laminalar (bazal membranlar) hücre büyümesi, hücreyel farklılaşma, hücre fenotipi bakımı, doku gelişimi ve doku
10 bakımında merkezi bir rol oynayan katman şeklinde hücre dışı matrislerdir. Hemen hemen tüm dokularda bulunurlar ve embriyonik gelişimin en erken aşamalarında görünürler.

Bazal lamina, çeşitli mimari ve hücre-interaktif işlevlerin merkezidir. Örneğin:

15 1. Hücreler için yapışkan substratlar sağlayan dokular için mimari destek görevi görürler.

2. Hücrelerin migrasyonunu engelleyen ve makromoleküllerin değişimini pasif olarak düzenleyen doku bölmeleri arasında nüfuz edici bariyerler oluştururlar. Bu özellikler, önemli
20 bir filtrasyon yapısı olarak işlev gören böbrek glomerüller bazal membranı ile gösterilmekte olup, protein ve hücrelerin çoğu için geçirgen olmayan etkili bir kan-doku bariyeri oluşturmaktadır.

3. Bazal laminalar embriyogenez ve yara onarımı sırasında hücre migrasyonunu ve hücre uzamasını hızlandıran yüksek etkileşimli yüzeyler oluştururlar. Bir yaralanmayı takiben, hücrelerin normal doku fonksiyonunu eski haline getirmek için yeniden oluşturdıkları bir yüzey sağlarlar.

4. Bazal laminalar hücreyel farklılaşma, apoptozun önlenmesi ve doku bakımı için önemli olan hücrelerin temas ettirilmesine yönelik olarak yapılarında kodlanan bilgileri
30

sunmaktadır. Bu bilgi integrinler, distrolikan ve hücre yüzeyi proteoglikanlarını içeren çeşitli reseptörler aracılığıyla hücrelere iletilir. Sinyal verme sadece matris ligandların ve yeterli afiniteyle etkileşime giren ilgili reseptörlerin varlığına değil, aynı zamanda üç boyutlu matris "peyzaj" da ligand yoğunluğu gibi topografik faktörlere ve bazal lamina bileşenlerinin reseptörleri kümeleme yeteneğine bağlıdır. Bu matris proteinleri uzun ömürlü olabileceğinden, bazal laminalar yerleşik ve geçici hücreler için bazal laminada bir "yüzey hafızası" yaratırlar.

Bazal laminalar büyük ölçüde karmaşık polimerik yapılara dönüştürülmüş olan laminin ve tip IV kollajen heterotrimerlerden oluşur. İlave bileşenler, agrin ve perlekan ve nidogenler (entaktinler) gibi proteoglikanlar içerir. Bugüne kadar, altı tip IV kollajen polipeptit zinciri ve en az oniki adet laminin alt-birim zinciri tanımlanmıştır. Bu zincirler, paylaşılan ve benzersiz işlevlere sahiptir ve belirli zamansal (gelişimsel) ve mekânsal (dokuya özgü) şekillerle ifade edilirler.

Lamininler, esas olarak bazal laminada yer alan bir heterotrimerik glikoprotein ailesidir. Bir tarafta komşu hücre reseptörleri ile bağlanma etkileşimleri ve diğer laminin moleküllerine veya kolajenler, nidogenler veya proteoglikanlar gibi diğer matris proteinlerine bağlanma yoluyla işlev görürler. Laminin molekülleri ayrıca, hücre davranışı ve işlevi güçlü bir şekilde etkileyebilen önemli sinyal molekülleridir. Lamininler hem hücre / doku fenotipinin korunmasında hem de doku onarımı ve geliştirilmesinde hücre büyümesini ve farklılaşmasını desteklemede önemlidir.

Lamininler ortak bir yapısal organizasyona sahip geniş, çok alanlı proteinlerdir. Laminin molekülü, çeşitli matris ve

hücre etkileşimli fonksiyonlarını tek bir moleküle entegre eder.

Laminin molekülü bir α -zincir alt birimi, bir β -zincir alt birimi ve bir γ -zincir alt birimi içerir, bunların hepsi bir sarmal bobin alanından geçirilerek bir trimerde birleştirilir. ŞEKİL 1 laminin molekülünün ortaya çıkan yapısını gösterir. Bilinen on iki laminin alt birimi zinciri, doğal dokularda en az 15 trimerik laminin tipi oluşturabilir. Trimerik laminin yapıları, diğer laminin ve bazal lamina molekülüne ve membrana bağlı reseptörlere karşı bağlanma aktivitesine sahip olan tanımlanabilir alanlardır. ŞEKİL 2 üç laminin zincir alt birimini ayrı ayrı göstermektedir. Örneğini alan VI, IVb ve IVa küre şeklinde yapılar oluştururken alan V, IIIb ve IIIa (sistein bakımından zengin EGF'ye benzer elemanlar içerirler) çubuk şeklinde yapılar oluştururlar. Üç zincirin I ve II bölgeleri, üç iplikçikli sarmal bobin yapısının (uzun kol) oluşumunda yer alır.

İnsan dokularında en az onbeş farklı kombinasyonda tespit edilen beş farklı alfa zinciri, üç beta zinciri ve üç gama zinciri mevcuttur. Bu moleküller, tarihsel keşiflerine dayanarak laminin-1'den laminin-15'e kadar adlandırılır, ancak alternatif bir terminoloji, bunların zincir yapısına göre izoformlarını, örneğin alfa-1, beta-1 ve gama-1 zincirlerini içeren laminin-111 (laminin-1), tanımlar. Yapısal olarak tanımlanmış dört laminin ailesi tespit edilmiştir. Beş tanımlı laminin moleküllerinin birinci grubu, hepsi $\beta 1$ ve $\gamma 1$ zincirlerini paylaşır ve α -zincir bileşimleriyle ($\alpha 1$ 'den $\alpha 5$ 'e kadar zincir) değişir. Beş tanımlı laminin moleküllerinin ikinci grubunun, laminin-521 dahil, hepsi $\beta 1$ ve $\gamma 1$ zincirlerini paylaşır ve tekrar α -zincir bileşimleriyle değişir. Tanımlanan laminin moleküllerinin üçüncü grubunun tanımlanmış bir grubu var, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ zincir bileşimiyle laminin-332. Tanımlanan laminin

moleküllerinin dördüncü tanımlanmış bir grubu var, yeni tanımlanmış olan $\gamma 3$ zincir ($\alpha 2\beta 1\gamma 3$) ile laminin-213. İnsanın embriyonik kök (hES) hücreleri, spinal kord ve kardiyak yaralanmalar, tip I diyabet ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar gibi çeşitli hastalıklar için rejeneratif tıbbın geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. Bir kök hücre, özelleştirilmiş hücrelerin daha sonra türetildiği, farklılaşmamış bir hücredir. Embriyonik kök hücreler, her üç germ katmanının hücrelerine farklılaşma potansiyeli olan kapsamlı kendini yenileme kapasitesine ve pluripotensiteye sahiptir. Terapötik amaçlar için yararlı olup doku replasman tedavileri, ilaç taraması, işlevsel genomik ve proteomik için sınırsız hücre kaynağı sağlarlar.

HES hücrelerinin geniş çaplı çoğalmasıyla ilgili temel problemlerden biri, tek hücre süspansiyonuna ayrıştıktan sonra replantasyonda zayıf kalmalarıdır. Bu da geçişi sıkıcı ve büyük ölçekli otomatik geçişleri imkânsız hale getirmektedir. Bununla birlikte, bir rhokinase (ROCK) inhibitörü¹⁰ veya blebbistatin¹¹ varlığında tripsin kullanılarak tek bir hücre süspansiyonu içine serbest bırakılan hücreler izole edilemez ve tek klonlardan genişletilemez, ancak moleküller doğal kök hücre nişinin bileşenleri değildir ve aktin hücre iskeletini etkilerler, böylelikle hücre hasarına neden olurlar. Bu nedenle, ROCK inhibitörünün kullanımı hücre terapisi amaçlarına yönelik hES hücrelerinin uzun süreli genleşmesi için tercih edilen bir çözüm olmayabilir. Teisha J. Rowland et al. "Saflaştırılmış hücre dışı matris proteinleri kullanılarak tanımlanan koşullarda insan pluripotent kök hücrelerinin retina pigment epiteline farklılaştırılması", DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIP DERGİSİ, cilt 7, sayı 8, 18 Ağustos 2013, sayfa 642-653'te, insan pluripotent kök hücrelerinin, tanımlanan koşullarda retina pigment epiteline farklılaştığı açıklanmaktadır. Hanna Vaajasaari ve et al. "İşlevsel insan

pluripotent kök hücre kaynaklı retinal pigmentli epitel hücrelerinin tanımlanan ve ksenosuz diferansiyasyonuna doğru", MOLEKÜLER GÖRÜŞ, cilt 17, 1 Ocak 2011, sayfalar 558-575, hESC'leri ve hiPSC'leri, kseno içermeyen tanımlı ortamda RPE hücrelerine ayırmak için bir yöntemi açıklar.

Rejeneratif tıbbın amaçları için, kimyasal olarak tanımlanan, ksenonsuz, patojen içermeyen ve kararlı "partiden partiye" koşullarında pluripotent kök hücreleri türetme ve uzun vadeli kültürlere imkân veren yöntemler geliştirme arzusu vardır.

Bundan başka, bu tür yöntemler kısa sürede çok miktarda pluripotent hES / hiPS hücresi elde etmek için hızlı ve ekonomik olarak etkili bir ölçeklendirmeye izin vermelidir. Tercihen yöntemler ayrıca hücrelerde hücre ayrıştırmayı veya gen nakavtını içeren bilimsel ve klinik uygulamaları kolaylaştırabilen, hiçbir sentetik apoptoz inhibitörü içermeyen ortamdaki insan ES hücrelerinin klonal hayatta kalmasına da izin vermelidir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş, İstem 1'e uygun retina pigment epiteli (RPE) hücrelerini elde etmek için kök hücrelerin kültürlenmesi için, bir laminin içeren bir substrat üzerinde bir veya daha fazla kök hücrenin kültürlenmesini içeren yöntemler sağlar ki burada laminin, laminin-521 ve/veya laminin-511'dir ve ayrıca laminin, başka bir moleküle veya reseptöre bağlanma aktivitesine sahip olan bir, iki veya üç fonksiyonel alan içeren sağlam bir protein veya bir protein fragmanıdır; kök hücrelerin, büyüme faktörü FGF2'nin 0 ila 3.9 ng/ml'den daha büyük bir miktarda olduğu bir büyüme faktörü içeren birinci hücre kültür ortamına maruz bırakılması, birinci hücre kültür ortamının tamamen kimyasal olarak tanımlanması ve kseno içermemesi; birinci zaman periyodundan sonra, birinci hücre kültür ortamının kaldırılması ve kök hücrelerin büyüme faktörü içermeyen ikinci bir hücre kültür ortamına

maruz bırakılması, ikinci hücre kültür ortamının tamamen tanımlanması ve kseno içermemesi ve RPE hücrelerini elde etmek için ikinci hücre kültür ortamını periyodik olarak değiştirir. Laminin, etkili bir rekombinant laminin olabilir.

- 5 Bazı uygulamalarda substrat ayriyeten bir kaderin içerebilir. Kaderin, bir e-kaderin olabilir. Lamininin kaderine ağırlık oranı yaklaşık 5:1'den yaklaşık 15:1'e kadardır. Bazen laminin laminin-521 ve kaderin e-kaderindir. Laminin-521'in e-kaderine ağırlık oranı yaklaşık 5:1'den yaklaşık 15:1'e
- 10 kadardır.

Birinci hücre kültür ortamı TeSR2 ortamı veya Nutristem ortamı olabilir. Birinci hücre kültür ortamı sıfırdan 3.9 ng/ml'ye kadar bir miktarda FGF2 içerebilir.

- İkinci hücre kültür ortamı TeSR2 ortamı veya Nutristem
- 15 ortamıdır ve ikinci hücre kültür ortamı FGF2 içermez.

Substrat, birinci hücre kültür ortamı ve ikinci hücre kültür ortamı hayvansal kökenli herhangi bir madde içermez.

Birinci zaman periyodu yaklaşık bir hafta olabilir.

- İkinci hücre kültür ortamının periyodik olarak değiştirilmesi
- 20 işlemi her hafta yapılır ve RP hücreleri toplam yaklaşık sekiz hafta sonra elde edilir.

- Ayrıca, buluşun çeşitli bölümlerinde açıklanan, ancak farklı düzenlemelerde açıklanan, makula dejenerasyonuna sahip bir hastanın tedavi edilmesine yönelik usuller olup,
- 25 aşağıdakileri içerir: retina pigment epiteli (RPE) hücrelerini hastanın gözüne enjekte etmek, ki burada RPE hücreleri tamamen kimyasal olarak tanımlanan ve ksenonsuz koşullar altında elde edilmiştir. RPE hücreleri yukarıda tanımlanan yöntemlere göre elde edilebilir.

- 30 Açıklamanın bu ve diğer sınırlayıcı özellikleri, daha da özel olarak aşağıda detaylandırılmıştır.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Aşağıda şekillerin kısa açıklaması yer almaktadır.

ŞEKİL 1 rekombinant laminin molekülünün bir döner gölgelendirme elektron mikroskobu görüntüsüdür.

5 ŞEKİL 2 laminin α , β ve γ zincirlerinin yapısal motiflerini göstermektedir. N-terminali, dahili ve C-terminali globüler alanları, beyaz ovaler olarak gösterilmiştir. Sarmal bobin oluşturan alanlar (I ve II) beyaz dikdörtgenler olarak gösterilmiştir. Çubuk benzeri yapılar (V, IIIb ve IIIa alanları) gri dikdörtgenler olarak gösterilmiştir.

10 ŞEKİL 3 SDS-PAGE kullanan insan rekombinant laminin-521'in karakterizasyon sonuçlarını gösterir. Rekombinant laminin-521'in bir immüno blotu, indirgeyici olmayan (oks olarak işaretli) ve indirgeyici (kırmızı olarak etiketli) koşullar altında yapıldı. %3-8 jel üzerindeki proteinler PVDF membranlarına aktarıldı ve ardından laminin α 5 (2F7), β 2 (MAB2066), β 1 (MAB1921) ve γ 1 (H-19) antikorları ile boyandı.

20 ŞEKİL 4 ve ŞEKİL 5 kültürde bir gün durduktan sonra Matrigel (Mg), fare laminin-111 (mLN111), insan rekombinantı laminin-511 (r-laminin-511 veya r-LN-511), insan rekombinantı laminin-521 (r-laminin-521 veya r-LN-521) veya r-laminin-511 ve r-laminin-521 (karışım) karışımı kaplı çanaklara yapışan insan ES hücrelerinin kristal viyoleye boyanmasını göstermektedir. Her iki şekil de 5 kere büyütülmüştür. ŞEKİL 4'te hücreler, ROCK inhibitörü olmadan kültürlenmiştir. ŞEKİL 5'te hücreler, ROCK inhibitörü Y-27632 ile kültürlenmiştir.

30 ŞEKİL 6 insan ES hücrelerinin insan r-laminin-521'e (LN521 olarak etiketlenmiş), insan r-laminin-511 (LN511) ve Matrigel (Mg) kaplanmış çanaklara ROCK inhibitörü olmadan kültür içinde bir saat sonra yapışmasını gösteren bir

grafiktir. Hata çubukları ölçümdeki standart hataları göstermektedir. (n=3).

ŞEKİL 7 insan ES hücrelerinin ya Matrigel (Mg), fare laminin-111 (mLN111), insan r-laminin-511 (LN511), insan r-laminin-521 (LN521) ya da r-laminin-511 ve r-laminin-521 (karışım) karışımı ile kaplı çanaklara kültür içinde bir gün kaldıktan sonra ve ROCK inhibitörsüz yapışmasını göstermektedir. Ayrıca ROCK inhibitörü ile ya Matrigel (In&Mg), fare laminin-111, (In&mLN111), insan r-laminin-511 (In&LN511), insan r-laminin-521 (In&LN521), veya r-laminin-511 ve r-laminin-521 (In&mix) karışımı içeren çanaklar için kültürde gene bir gün kaldıktan sonraki sonuçlar da dahil edilmiştir. Her iki deney için de hücreler, aynı hücre kültürü çanağı üzerinde aynı yoğunlukta kaplanmıştır. Hata çubukları ölçümdeki standart hataları göstermektedir (n=3).

ŞEKİL 8 tek hücre ayrıştırma geçişi kullanılarak r-laminin-521 (LN-521_1 ve LN-521_2) üzerinde kültürlenен insan ES hücreleri ve küçük kümelerde geçiş kullanılarak Matrigel (Mg_1 ve Mg_2) üzerinde kültürlenен insan ES hücreleri için büyüme eğrilerini göstermektedir. Son bahsedilen hücreler, Rodin et al., Nature Biotechnol., cilt 28, sayfa 611-615 (2010) içinde tanımlanmıştır. ŞEKİL 9 OCT4 için bir tek hücre ayrışma geçişlerinden sonra OCT4 için pluripotentliğin bir belirteci olan insan ES hücrelerinin FACS analizidir. Pozitif hücrelerin yüzdeleri parantez içinde belirtilmiştir.

ŞEKİL 10 Matrigel üzerinde OCT4 için küçük kümeler halinde bölünme kullanılarak birkaç geçişten sonra insan ES hücrelerinin FACS analizidir. Pozitif hücrelerin yüzdeleri parantez içinde belirtilmiştir.

ŞEKİL 11 birkaç tek hücre ayrışmasından sonra insan r-laminin-521 (LN521) üzerinde kültürlenен insan ES hücrelerinde pluripotentlik markerleri Oct4 ve Nanog'un

mRNA transkriptlerinin sayısını karşılaştırmak için çok sayıda tek hücre ayırışma geçişinden sonra ve Matrigel (Mg) üzerinde kültürlenen hücrelerde küçük kümeler halindeki hücrelerin çok sayıda geçişinden sonra kullanılan gerçek zamanlı bir kantitatif RT-PCR analizinin sonuçlarını göstermektedir. Hata çubukları %95 güven aralığı göstermektedir.

ŞEKİL 12 Matrigel (Mg), LN-111, LN-511 ve LN-521 üzerinde büyütülmüş kök hücrelerde fosforile miyozin hafif zincirinin (P-MLC) seviyelerini kaplandıktan bir saat sonra karşılaştıran bir Western blotudur.

ŞEKİL 13 Matrigel (Mg), LN-111, LN-511 ve LN-521 üzerinde büyütülmüş kök hücrelerde fosforile miyozin hafif zincirinin (P-MLC) seviyelerini kaplandıktan altı saat sonra karşılaştıran bir Western blotudur.

ŞEKİL 14 Matrigel (Mg), LN-111, LN-511 ve LN-521 üzerinde büyütülen insan embriyonik kök hücrelerinin kaplandıktan beş ila yedi saat arasındaki bağıl migrasyonunu karşılaştıran bir grafiktir.

ŞEKİL 15 LN-521 üzerinde büyütülen insan embriyonik kök hücrelerinin, uygulanan IgG ve IgM bloke edici antikörler (IgGM) ve uygulanan integrin 1 (b1)'e karşı bir işlev bloke edici antikoru ile bağıl migrasyonunu karşılaştıran bir grafiktir. Bu, integrinin bloke edilmesinin motiliteyi önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

ŞEKİL 16 su, DMSO, LY294002 (Akt inhibitörü), wortmannin (PI3K / Akt inhibitörü) ve PD 98059 (MEK1 inhibitörü) mevcut iken LN-521 üzerindeki hES hücrelerinin bağıl sağkalımını karşılaştıran bir grafiktir. Bu, PI3K / Akt aktivasyonunun, LN-521'de hES hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olduğunu göstermiştir. Ortam bFGF içerir.

ŞEKİL 17 DMSO, LY294002 (Akt inhibitörü) ve PD 98059 (MEK1 inhibitörü) mevcut iken LN-521 üzerindeki hES hücrelerinin bağıl sağkalımını karşılaştıran bir grafiktir. Ekzojen bFGF mevcut değildir.

5 ŞEKİL 18 LY 294002 ile kontrol hücrelerine (DMSO) karşı muamele edilen ve LN-521 üzerinde kaplamadan bir saat sonra toplanan hücreleri karşılaştıran bir Western blotudur.

ŞEKİL 19 PD98059 ile kontrol hücrelerine (DMSO) karşı muamele edilen ve LN-521 üzerinde kaplamadan bir saat sonra toplanan hücreleri karşılaştıran bir Western blotudur.

10 ŞEKİL 20 ELISA kullanılarak elde edilen Matrigel (Mg), LN-111, LN-511 veya LN-521 üzerinde kaplamadan bir saat sonra toplanan hücre lizatları üzerindeki bağıl Akt2 fosforilasyon seviyelerini gösteren bir grafiktir.

15 ŞEKİL 21 ELISA kullanılarak elde edilen Matrigel (Mg), LN-111, LN-511 veya LN-521 üzerinde kaplamadan bir saat sonra toplanan hücre lizatları üzerindeki bağıl Akt1 fosforilasyon seviyelerini gösteren bir grafiktir.

20 ŞEKİL 22 yüksek bFGF ortamı (O3_100) ile karşılaştırıldığında düşük bir bFGF ortamında (O3_3.9) kültürlen HS181 hES hücrelerinin büyüme eğrisini gösteren bir grafiktir.

25 ŞEKİL 23 daha yüksek bir bFGF ortamı (O3_100) ile karşılaştırıldığında düşük bir bFGF ortamında (O3_3.9) kültürlen HS181 hES hücrelerinde iki pluripotens markeri (Oct4 ve Nanog) için nispi mRNA ekspresyon seviyesini gösteren bir grafiktir.

30 ŞEKİL 24 laminin-521 / E-Kaderin matrisi üzerinde yeni bir insan embriyonik kök HS841 hücre soyunun erken evreli bir türünü gösteren bir resimdir.

ŞEKİL 25 sekizinci haftada parke taşı formu gösteren RPE hücrelerinin bir resmidir.

ŞEKİL 26 sekizinci haftada parke taşı formu gösteren RPE hücrelerinin ikinci bir resmidir.

Ayrıntılı Açıklama

Burada açıklanan bileşimlerin ve yöntemlerin daha iyi anlaşılması, ekteki çizimlere atıf yapılarak sağlanabilir.

Aksi belirtilmedikçe, bu başvuruda kullanılan teknikler, aşağıdakiler gibi iyi bilinen referanslardan herhangi birinde bulunabilir: Moleküler Klonlama: Laboratuvar El Kitabı (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gen İfade Teknolojisi (Enzimoloji Yöntemleri, sayı. 185, düzenleyen D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.), Enzimoloji Yöntemlerinde "Protein Saflaştırma Rehberi" (M. P. Deutshcer, düzenleme, (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protokolleri: Yöntemler ve Uygulamalar Rehberi (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), Hayvan Hücreleri Kültürü: Basit Teknik İçin El Kitabı, ikinci düzenleme (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.), Gen Transferi ve İfade Protokolleri, sayfa 109-128, düzenleyen E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), veya Ambion 1998 Kataloğu (Ambion, Austin, Tex.).

Burada kullanılan "izole edilmiş nükleik asit dizisi" terimi, nükleik asidin türetildiği organizmanın genomik DNA'sında nükleik asit ile doğal olarak yan yan bulunan gen dizileri içermeyen bir nükleik asit sekansını belirtir (yani, nükleik asitin türetildiği organizmanın genomik DNA'sında izole edilmiş nükleik molekülün genine bitişik olarak bulunan genetik sekanslar). Bununla birlikte, "izole edilmiş" sekans, heterolog bir promotör sekansı veya başka vektör sekansları gibi, belirtilen sekans ile doğal olarak yan yana bulunmayan diğer nükleotit sekanslarına bağlanabilir. Açıklanmış nükleik asit sekansının "izole edilmiş" olarak kabul edilmesi için başka hücrel materyal içermemesi gerekli değildir, çünkü açıklamaya göre bir nükleik asit sekansı, konakçı hücreleri

transfekte etmek için kullanılan bir ekspresyon vektörünün bir fragmanısı olabilir (aşağıya bakınız).

Mevcut açıklama, insan laminin $\beta 2$ zincirinin bir tam uzunlukta laminin $\beta 2$ zincir nükleik asit dizisini (SEQ ID NO: 4) içeren rekombinant ekspresyon vektörlerini sağlar. Bazı düzeneklerde ekspresyon vektörleri, bir heterolog promotöre (yani, verilen $\beta 2$ laminin zinciri için doğal olarak meydana gelen promoter değildir) işlevsel olarak bağlanan SEQ ID NO: 4 tarafından kodlanan bir nükleik asidi içerir. Bir promoter ve bir laminin $\beta 2$ zincir nükleik asit sekansı, promotör laminin $\beta 2$ zincir DNA'sının ekspresyonunu RNA'ya sokabildiğinde "işlevsel olarak bağlanır".

Burada kullanılan "vektör terimi, bağlandığı başka bir nükleik asidi taşıyabilen bir nükleik asit molekülüne işaret eder. Bir vektör türü, içine ek DNA bölümlerinin klonlanabileceği dairesel çift şeritli bir DNA'yı ifade eden bir "plazmit" tir. Bir başka vektör türü, viral bir vektördür, burada ilave DNA segmentleri, viral genoma klonlanabilir. Bazı vektörler, içine sokuldukları bir konakçı hücrede otonom replikasyon yapabilirler (örneğin, bakteriyel bir replikasyon replikasyonuna ve epizomal memeli vektörlerine sahip bakteriyel vektörler). Diğer vektörler (örn., epizomal olmayan memeli vektörleri), bir konakçı hücreye sokulduktan sonra konakçı hücrenin genomuna entegre olurlar ve böylece konakçı genomla birlikte çoğalırlar. Ayrıca, bazı vektörler, işlevsel olarak bağlı oldukları genlerin ekspresyonunu yönlendirebilir. Bu tür vektörler, burada "rekombinant ekspresyon vektörleri" veya basitçe "ekspresyon vektörleri" olarak adlandırılmaktadır. Mevcut açıklamada, laminin polipeptit sekansının ekspresyonu, açıklamanın promotör sekanslarının eksprese edilecek olan gene işlevsel olarak bağlanmasıyla, açıklamanın promotör sekansları tarafından yönlendirilir. Genel olarak,

rekombinant DNA tekniklerindeki faydalı ekspresyon vektörlerinin genellikle plazmitler biçimindedir. Bu tarifnamede, plazmid, vektörün en yaygın kullanılan şekli olduğu için, "plazmid" ve "vektör" birbirini yerine kullanılabilir. Bununla birlikte, açıklamanın, eşdeğer fonksiyonlara hizmet eden viral vektörler (ör. replikasyon kusurlu retrovirüsler, adenovirüsler ve adeno ilişkili virüsler) gibi diğer ekspresyon vektörlerinin formlarını içermesi amaçlanmıştır.

10 Vektör ayrıca ek nükleik asit sekanslarının alt klonlanması için bir polilinker gibi ek sekanslar veya transkriptin uygun poliadenilasyonunu gerçekleştirmek için bir poliadenilasyon sinyali içerebilir. Poliadenilasyon sinyalinin doğasının, açıklamanın yöntemlerinin başarılı bir şekilde uygulanması için çok önemli olmadığı düşünülmektedir ve bu tür bir dizi, SV40 ve sığır büyüme hormonu poli-A alanları dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere kullanılabilir. Vektörün bir elemanı olarak da düşünüldüğünde, mesaj seviyelerini geliştirmeye ve yapıdan okunmayı diğer sekanslara en az

15 indirmeye hizmet edebilen bir sonlandırma sekansıdır. Ek olarak, ekspresyon vektörleri tipik olarak, bu vektörleri taşıyan hücrelerin seçimine izin veren, genellikle antibiyotik direnç genleri şeklinde seçilebilen markerlere sahiptir.

25 Başka uygulamalarda mevcut açıklama, burada açıklanan laminin $\beta 2$ zincir eksprese eden rekombinant ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş konakçı hücreleri sağlar. Burada kullanıldığı şekliyle "konakçı hücre" terimi, mevcut açıklamanın bir nükleik asidinin, örneğin bir rekombinant

30 ekspresyon vektörünün dahil edildiği bir hücreye refere edilmesini amaçlamaktadır. Bu tür hücreler prokaryotik olabilir, örneğin, hızlı bir şekilde açıklamanın ekspresyon vektörlerininin büyük bir miktarını üretmek için

kullanılabilir veya işlevsel çalışmalar için ökaryotik olabilir.

"Konakçı hücre" ve "rekombinant konakçı hücre" terimleri burada birbirinin yerine kullanılabilir. Bu terimlerin sadece
5 söz konusu hücreye değil, bu tür bir hücrenin soyuna veya potansiyel nesline de işaret ettiği anlaşılmalıdır. Mutasyon ya da çevresel etkiler nedeniyle, takip eden kuşaklarda bazı modifikasyonlar meydana gelebileceğinden, bu tür bir soy aslında esas hücre ile aynı olmayabilir, ancak yine de burada
10 kullanıldığı haliyle terimin kapsamına dahil edilebilir.

Konakçı hücreler, açıklamanın ekspresyon vektörlerinin bir veya daha fazlası ile geçici veya stabil olarak transfekte edilebilir. Ekspresyon vektörlerinin prokaryotik ve ökaryotik hücrelere bu şekilde transfeksiyonu, bunlarla sınırlı olmamak
15 üzere, standart bakteriyel dönüşümler, kalsiyum fosfat birlikte çökeltme, elektroporasyon veya lipozom ortamı, DEAE dekstran ortamı, polikasyonik ortamı veya viral ortamı transfeksiyon.dahil olmak üzere teknikte bilinen herhangi bir teknikle gerçekleştirilebilir. (bkz. örneğin, Moleküler
20 Klonlama: Bir Laboratuvar El Kitabı (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Hayvan Hücreleri Kültürü Basit Teknik İçin El Kitabı, ikinci düzenleme (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.).

Başka bir yönüyle mevcut açıklama, SEQ ID NO: 2'nin amino
25 asit dizisinden oluşan izole edilmiş tam uzunlukta bir insan laminin $\beta 2$ zincir polipeptidi sağlar.

Burada kullanıldığı şekliyle "izole edilmiş bir polipeptit", diğer laminin zincirleri ve poliakrilamid ve agaroz gibi jel ajanları dahil olmak üzere diğer proteinlerden büyük ölçüde
30 bağımsız olan bir polipeptide karşılık gelir. Tercih edilen uygulamalarda izole edilmiş laminin polipeptidinde, saptanabilir kirletici laminin zincirleri bulunmaz. Böylelikle protein ya doğal kaynaklardan izole edilebilir ya

da rekombinant protein yukarıda açıklanan transfekte edilmiş konakçı hücrelerden izole edilebilir.

Başka bir yönüyle mevcut açıklama, izole edilmiş laminin-521'i sağlar. Burada kullanıldığı şekli ile "laminin-521" terimi, $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ zincirleri birleştirilerek oluşturulan proteine karşılık gelir. Terim, doğal olarak oluşan kaynaklardan hem rekombinant laminin-521 hem de heterotrimerik laminin-521'i kapsadığı şekilde yorumlanmalıdır. Tercih edilen uygulamalarda laminin-521, rekombinant laminin-521 (veya "r-laminin-521") içerir. "Rekombinant" terimi, proteinin normal olarak bu tür proteinleri eksprese etmeyen hücrelerde yapay olarak üretildiğini belirtir.

Burada kullanıldığı şekliyle "r-laminin-521" terimi, $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ zincirlerinden veya bunların salgılanan formlarından seçilen bir laminin-521 zincirini kodlayan en az bir nükleik asit dizisini içeren bir veya daha fazla ifade vektörü ile transfekte edilmiş bir konakçı hücre tarafından ifade edilen rekombinant heterotrimerik laminin-521'i ifade eder. Bu r-laminin-521, böylece tek bir organizmadan veya farklı organizmalardan $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ sekansları içerebilir. Çeşitli laminin-521 zincir DNA dizileri teknikte bilinmektedir ve açıklamanın r-laminin-521'ini hazırlamak için böyle bir dizinin kullanılması düşünülmektedir. (Bakınız, örneğin, Pouliot, N. et al., Deneysel Hücre Araştırması 261 (2): 360-71, (2000); Kikkawa, Y. ve et al., Hücre Bilimi Dergisi 113 (Pt5): 869- 76, (2000), Church, H J. et al., Biyokimya Dergisi 332 (Pt 2): 491-8, (1998); Sorokin, L M. et al., Gelişimsel Biyoloji 189 (2): 285-300 , (1997); Miner, J H. et al., Biyolojik Kimya Dergisi 270 (48): 28523-6, (1995); Sorokin, L. et al., Avrupa Biyokimya Dergisi 223 (2): 603-10, (1994)). Tercih edilen uygulamalarda r-laminin-521,

rekombinant insan $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ polipeptit zincirlerinden oluşturulur.

Açıklama bu laminin moleküllerini kapsar, burada rekombinant heterotimerik laminin-521'i oluşturan sadece bir veya iki zincir, endojen laminin-521 zincirleri tarafından kodlanır. Tercih edilen uygulamalarda, $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ polipeptid zincirlerinin her biri rekombinant olarak eksprese edilir.

Laminin-521 bozulmamış bir proteindir. "Bozulmamış" terimi, üç zincirin heterotrimerik yapıyı oluşturmak üzere bir araya getirilmesiyle, α -zincir, β -zincir ve γ -zincirin tüm alanlarından oluşan proteine işaret eder. Protein farklı zincirlere, fragmanlara veya işlevsel alanlara parçalanmış değildir "Zincir" terimi, laminin proteinin alfa, beta veya gama zincirinin bütününe karşılık gelir. "Fragman" terimi, başka bir moleküle veya reseptöre bağlanma aktivitesine sahip olan bir, iki veya üç işlevsel alanı içeren herhangi bir protein fragmanına işaret eder. Bununla birlikte, bir zincir bir fragman olarak kabul edilmemelidir, çünkü her zincir bunun gibi üç alandan daha fazlasına sahiptir. Benzer şekilde, sağlam bir laminin proteini bir fragman olarak kabul edilmemelidir. İşlevsel alanların örnekleri arasında I, II, III, IV, V, VI alanları ve G alanı yer alır.

Laminin-521, bir sinyal dizisinin bir sonucu olarak endoplazmik retikulum (ER), salgı kesecikleri ve hücre dışı boşluğa yönlendirilebilen salgılanmış bir proteindir. Eğer salgılanmış protein hücre dışı boşluğa salınırsa, salgılanmış protein bir "olgun" protein üretmek için hücre dışı işlemden geçebilir. Bu gibi işleme olayları değişken olabilir ve bu nedenle nihai "olgun protein" in farklı versiyonlarını verebilir. Örneğin, $\alpha 5$, $\beta 2$, and $\gamma 1$ zincirlerinin uzunlukları proteinler arasında değişebilir. Bununla birlikte, zincir uzunlukları değişse de, nihai olgun protein hala aynı işlevselliğe sahiptir. Mevcut açıklamanın izole edilmiş

laminin-521'i, hem tam uzunlukta polipeptit zincirlerini hem de bu gibi doğal işlenmiş laminin-521 polipeptit zincirlerini içeren heterotrimerler içerir.

Burada kullanıldığı şekli ile bir laminin-521 polipeptit zinciri, aşağıdaki hususlardan bir veya birden fazlasına göre bir polipeptit zincire işaret eder:

(a) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3 ve R2-R4'ten oluşan gruptan seçilen polipeptit yapısını içeren bir polipeptit zinciri, ki burada R1 bir amino terminal metiyonin, R2 polipeptidin salgılanmasını yönlendirebilen bir sinyal dizisidir ve ayrıca burada sinyal dizisi, belirli bir laminin zinciri için doğal bir sinyal dizisi, başka bir salgılanmış proteinin veya bir yapay dizinin doğal sinyal dizisi olabilir; R3, bir $\alpha 5$ zinciri, bir $\beta 2$ zinciri, ve bir $\gamma 1$ zincirinden oluşan gruptan seçilen bir salınmış laminin zinciridir ve R4, ayrıca, laminin zinciri amino asit dizisi içinde herhangi bir konuma yerleştirilebilen bir epitop etiketi (aşağıda tarif edilenler gibi) içeren bir salınmış $\alpha 5$, $\beta 2$ veya $\gamma 1$ laminin zinciridir, veya

(b) yüksek veya düşük titiz koşullar altında burada açıklanan rekombinant laminin-521 zincir DNA sekanslarının bir veya daha fazlasının kodlama bölgelerine veya bunun kısımlarına hibritlenen bir polinükleotid tarafından kodlanan bir polipeptit zinciri (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6) veya bunların tamamlayıcı sekansları, veya

(c) açıklanmış olan laminin-521 polipeptit zinciri amino asit sekanslarından birine veya daha fazlasına en az %70 özdeşliğe sahip olan bir polipeptid zinciri (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3), tercihen en az %80, en çok tercihen en az yaklaşık % 90 özdeşlik. DİZİ İD NO: 6)

"Melezleşmenin sertliği", nükleik asit hibritlerinin stabil olduğu yıkama koşullarını belirtmek için burada

kullanılmıştır. Açıklama ayrıca, burada açıklanan laminin zinciri polinükleotidlerinin kodlama sekanslarının tamamı veya bir kısmına (burada tanımlandığı gibi) yüksek sertlik koşulları altında melezeleşen nükleik asitleri veya bunların tamamlayıcılarını içerir. Melezleştirici nükleik asitlerin melezeleştirici kısmı tipik olarak en az 50 nükleotid uzunluğundadır. İşin tekniğinde uzman kişilerce bilindiği üzere, melezeleşenlerin stabilitesi melezeleşenlerin erime sıcaklığında (TM) yansıtılır. TM, sekans benzerliğindeki her %1'lik düşüş ile yaklaşık 1-1.5°C azalır. Genel olarak, bir melezeleşen stabilitesi, sodyum iyonu konsantrasyonunun ve sıcaklığın bir fonksiyonudur. Tipik olarak, melezeleşme reaksiyonu daha düşük sıklık koşulları altında gerçekleştirilir, ardından değişen, ancak daha yüksek sıklıktaki yıkamalar uygulanır. Burada kullanıldığı gibi, yüksek sertlik, %50 formamid, 5X SSC (750 mM NaCl, 75 mM sodyum sitrat), 50 mM sodyum fosfat (pH 7.6), 5X Denhardt çözeltisi, %10 dekstran sülfat ve 20 µg/ml denatüre, kesilmiş somon spermi DNA'sı içeren bir çözelti içinde bir gece boyunca 42°C'de inkübasyona, ardından filtrelerin 0.1X SSC ile yaklaşık 65°C'de yıkanmasına işaret etmektedir.

Ayrıca, düşük sertlikte melezeleşme koşullarında mevcut açıklamanın polinükleotitlerine hibridize olan laminin-521 kodlayan nükleik asit sekansları da düşünülmektedir. Melezleşme ve sinyal tespitinin sıklığındaki değişiklikler esas olarak, formamid konsantrasyonunun (daha düşük sıklıkta formamidin daha düşük yüzdeleri), tuz koşulları veya sıcaklık manipülasyonu vasıtasıyla gerçekleştirilir. Örneğin, daha düşük sıklık koşulları, 6X SSPE (20X SSPE = 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA pH 7.4), %0.5 SDS, %30 formamid, 100 µg/ml somon spermini bloke eden DNA içeren bir çözelti içinde 37°C'de gece boyunca inkübasyon; ardından 1X SSPE, %0.1 SDS ile 50°C'de yıkamayı içerir. Ayriyeten, daha düşük sıklık elde etmek için sıkı hibritlemeyi takiben yapılan yıkamalar

daha yüksek tuz konsantrasyonlarında (ör. 5X SSC) yapılabilir.

Yukarıdaki koşullardaki değişikliklerin, melezleşme deneylerinde arka planı baskılamak için kullanılan alternatif
5 bloke edici reaktiflerin dahil edilmesi ve / veya ikamesi yoluyla gerçekleştirilebileceği unutulmamalıdır. Tipik bloke edici reaktifler arasında Denhardt'ın reaktifi, BLOTTO, heparin, denatüre edilmiş somon spermi DNA'sı ve ticari olarak temin edilebilen özel formülasyonlar bulunur. Spesifik
10 bloke edici reaktiflerin dahil edilmesi, uyumluluk problemlerinden ötürü, yukarıda tarif edilen melezleşme koşullarında değişiklikler gerektirebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, iki amino asidin veya iki nükleik asidin "özdeşlik yüzdesi", Karlin ve Altschul
15 algoritması kullanılarak belirlenir (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990), değişiklik Karlin ve Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Böyle bir algoritma, Altschul et al.'nın NBLAST ve XBLAST programlarına dahil edilmiştir (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). BLAST
20 nükleotit araştırmaları, açıklamadaki nükleik asit moleküllerine nükleotid sekansları kimliğini belirlemek için NBLAST programı, skor=100, kelime uzunluğu=12 ile gerçekleştirilir. BLAST protein araştırmaları, açıklamadaki polipeptide amino asit sekansı kimliğini belirlemek için
25 XBLAST programı, skor=50, kelime uzunluğu=3 ile gerçekleştirilir. Karşılaştırma amacıyla boşluklu hizalamalar elde etmek için, açıklandığı üzere Gapped BLAST kullanılmıştır, Altschul et al. (Nükleik Asitler. Res. 25:3389-3402, 1997). BLAST ve Aralıklı BLAST programları
30 kullanılırken, ilgili programların (yani XBLAST ve NBLAST) varsayılan parametreleri kullanılmıştır.

Mevcut açıklamanın diğer uygulamaları en az %70 özdeşlik, tercihen en az %80 özdeşlik ve en çok tercihen en az %90

özdeşliğe sahip olan laminin-521 zincir polipeptitlerini kodlayan polinükleotitler bulunur: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ve SEQ ID NO: 6.

Burada kullanıldığı şekliyle "α5 polinükleotit", bir laminin α5 zincirini kodlayan polinükleotidlere işaret eder. Bu gibi polinükleotitler, aşağıdakilerin bir veya daha fazlası ile karakterize edilebilir: (a) SEQ ID NO: 5'ten seçilen bir sekans ile en az %70 özdeşlik, tercihen %80 özdeşlik ve en çok tercihen en az % 90 özdeşlik gösteren polipeptitleri kodlayan polinükleotidler, (b) SEQ ID NO: 5'in kodlama sekansının veya tamamlayıcı sekanslarının düşük veya yüksek sıklık koşulları altında melezleşen polinükleotidler; veya (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3 ve R2-R4'ten oluşan gruptan seçilen genel bir yapıya sahip bir laminin α5 zincir polipeptidini kodlayan polinükleotidlerdir ki burada R1 ve R2 yukarıda tarif edildiği gibidir, R3 salgılanan bir α5 zinciri ve R4 bir epitop etiketi içeren salgılanan bir α5 zinciridir.

Burada kullanıldığı şekliyle "β2 polinükleotit", aynı adı taşıyan bir β2 laminin zincirini kodlayan polinükleotidlere işaret eder. Bu gibi polinükleotitler, aşağıdakilerin bir veya daha fazlası ile karakterize edilebilir: (a) SEQ ID NO: 4'ten seçilen bir sekans ile en az %70 özdeşlik, tercihen %80 özdeşlik ve en çok tercihen en az %90 özdeşlik gösteren polipeptitleri kodlayan polinükleotidler, (b) SEQ ID NO: 4'ün kodlama sekansının veya bunların tamamlayıcı sekanslarının düşük veya yüksek sıklık koşulları altında melezleşen polinükleotidler, (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3 ve R2-R4 arasından seçilen genel bir yapıya sahip bir polipeptidi kodlayan polinükleotitler, ki burada R1 ve R2 yukarıda tarif edildiği gibi, R3 salgılanan bir β2 zinciridir ve R4 bir epitop etiketi içeren salgılanan β2 zinciridir.

Burada kullanıldığı şekliyle "γ1 polinükleotit", aynı adı taşıyan bir γ1 laminin zincirini kodlayan polinükleotidlere işaret eder. Bu gibi polinükleotitler, aşağıdakilerin bir veya daha fazlası ile karakterize edilebilir: (a) SEQ ID NO: 6'dan seçilen bir sekans ile en az %70 özdeşlik, tercihen %80 özdeşlik ve en çok tercihen en az %90 özdeşlik gösteren polipeptitleri kodlayan polinükleotidler, (b) SEQ ID NO: 6'nın kodlama sekansının veya tamamlayıcı sekanslarının düşük veya yüksek sıklık koşulları altında melezleşen polinükleotidler; veya (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3 ve R2-R4 arasından seçilen genel bir yapıya sahip bir polipeptidi kodlayan polinükleotidler, burada R1 ve R2 yukarıda tarif edildiği gibidir, R3 salgılanan bir γ1 zinciridir ve R4 bir epitop etiketi içeren salgılanmış bir γ1 zinciridir.

Burada kullanıldığı şekli ile "epitop etiketi" terimi, bir kimerik proteinin fragmanı olarak ifade edilen bir polipepti dizisine değinmekte olup burada epitop etiketi, epitop etiketine karşı üretilen antikorların bağlanması için bir tanıma yeri olarak veya başka moleküllerin bağlanması için işlev görür. Bu, etiketi içeren dizilerin afinite saflaştırılması için kullanılabilir.

Tercih edilen uygulamalarda laminin α5, β2 ve γ1 zincirlerini veya bunların fragmanlarını kodlayan cDNA'lar bir ekspresyon vektörüne alt klonlanmıştır. Alternatif olarak, bir veya daha fazla intron dahil olmak üzere laminin α5, β2 ve/veya γ1 gen sekansları, bir ekspresyon vektörüne alt klonlama için kullanılabilir.

Başka yönleriyle mevcut açıklama, α5, β2 ve γ1 laminin-521 zincirlerinden oluşan gruptan seçilen bir sekans içeren en az bir polipeptit sekansını kodlayan nükleik asit dizilerine işlevsel olarak bağlı olan promotör sekansları içeren bir ekspresyon vektörü ile transfekte edilmiş laminin-521

eksprese edici hücreler sağlar ki burada transfekte edilmiş hücreler, rekombinant laminin zincirini içeren heterotrimerik laminin-521 salgılar. Tercih edilen uygulamalarda hücreler, daha da tercihen bütün insan zincirleri olan $\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ laminin-521 zincirlerini içeren polipeptit sekanslarını kodlayan nükleik asit sekanslarına işlevsel olarak bağlı promotör sekansları içeren rekombinant ekspresyon vektörleri ile sistematik olarak transfekte edilir. Çoklu transfeksiyonlardan sonra hücreler, heterotrimerik r-laminin-521'i oluşturan rekombinant laminin-521 zincirlerini eksprese eder.

Ekspresyon vektörlerinin ökaryotik hücrelere transfeksiyonu, bunlarla sınırlı olmamak üzere, kalsiyum fosfat birlikte çökeltme, elektroporasyon veya lipozom ortamı, DEAE dekstran ortamı, polikasyonik ortamı veya viral ortamı transfeksiyon gibi teknolojik olarak bilinen herhangi bir teknikle yapılabilir. Bakteriyel hücrelerin transfeksiyonu standart yöntemlerle yapılabilir.

Tercih edilen uygulamalarda, hücreler stabil olarak transfekte edilir. Stabil transfeksiyon ve uygun transfekte edilmiş hücrelerin seçimi için yöntemler, teknolojiye bilinmektedir. Tercih edilen diğer düzenlemelerde, bir CMV promoter tahrikli ekspresyon vektörü, bir insan böbrek embriyonik 293 hücre soyunda kullanılır.

R-laminin-521'i ifade edebilen ve salgılayabilen herhangi bir hücre kullanılabilir. Tercihen, ökaryotik hücreler kullanılır ve en çok tercihen, sınırlı olmamakla birlikte, böbrek ve epitelyal hücre çizgileri dahil olmak üzere memeli hücreleri kullanılır. Bireysel zincirlerin veya r-laminin-521'in ekspresyonunu tahrik etmek için kullanılan promoter dizisi, kurucu olabilir (bunlarla sınırlı olmamak üzere, CMV, SV40, RSV, aktin, EF dahil çeşitli promoterlerin herhangi biri tarafından tahrik edilir) veya uyarılabilir (bunlarla sınırlı

olmamak üzere, tetrasiklin, ekdison, steroide duyarlı bir dizi uyarılabilir promoter ile sürülebilir). Laminin-521 protein katlanması ve işlevi için karbonhidrat ve di-sülfid post-translasyonel modifikasyonların gerekli olduğuna inanılmaktadır. Bu, diğer sistemlerin, örneğin antikör üretimi için antijenler elde etmek için yararlı olmasına rağmen, işlevsel r-laminin-521 üretmek için tercih edilen ökaryotik hücrelerin kullanımını sağlar. En çok tercih edilen uygulamalarda, memeli hücreleri laminin $\beta 2$ zincirini endojen olarak ekprese etmez. Tercih edilen başka uygulamalarda hücreler, tüm laminin-521 zincirlerini endojen olarak ifade etmez.

Protein, epitop etiketleri ve nakil sinyalleri gibi proteinin saflaştırılmasını teşvik etmek için yararlı ek sekanslar içerebilir. Bu epitop etiketlerinin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, FLAG (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), myc (9E10) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 6-His (Invitrogen; Novagen, Madison, Wis.) ve HA (Boehringer Mannheim Biochemicals). Bu nakil sinyallerinin örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, dışa aktarım sinyallerini, salgılama sinyallerini, nükleer lokalizasyon sinyallerini ve plazma membranı lokalizasyon sinyallerini içerir.

Bazı uygulamalarda, laminin zinciri polipeptit sekanslarından veya bunların fragmanlarından en az biri, bir "epitop etiketi"ni kodlayan bir nükleik asit sekansına işlevsel olarak bağlıdır, böylece zincirlerden en az biri ekprese edilen bir epitop etiketi ile bir füzyon proteini olarak eksprese edilir. Epitop etiketi, sonuçta ortaya çıkan r-laminin-521 işlevsel kaldığı sürece, amino terminali, karboksi terminali olarak veya r-laminin-521'i içeren polipeptit zincirlerinden herhangi birine içsel olarak eksprese edilebilir.

Diğer uygulamalarda r-laminin-521 zincirlerinden biri, bir
birinci epitop etiketine sahip bir füzyon proteini olarak
ifade edilir ve en az bir başka r-laminin zinciri, bir ikinci
farklı epitop etiketi ile bir füzyon proteini olarak ifade
5 edilir. Bu, birden fazla saflaştırma turunun
gerçekleştirilmesine izin verir. Alternatif olarak, aynı
epitop etiketi, r-laminin zincirlerinden birden fazlasına
sahip füzyon proteinleri oluşturmak için kullanılabilir.

Başka uygulamalarda epitop etiketi, r-laminin-521
10 zincir(ler)inden ayrılabilir olacak şekilde tasarlanabilir.
Alternatif olarak, hiçbir epitop etiketi, r-laminin-521
zincirlerinin herhangi birine kaynaştırılmamıştır ve r-
laminin-521, laminin-521 spesifik antikorlar veya laminin-
521'i bağlayan başka moleküller kullanılarak afinite
15 kromatografisi dahil, fakat bununla sınırlı olmayan, standart
tekniklerle izole edilir.

Tek bir laminin zinciri ile transfekte edilen hücrelerden
gelen ortamlar, başlangıçta laminin zincirine özgü antikorlar
kullanılarak Western blotları üzerinde analiz edilir.
20 Transfeksiyonu takiben tek laminin zincirlerinin ekspresyonu
genellikle hücre içidir. Tek tek transfekte edilmiş
zincir(ler)e karşı reaktivite gösteren klonlar, transfekte
edilmiş genin birleşmesini doğrulamak için PCR, ters
transkripsiyon-PCR veya nükleik asit hibridizasyonu gibi
25 herhangi bir uygun yöntemle doğrulanır. Tercihen, bu tür
klonlardan genomik DNA preparatlarının analizi, laminin
zincirine özgü primer çiftleri kullanılarak PCR ile yapılır.
Üç zincirin her birini üreten transfekte edilmiş klonlardan
gelen ortam, r-laminin-521 salgılanması ve / veya aktivitesi
30 için, Western blot analizi ve hücre bağlama deneyleri dahil
olmak üzere herhangi bir uygun yöntemle daha fazla analiz
edilir.

Tercih edilen uygulamalarda, r-laminin-521'in saflaştırılması, bir antikör afinite kolonundan transfekte edilmiş hücrelerden ortam geçirilerek gerçekleştirilir. Bazı uygulamalarda üzerinde eksprese edilen bir peptit epitopuna karşı antikörler rekombinant zincirlerden en az bir tanesi bir afinite kolonuna bağlanır ve medyaya salgılanan r-laminin-521'i bağlar. r-laminin-521, kolondan fazla peptit geçirerek kolondan alınır. Birbirinden ayrılmış fraksiyonlar, jel elektroforezi ve Western blot analizi de dahil olmak üzere herhangi bir uygun yöntemle analiz edilir. Başka uygulamalarda peptit epitopu, saflaştırmadan sonra ayrılabilir. Diğer uygulamalarda iki veya üç ayrı r-laminin zinciri, her biri farklı bir epitop etiketine sahip, iki veya üç saflaştırma safhasına ve iki veya üç kez yalıtılmış bir r-laminin-521'e izin veren füzyon proteinleri olarak ifade edilir. Epitop etiketi, arıtma işleminden sonra r-laminin-521 zincir(ler)inden ayrılabilir olacak şekilde tasarlanabilir. Alternatif olarak, hiçbir epitop etiketi, r-laminin-521 zincirlerinin herhangi birine kaynaştırılmamıştır ve r-laminin-521, laminin-521 spesifik antikörler veya laminin-521'i bağlayan başka moleküller kullanılarak afinite kromatografisi dahil, fakat bununla sınırlı olmayan, standart tekniklerle izole edilir.

Başka uygulamalarda r-laminin-521'in saflaştırılması, transfekte hücrelerden bir jel-filtrasyon kromatografisi kolonundan ortamın geçirilmesiyle gerçekleştirilir. Birbirinden ayrılmış fraksiyonlar, jel elektroforezi ve Western blot analizi de dahil olmak üzere herhangi bir uygun yöntemle analiz edilir. r-laminin-521 içeren fraksiyonlar toplanır ve numunenin saflığı, jel elektroforezi ve Western blot analizi dahil olmak üzere herhangi bir uygun yöntemle değerlendirilir. Bazı uygulamalarda protein çözeltisi, proteinin daha yüksek saflığını elde etmek için bir jel filtrasyon kromatografisi kolonundan geçirilebilir. Bazı

uygulamalarda daha yüksek saflıkta r-laminin-521 çözeltisi elde etmek için, önceki saflaştırma adımlarından gelen ortam veya r-laminin-521 çözeltisi, bir iyon değişim kolonundan geçirilebilir. Birbirinden ayrılmış fraksiyonlar, jel elektroforezi ve Western blot analizi de dahil olmak üzere herhangi bir uygun yöntemle analiz edilir. r-laminin-521 içeren fraksiyonlar toplanır ve numunenin saflığı, yukarıda belirtilen uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilir.

Mevcut uygulamanın laminin-521 polipeptit zincirleri ayrıca (i) ikame edilmemiş amino asit kalıntılarının genetik kod tarafından kodlanmış olabileceği veya olmayabildiği bir veya daha fazla korunmamış amino asit tortusuyla ikameler de içerir, veya (ii) ikame edici gruplara sahip bir veya daha fazla amino asit tortusu ile ikame veya (iii) polipeptidin (örneğin polietilen glikol) stabilitesini ve/veya çözünürlüğünü arttırmak için bir bileşik gibi başka bir bileşik ile olgun polipeptidin füzyonu veya (iv) polipeptitin bir IgG Fc füzyon bölgesi peptidi gibi ek amino asitler veya lider veya sekretuar sekans ile füzyonu veya saflaştırmayı kolaylaştıran bir sekans içerir. Bu tip varyant polipeptitler, buradaki öğretilen tekniklerde uzman kişilerin faaliyet kapsamı içinde kabul edilir.

Örneğin yüklü amino asitlerin diğer yüklü veya nötr amino asitlerle amino asit ikamelerini içeren polipeptit varyantları, daha az agregasyon gibi gelişmiş özelliklere sahip proteinler üretebilir. Farmasötik formülasyonların agregasyonu, hem aktiviteyi azaltır hem de agregatın immünojenik aktivitesinden dolayı klirensi arttırır. (Pinckard et al., Klinik Deneysel İmmünoloji 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diyabet 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Kritik Rev. Terapötik İlaç Taşıyıcı Sistemler, 1993, cilt. 10, 307-377 [1993].

Belirli uygulamalarda, izole edilmiş laminin-521 üç zincir içerir. Birinci zincir, SEQ ID NO: 1'in bir polipeptit sekansı ile en az %80 özdeşliğe sahip bir polipeptit içerir (diğer bir deyişle $\alpha 5$ laminin zinciri). İkinci zincir, SEQ ID NO: 2'nin bir polipeptit sekansı ile en az %70 özdeşliğe sahip bir polipeptit içerir (diğer bir deyişle $\beta 2$ laminin zinciri). Üçüncü zincir, SEQ ID NO: 3'ün bir polipeptit sekansı ile en az %70 özdeşliğe sahip bir polipeptit içerir (diğer bir deyişle $\gamma 1$ laminin zinciri). Bu birinci, ikinci ve üçüncü zincirler, rekombinant laminin-521'e birleştirilmiştir.

Daha spesifik uygulamalarda, birinci zincirin polipeptidi SEQ ID NO: 1'in polipeptit sekansı ile en az %80 özdeşliğe sahiptir, ikinci zincirin polipeptidi SEQ ID NO: 2'nin polipeptit sekansı ile en az %80 özdeşliğe sahiptir ve üçüncü zincirin polipeptidi, SEQ ID NO: 3'ün polipeptit sekansı ile en az %80 özdeşliğe sahiptir.

Daha da spesifik uygulamalarda, birinci zincirin polipeptidi SEQ ID NO: 1'in polipeptit sekansı ile en az %90 özdeşliğe sahiptir, ikinci zincirin polipeptidi SEQ ID NO: 2'nin polipeptit sekansı ile en az %90 özdeşliğe sahiptir ve üçüncü zincirin polipeptidi, SEQ ID NO: 3'tün polipeptit sekansı ile en az %80 özdeşliğe sahiptir.

Belirli uygulamalarda birinci zincir SEQ ID NO: 1'in polipeptit sekansını içerir, ikinci zincir SEQ ID NO: 2'in polipeptit sekansını içerir, ve üçüncü zincir SEQ ID NO: 3'ün polipeptit sekansını içerir.

Belirli uygulamalarda birinci zincir SEQ ID NO: 1'in polipeptit sekansıdır, birinci zincir SEQ ID NO: 2'nin polipeptit sekansıdır ve üçüncü zincir SEQ ID NO: 3'ün polipeptit sekansıdır.

Başka yönlerden bu açıklama, tek hücre süspansiyonuna ayrıştıktan sonra insan embriyonik kök hücrelerinin hayatta

kalmasına izin veren yeni bir malzeme olan izole edilmiş laminin-521'i sağlar. Kök hücreler, tripsin-EDTA muamelesiyle tek hücre süspansiyonuna ayrıldı, santrifüjleme ile peletlendi, 03 ortamda yeniden süspansiyon haline getirildi, 40 µm'lik bir elekten süzüldü ve izole edilmiş laminin-521, laminin-511 veya Matrigel ile önceden kaplanmış hücre kültürü kapları üzerinde 30.000 hücre/cm²'lik bir yoğunlukta kaplandı. Kültürde bir gün sonra Matrigel üzerine kaplanan hücreler, bilinen teknik nedenlerden dolayı öldüler. Laminin-521 üzerine kaplanan insan embriyonik kök hücreleri ve çoğu zaman laminin-511 üzerinde sağ kalmış, çoğalmaya başlamış ve küçük pluripotent hücrelerinin kolonileri oluşturmuşlardır.

Başka bakış açılarından mevcut açıklama, insan embriyonik kök hücrelerini pluripotent durumda genişletmek için bir yöntem sağlamaktadır. Laminin-521 üzerinde tek hücre süspansiyonu içinde kaplanan insan embriyonik kök hücrelerinin hayatta kaldığı ve bu alanda bilinen klasik yöntemlerden daha yüksek bir oranda çoğaldığı gösterilmiştir. 3 geçişten (1 ay) sonra, tek bir hücre süspansiyonu içinde geçirilen hücreler, 20 geçişten (3 ay) sonra Matrigel üzerinde parçalanmış hücre kültürleri ile aynı sayıda hücre bölünmesi geçirdi. Bu nedenle yeni yöntem, önemli ekonomik karlar sağlayabilen, zaman ve işgücü açısından avantajlıydı.

Laminin-521 normal olarak insan pluripotent embriyonik kök hücreleri tarafından eksprese edilir ve salgılanır, ayrıca böbrekler, nöromusküler eklemler, akciğerler ve plasentada bulunabilir.

Saf laminin-521'in mevcudiyeti, proteinin hücreler fenotiplerin hücreler farklılaşması ve bakımı üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalara olanak sağlayabilir. Bu nedenle, dokularda yaralanmaları tedavi etmek, hücre bağlanmasını, genleşmeyi ve migrasyonu teşvik etmek, ex vivo hücre tedavisi, tıbbi cihazların biyo uyumluluğunu

geliştirmek ve geliştirilmiş hücre kültürü cihazlarını ve ortamlarını hazırlamak da dahil olmak üzere, ancak bunlarla sınırlı olmayan çok sayıda araştırma ve terapötik amaç, saflığı bozulmadan izole edilmiş laminin-521 mevcut olsa daha da geliştirilirdi. Ayrıca, bu protein erken memeli embriyosunda ekprese edildiğinden dolayı saf laminin-521'in kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi önem taşımaktadır.

Dolayısıyla, teknolojiye araştırma ve terapötik amaçlar için izole edilmiş laminin-521'e ve izole edilmiş laminin-521 yapmak için yöntemlere ihtiyaç vardır. Laminin-521, kimyasal olarak tanımlanmış, besleyici içermeyen ve hayvansal protein içermeyen (ksenon içermeyen) şartlar altında tamamen ayrılmış insan ES ve indüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücrelerinin kendi kendini yenileme ve hızlı çoğalması için bir matris görevi görebilir. LN-521 tabanlı bir sistemin kullanımı ile otomatikleştirilmesi kolaydır ve insan ES / iPS kültürlerinin hızlı bir şekilde büyümesini sağlar.

Mevcut açıklama ayrıca hücrelere, özellikle kök hücrelere beslenmeyi sağlamak için kullanılabilen bir hücre kültürü ortamı ile ilgilidir. Bu bağlamda, kök hücreler kültürlenmek için tipik olarak iki şey gerektirir: (1) kök hücre için yapısal bir destek sağlayan bir substrat veya kaplama; ve (2) kök hücrelerine beslenme sağlamak için bir hücre kültürü ortamı. Substrat veya kaplama (1) genellikle bir petri kabı veya başka bir kap üzerine yerleştirilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "kendi kendini yenileme" terimi, kök hücrenin hücre bölünmesinin sayısız döngüsünden geçme ve farklılaşmamış (yani pluripotent) kalma yeteneğini ifade eder. Pluripotency'in kendisi, kök hücrenin herhangi bir hücre tipine farklılaşma yeteneğini ifade eder. "Proliferasyon" terimi, kök hücrenin bölünme yeteneğini ifade eder. Sağkalım, kök hücrenin farklılaşmış veya farklılaşmamış

olsun, yaşama kabiliyetini ifade eder ve kök hücrenin bölünme veya farklılaşma yeteneğini sürdürmesini gerektirmez.

Mevcut açıklamanın hücre kültürü ortamı, laminin-521 ve / veya laminin-511 içeren bir substrat ile kullanılmak için özellikle uygundur. Bu lamininler, $\alpha 6 \beta 1$ integrinlerini aktive eder ve bu da PI3K / Akt yolunun aktivasyonuna neden olur. Bu kök hücrelerin pluripotentlik, kendini yenileme ve / veya proliferasyonunu artırır. Substratın, ayrı zincirler ya da bunların fragmanları olarak, ya bozulmamış, laminin-521 ya da laminin-511'den oluşabileceği düşünülmektedir. Rekombinant laminin-521 ve rekombinant laminin-511 ticari olarak temin edilebilir. Farklı verimliliklerde olsa da, birçok farklı molekül PI3K / Akt yolunu aktive edebilir. Örneğin, TGF beta 1 ve bFGF bu yolu aktive eder. Laminin-521 ve / veya laminin-511'in kullanımı, bu tür moleküllerin miktarının hücre kültürü ortamında indirgenmesine izin verir. Laminin-521, PI3K / Akt yolunu aktive ederek $\alpha 6 \beta 1$ integrini üzerinden en yüksek sinyal dozunu iletir. Laminin-521'in kullanımı, tek hücreli enzimatik ayrışmadan sonra hücre sağkalımını arttırmak için hücre-zararlı rho-kinaz (ROCK) inhibitörü eklenmeden tek hücreli süspansiyon geçişine izin verir. Daha önceleri yapay apoptoz inhibitörleri kullanmadan insan ES hücrelerinin tek hücreli enzimatik geçişi imkansızdı. Geçiş prosedürünün basitliği, deneysel varyansın azaltılması anlamına gelir ve yüksek verimli hücre kültürü için sürecin otomatikleştirilmesini ve hücre kültürü personelinin kapsamlı eğitimi ve maliyetleri olmadan sonuçların elde edilmesini sağlar. Ek olarak, laminin-521 veya laminin-511 üzerine kaplanan insan ES ve iPS hücreleri, tek bir katman olarak büyür, bu da hücrelerin matris ve hücre kültür ortamına eşit olarak maruz kalması nedeniyle kültürü homojen hale getirir. ROCK inhibitörünün yokluğunda tek hücreler olarak geçirilen laminin-521 üzerinde kimyasal olarak tanımlanmış, ksenonsuz bir ortamda büyütülen bu insan ES hücre kültürleri, kümeler

halinde geçirilen Matrigel üzerinde yetiştirilen hücrelere kıyasla daha iyi bir büyüme hızında aylar boyunca sürekli olarak genişler . Bu pluripotent uzun vadeli genişletilmiş hücreler homojen olarak Oct4 eksprese eder ve karyotipik olarak normal kalır. Böylece, insan sağkalımı ve proliferasyon kapasitesi ile insan ES ve iPS hücreleri elde edilebilir.

Ortalama temas alanı ve yayılan homojenlik, laminin-511 üzerinde mevcut olan diğer substrata kıyasla kültürlenен hücreler için çok daha büyüktür. 3 ay boyunca laminin-511 üzerinde büyüyen insan ES hücrelerinin pluripotentliğini korur ve SCID farelere yerleştirildikten sonra teratomlar üretebilir. Laminin-511, diğer bilinen matrisler birkaç haftadan daha uzun bir süre bunu yapamadığı zaman, LIF veya besleyici hücrelerin varlığı olmadan 5 aydan fazla bir süre boyunca fare ES hücrelerinin kendi kendini yenilemesini destekler.

Hücre kültürü substratı ayrıca bir kaderin içerir. Kaderinler hücre adezyonunda önemli rol oynayan, doku içindeki hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlayan tip-1 transmembran proteinleri sınıfıdır. Çalışmak için kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarına bağımlıdırlar. Kaderinler desmogleins ve desmocollins olarak da bilinir. Yapısal olarak, kaderinler hücre dışı Ca^{2+} bağlama alanlarını içerir. Belirli uygulamalarda, hücre kültürü substratında kullanılan kaderin epitel kaderin veya e-kaderindir.

Laminin kaderine ağırlık oranı yaklaşık 5:1 ila yaklaşık 15:1 veya yaklaşık 5:1 ila yaklaşık 10:1 arasında olabilir. Özel uygulamalarda hücre kültürü substratı, laminin ve kaderinden oluşur. Diğer spesifik uygulamalarda laminin laminin-521 ve kaderin e-kaderindir.

Bu hücre kültürü ortamı ile yetiştirilecek kök hücreler, pluripotent kök hücreleri, embriyonik kök hücreler, yetişkin kök hücreleri, fetal kök hücreler, amniyotik kök hücreler ve genellikle herhangi bir pluripotent kök hücresi tarafından uyarılabilir.

Tipik olarak hücre kültürü ortamı, farklılaşmayı önlemek ve çoğalmayı geliştirmek için çok sayıda ve çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler içerir. Mevcut uygulamada hücre kültür ortamının bir avantajı, pek fazla büyüme faktörü veya sitokin içermemesi veya bu kadar yüksek miktarlarda olmamasıdır.

En genel şekliyle, mevcut açıklamanın hücre kültürü ortamı, tipik olarak kullanılandan daha düşük miktarlarda temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gerektirir. Hücre kültür ortamının, bFGF'nin mililitre başına sıfır ila 3,9 nanogramdan (ng / mL) daha fazlasını içerdiği düşünülmektedir. bFGF, insan bFGF'dir, böylece hücre kültür ortamı tamamen insandır ve tanımlanmıştır. Daha spesifik bazı düzeneklerde hücre kültürü ortamı, 3.5 veya daha düşük ng / mL bFGF içerebilir. Başka uygulamalarda hücre kültürü ortamı, 0.5 ila 3.5 ng / mL bFGF içerebilir. Bazı uygulamalarda hücre kültürü ortamı sıfır bFGF'ye sahip olabilir, yani bFGF mevcut değildir.

Genel olarak hücre kültür ortamı, en az bir inorganik tuzun, en az bir eser mineralin, en az bir enerji substratının, en az bir lipitin, en az bir amino asidin, en az bir vitaminin ve en az bir büyüme faktörünün (bFGF'nin yanı sıra) çözünmüş olarak bulunduğu bir sıvı faz içerir. Aşağıdaki Tablo 1, mevcut açıklamanın hücre kültürü ortamında mevcut olabilecek çeşitli içerik maddelerinin bir listesini ve içeriğin mevcut olması halinde minimum ve maksimum konsantrasyonları içermektedir. Değerler bilimsel gösterimde sunulmuştur. Örneğin, "4.1E-01", 4.1×10^{-01} olarak yorumlanmalıdır.

Tablo 1

Bileşen	Molar kütle (g/mol)	Min. Kon. (mM)	Maks Kon. (mM)	Min. Kon. (ng/mL)	Maks Kon (ng/mL)
İNORGANİK TUZLAR					
Kalsiyum klorür (susuz)	110.98	4.1E-01	1.6E+00	4.6E+04	1.8E+05
	238.3	5.9E+00	1.8E+01	1.4E+06	4.2E+06
HEPES	42.39	4.9E-01	1.5E+00	2.1E+04	6.2E+04
Magnezyum klorür (susuz)	95.21	1.2E-01	3.6E-01	1.1E+04	3.4E+04
Magnezyum Sülfat) (MgSO ₄)	120.37	1.6E-01	4.8E-01	1.9E+04	5.8E+04
Potasyum klorür (KCl)	74.55	1.6E+00	4.9E+00	1.2E+05	3.6E+05
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	84.01	9.0E+00	4.4E+01	7.6E+05	3.7E+06
Sodyum klorür (NaCl)	58.44	4.7E+01	1.4E+02	2.8E+06	8.3E+06
Sodyum fosfat, dibazik (susuz)	141.96	2.0E-01	5.9E-01	2.8E+04	8.3E+04
Sodyum fosfat, monobazik monohidrat (NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O)	137.99	1.8E-01	5.3E-01	2.4E+04	7.3E+04
ESER MİKTARDA MİNERALLER					
Ferrik nitrat (Fe(NO ₃) ₃ - 9H ₂ O)	404	4.9E-05	1.9E-04	2.0E+01	7.5E+01
Demir sülfat heptahidrat (FeSO ₄ - 7H ₂ O)					
Bakır (II) sülfat pentahidrat (CuSO ₄ - 5H ₂ O)	249,69	2.0E-06	8.0E-06	5.1E-01	2.0E+00
Çinko sülfat pentahidrat (ZnSO ₄ - 7H ₂ O)	287,56	5.9E-04	1.8E-03	1.7E+02	5.1E+02
Amonyum metavanadat NH ₄ VO ₃	116,98	5.5E-06	1.6E-05	6.4E-01	1.9E+00
ESER MİKTARDA MİNERALLER					
Manganez sülfat monohidrat ((MnSO ₄ -H ₂ O)	169,02	9.9E-07	3.0E-06	1.7E-01	5.0E-01

NiSO ₄ -6H ₂ O	262,85	4.9E-07	1.5E-06	1.3E-01	3.8E-01
Selenyum	78,96	8.9E-05	2.7E-04	7.0E+00	2.1E+01
Sodyum meta silikat Na ₂ SiO ₃ -	284,2	4.8E-04	1.4E-03	1.4E+02	4.1E+02
SnCl ₂	189,62	6.2E-07	1.9E-06	1.2E-01	3.5E-01
Molibdik asit, amonyum tuzu	1235,86	9.9E-07	3.0E-06	1.2E+00	3.7E+00
CdCl ₂	183,32	6.1E-06	1.8E-05	1.1E+00	3.4E+00
CrCl ₃	158,36	9.9E-07	3.0E-06	1.6E-01	4.7E-01
AgNO ₃	169,87	4.9E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
AlCl ₃ -6H ₂ O	241,43	2.4E-06	7.3E-06	5.9E-01	1.8E+00
Baryum asetat (Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	255,42	4.9E-06	1.5E-05	1.3E+00	3.8E+00
CoCl ₂ -6H ₂ O	237,93	4.9E-06	1.5E-05	1.2E+00	3.5E+00
GeO ₂	104,64	2.5E-06	7.5E-06	2.6E-01	7.8E-01
KBr	119	4.9E-07	1.5E-06	5.9E-02	1.8E-01

(Devam)

ESER MİKTARDA MİNERALLER					
Kl	166	5.0E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
NaF	41,99	4.9E-05	1.5E-04	2.1E+00	6.2E+00
RbCl	120,92	4.9E-06	1.5E-05	5.9E-01	1.8E+00
ZrOCl ₂ -8H ₂ O	178,13	4.9E-06	1.5E-05	8.7E-01	2.6E+00
ENERJİ SUBSTRATLARI					
D Glikoz	180,16	6.9E+00	2.1E+01	1.2E+06	3.7E+06
Sodyum piruvat	110,04	2.0E-01	5.9E-01	2.2E+04	6.5E+04
LİPİTLER					
Linoleik asit	280,45	9.4E-05	2.8E-04	2.6E+01	7.9E+01
Lipoik asit	206,33	2.0E-04	7.8E-04	4.1E+01	1.6E+02
Arakidonik asit	304,47	6.5E-06	1.9E-05	2.0E+00	5.9E+00

Kolesterol	386,65	5.6E-04	1.7E-03	2.2E+02	6.5E+02
DL alfa tokoferol asetat	472,74	1.5E-04	4.4E-04	6.9E+01	2.1E+02
Linoleik asit	278,43	3.5E-05	1.0E-04	9.7E+00	2.9E+01
Miristik asit	228,37	4.3E-05	1.3E-04	9.8E+00	2.9E+01
Oleik asit	282,46	3.5E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
Palmitik asit	256,42	3.8E-05	1.1E-04	9.8E+00	2.9E+01
Palmitoleik asit	254,408	3.9E-05	1.2E-04	9.8E+00	2.9E+01
Stearik asit	284,48	3.4E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
AMİNO ASİTLER					
L Alanin	89,09	2.5E-02	2.1E-01	2.2E+03	1.8E+04
L Arginin hidroklorür	147,2	2.7E-01	1.5E+00	4.0E+04	2.2E+05
L Asparagin H ₂ O	150,13	5.0E-02	2.1E-01	7.5E+03	3.1E+04
AMİNO ASİTLER					
L Aspartik asit	133,1	2.5E-02	2.1E-01	3.3E+03	2.7E+04
L Sistein HCl-H ₂ O	175,63	3.9E-02	1.2E-01	6.9E+03	2.1E+04
L Sistein diklorür	313,22	3.9E-02	1.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L Glutamik asit	147,13	2.5E-02	2.1E-01	3.7E+03	3.0E+04
L Glutamin	146,15	1.5E+00	4.4E+00	2.1E+05	6.4E+05
Glisin	75,07	1.5E-01	4.4E-01	1.1E+04	3.3E+04
L Histidin monodiklorür monohidrat	209,63	5.9E-02	1.8E-01	1.2E+04	3.7E+04
İzolösin	131,17	1.6E-01	4.9E-01	2.1E+04	6.4E+04
L Lösin	131,17	1.8E-01	5.3E-01	2.3E+04	7.0E+04
L Lisin hidroklorür	182,65	2.0E-01	5.9E-01	3.6E+04	1.1E+05
Metionin	149,21	4.5E-02	1.4E-01	6.8E+03	2.0E+04
L Fenilalanin	165,19	8.5E-02	2.5E-01	1.4E+04	4.2E+04
L Prolin	115,13	1.1E-01	3.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L Serin	105,09	1.5E-01	4.4E-01	1.5E+04	4.6E+04
L Treonin	119,12	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.3E+04
AMİNO ASİTLER					

L Tritofan	204,23	1.7E-02	5.2E-02	3.5E+03	1.1E+04
L Tirozin disodyum tuz hidrat	225,15	8.4E-02	3.7E-01	1.9E+04	8.4E+04
L Valin	117,15	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.2E+04
VİTAMİNLER					
Askorbik asit	176,12	1.3E-01	3.8E-01	2.2E+04	6.7E+04
Biyotin	244,31	5.6E-06	1.7E-05	1.4E+00	4.1E+00
B ₁₂	1355,37	2.0E-04	5.9E-04	2.7E+02	8.0E+02
Kolin klorür	139,62	2.5E-02	7.5E-02	3.5E+03	1.1E+04
D Kalsiyum pantotenat	238,27	1.8E-03	1.4E-02	4.4E+02	3.4E+03
Folik asit	441,4	2.4E-03	7.1E-03	1.0E+03	3.1E+03
i-İnositol	180,16	2.7E-02	1.1E-01	4.9E+03	1.9E+04
Niasinamit	122,12	6.5E-03	2.0E-02	7.9E+02	2.4E+03
Pridoksin hidroklorür	205,64	3.8E-03	1.1E-02	7.8E+02	2.4E+03
Riboflavin	376,36	2.3E-04	6.8E-04	8.6E+01	2.6E+02
Tiamin hidroklorür	337,27	3.3E-03	3.6E-02	1.1E+03	1.2E+04
BÜYÜME FAKTÖRLERİ/PROTEİNLER					
GABA	103,12	0	1.5E+00	0	1.5E+05
Pipekolik asit	129	0	1.5E-03	0	1.9E+02
bFGF	18000	0	2.17E-07	0	3.9E+00
TGF beta 1	25000	0	3.5E-08	0	8.8E-01
İnsan İnsülini	5808	0	5.9E-03	0	3.4E+04
İnsan Holo transferini	78500	0	2.1E-04	0	1.6E+04
BÜYÜME FAKTÖRLERİ/PROTEİNLER					
İnsan serumu Albümin	67000	0	2.9E-01	0	2.0E+07
Glutation (indirgenmiş)	307,32	0	9.6E-03	0	2.9E+03
DİĞER BİLEŞENLER					
Hipoksantin Na	136,11	5.9E-03	2.6E-02	8.0E+02	3.6E+03
Kırmızı Fenol	354,38	8.5E-03	2.5E-02	3.0E+03	9.0E+03

Putresin 2HCl	161,07	2.0E-04	5.9E-04	3.2E+01	9.5E+01
Timidin	242,229	5.9E-04	1.8E-03	1.4E+02	4.3E+02
2 Merkaptoetanol	78,13	4.9E-02	1.5E-01	3.8E+03	1.1E+04
Pluronik F-68	8400	1.2E-02	3.5E-02	9.8E+04	2.9E+05
Tween 80	1310	1.6E-04	4.9E-04	2.2E+02	6.5E+02

Hücre kültür ortamının sıvı fazı su, serum veya albümin olabilir.

Yukarıda Tablo 1’de listelenen maddelerin veya bileşenlerin çoğu gerekli değildir veya daha düşük konsantrasyonlarda kullanılabilir.

Hücre kültür ortamının, insülin veya bir insülin ikame maddesi içerebileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, hücre kültür ortamı transferrin veya bir transferrin ikamesi içerebilir.

Daha spesifik düzenlemelerde, hücre kültür ortamının (1) albümini, (2) insülini veya insülin ikame, (3) transferrin veya transferrin ikamesi veya bu üç bileşenin herhangi bir kombinasyonunu içermeyeceği düşünülmektedir.

Diğer hücre kültür ortamlarının, interlökin-1 beta (IL-1 veya katabolin), interlökin-6 (IL6) ya da pigment epitelyumdan türetilen faktör (PEDF) gibi büyüme faktörleri içerebileceğine dikkat edilmelidir. Bu tür büyüme faktörleri, mevcut açıklamanın hücre kültür ortamında mevcut değildir.

Bir hücre kültür ortamı için özel bir formül, Tablo 2’de verilmektedir:

Tablo 2

Bileşen	Miktar	Birim
bFGF	0,39	mikrogram (µg)
Albümin	1,34	milligram (mg)

İnsülin	2	mg
Lityum klorür	4,23	mg
GABA	0,01	mg
TGF beta 1	0,06	µg
Pipekolik asit	0,013	mg
L Glutamin	2,92	gram
Esansiyel olmayan	1	mL
DMEM/F12	100	mL

Bu bağlamda, esansiyel olmayan MEM amino asit çözeltisi tipik olarak 100X bir konsantre içinde sağlanır. Tablo 2'deki MEM, 1X'e kadar seyreltildikten sonra kullanılır ve aşağıdaki amino asitleri Tablo 3'te aşağıda listelenen konsantrasyonda içerir:

Tablo 3

MEM Amino asitler	Konsantrasyon (ng/mL)
Glisin	7.50E+03
L Alanin	8.90E+03
L Asparagin	1.32E+04
L Aspartik	1.33E+04
L Prolin	1.15E+04
L Serin	1.05E+04

DMEM/F12, Tablo 4'te listelenen aşağıdaki bileşenleri içerir:

Tablo 4

DMEM/F12 bileşenleri	Konsantrasyon (ng/mL)
----------------------	-----------------------

Glisin	187,5
L Alanin	44,5
L Arginin hidroklorür	1475
L Asparagin H ₂ O	75
L Aspartik asit	66,5
L Sistein hidroklorür H ₂ O	175,6
L Sistein 2HCl	312,9
L Glutamik asit	73,5
L Glutamin	3650
L Sistein hidroklorür H ₂ O	314,8
İzolösin	544,7
L Lösin	590,5
L Lisin hidroklorür	912,5
L Metionin	172,4
L Fenilalanin	354,8
L Prolin	172,5
L Serin	262,5
L Treonin	534,5
L Tritofan	90,2
L Tirozin disodyum tuz	557,9
L Valin	528,5
Biyotin	0,035
Kolin klorür	89,8
D Kalsiyum pentotenat	22,4
Folik asit	26,5
Niasinamit	20,2
Pridoksin hidroklorür	20
Riboflavin	2,19
	21,7
B 12 vitamini	6,8
i-İnositol	126
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	1166
Bakır (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0,013
Ferrik nitrat (Fe(NO ₃) ₃ ·	0,5

Demir sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,17
Magnezyum klorür (susuz)	286,4
DMEM/F12	Konsantrasyon
Magnezyum Sülfat) (MgSO_4)	488,4
Potasyum klorür (KCl)	3118
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	24380
Sodyum klorür (NaCl)	69955
Sodyum fosfat dibazik	710,2
Sodyum fosfat, monobazik	625
Çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,32
D Glikoz (Dekstroz)	31510
Hipoksantin Na	23,9
Linoleik asit	0,42
Lipoik asit	1,05
Kırmızı Fenol	81
Putresin 2HCl	0,81
Sodyum piruvat	550
Timidin	3,65

Laminin substratının, mevcut açıklamanın hücre kültür ortamı ile kombinasyonu, daha ucuz olabilen, fakat pluripotent kök hücrelerin korunmasında daha yüksek verimlilik sağlayan bir hücre kültürü sistemi ile sonuçlanır. Özünde, gereken her şey bir laminin ve minimum miktarda besindir. Bu hücre kültürü ortamı ile kombinasyon halinde kullanılan lamininin ya LN-511 ya da LN-521 olduğu özellikle düşünülmektedir.

Aşağıdaki örnekler, mevcut açıklamanın daha fazla açıklanması amacıyla verilmiştir. Örnekler sadece açıklama amaçlıdır ve açıklamaya göre yapılan cihazları burada belirtilen materyallere, koşullara veya işlem parametrelerine sınırlamak amaçlanmamıştır.

ÖRNEKLER

ÖRNEK 1

İnsan Laminini $\beta 2$ cDNA klonlanması

İnsan laminin $\beta 2$ cDNA'sının 5.6 kb fragmanı, 5'-GTGGTACCCACAGGCAGAGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 7) ve 5'-GCTCTAGAGCTCTTCAGT-GCATAGGC-3' (SEQ ID NO: 8) primerleri kullanılarak insan karaciğeri cDNA kitaplığından (BD Biyobilimler) PCR ile amplifiye edildi, böylece fragmanın uçlarına yapay XbaI ve KpnI kesme bölgeleri sokuldu. PCR amplifikasyonu sırasında hata oranını azaltmak için, Phusion™ yüksek duyarlılıkta PCR Kit (Finnzymes) kullanıldı. Daha sonra fragman XbaI ve KpnI ile olgunlaştırıldı ve aynı restriksiyon endonükleazları (pSKHLAMB2 plazmidi) ile sindirilmiş pSK vektörüne alt klonlandı. Dizinin bütünlüğünü doğrulamak için, birkaç pSKHLAMB2 plazmidi klonu dizildi. Sekanslama, ABI PRISM® BigDye™ Terminatör Çevrim Sekanslama Kiti (PE Applied Biosystems) kullanılarak bir ABI PRISM™ 310 Genetik Analizör (Perkin Elmer) üzerinde gerçekleştirildi. Daha fazla klonlama için sadece NCBI veri tabanı insan laminin $\beta 2$ dizisi ile eşleşen eşlemeler seçildi.

20 Ekspresyon Yapılanmaları

İnsan laminin $\beta 2$ zincirinin pSKHLAMB2 ekspresyonu için, XbaI ve KpnI ile olgunlaştırıldı ve XbaI-KpnI ile muamele edilmiş pcDNA 3.1(+) vektörüne (Invitrogen) alt klonlandı.

İnsan laminin 5 (HLN5Full.pcDNA yapılandırma) ve 1 (HG1 yapılandırma) ekspresyonunda kullanılan yapılandırmalar daha önce tarif edilmiş idi (Doi, M. et al., J. Biol. Chem. 277 (15), 12741-). 8 (2002)).

Antikorlar

Anti-laminin $\beta 2$ (MAB2066) monoklonal antikor (mAb) R&D Systems'dan satın alınmıştır. Anti-laminin $\alpha 5$ mAb (2F7) Abnova'dan satın alınmıştır. Anti-laminin $\beta 1$ mAb (MAB1921) Chemicon'dan satın alınmıştır. Anti-laminin $\gamma 1$ (H-190) tavşan

poliklonal antikoru, Santa Cruz Biotechnology, Inc.'ten satın alınmıştır.

Rekombinant Laminin-521'in Üretimi ve Saflaştırılması

5 r-laminin-521, 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosferinde DMEM %10 FCS içinde kültürlenmiş insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293, ATCC CRL-1573) içinde üretildi. Yabani tip hücreler, HG1 yapısı ile standart kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak transfeğe edildi ve kararlı koloniler, 100 mg/ml higromisin (Cayla) kullanılarak seçildi. Tüm diğer
10 hücre kültürü ve klonal genişleme, ilgili seçim antibiyotiklerinin sürekli mevcudiyetinde gerçekleştirildi. Son derece eksprese edici bir klon daha sonra insan laminin β2 yapısı ile transfeğe edildi ve stabil klonlar 500 mg / ml G418 (Life Technologies) kullanılarak seçildi. Hem laminin γ1
15 hem de laminin β2'yi yüksek oranda eksprese eden bir klon en sonunda HLN5Full.pcDNA yapısı ile transfeğe edildi ve stabil koloniler 200 mg / ml zeosin (Cayla) kullanılarak seçildi. En yüksek salgılanmayı gösteren klonlar daha da genişletildi.

20 r-laminin-521'in üretimi için, konfluent hücreler beş güne kadar DMEM içinde kültürlendi. r-laminin-521, anti-FLAG M2 matrisi (Sigma) kullanılarak afinite ile saflaştırıldı. Toplanan ortam, çalkalama ile gece boyunca 4°C'de matris ile parti modunda kuluçkaya yatırıldı. Bağlanmış r-laminin 521 oda sıcaklığında TBS / E 50 mg / ml FLAG peptit (Sigma) ile
25 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) içinde ile ayrıştırıldı. Ayrıştırma konsantre edildi ve tampon, 30 kD'lik kesme ultrafiltrasyonu (Millipore) kullanılarak PBS ile değiştirildi. Son olarak, konsantre edilmiş çözelti, kendiliğinden toplanmış polimerleri almak için 0.2 mm'lik bir
30 filtreden geçirildi.

Rekombinant Laminin-521'in Karakterizasyonu

Ortamda ve saflaştırmadan sonra salgılanan laminin %3-8 gradyan SDS-PAGE kullanılarak karakterize edildi. Proteinler

Sypro boyaması (Bio-Rad) kullanılarak görselleştirildi veya PVDF'ye aktarıldı (Şekil 3). Membranlar yukarıda tarif edilen antikörlerle problanmıştır. Yıkandıktan sonra, membranlar HRP-konjuge keçi antikörleri ile inkübe edildi.

- 5 İmmunoreaktivite, üreticinin talimatlarına göre bir kemiluminesan kit (Life Science Products) tarafından tespit edildi.

Yöntemler

İnsan ES hücresi kültürleri

- 10 İnsan ES hücreleri, kimyasal olarak tanımlanmış 03 ortamında (Rodin et al., Doğa Biyoteknolojisi, cilt 28, sayfa 611-615 (2010) içinde tarif edilmiştir) 37°C'de r-laminin-521-kaplı laboratuvar çanaklarında %5 CO₂ içinde kültürlendi. Hücreler, her 10-12 günde bir kez, 37°C'de 5 dakika süreyle Tripsin-
15 EDTA çözeltisine (GIBCO Invitrogen) maruz bırakılarak rutin olarak geçirildi. Daha sonra tek hücreli süspansiyona ayrılmak üzere nazıkçe pipetlendi ve tripsin inhibitörü (GIBCO Invitrogen) eklendi. Hücre süspansiyonu 4 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı, hücre topağı önceden
20 ısıtılmış 03 ortamında yeniden süspanse edildi ve hücreler daha sonra 40 µm'lik bir elekten geçirildi. Daha sonra bu hücreler 30.000 hücre / cm² (1:25-1:30 oranlı) konsantrasyonda yeni r-laminin-521-kaplanmış çanaklara konuldu. Hücreler, günde birkaç kez taze ortamın eklendiği
25 bir geçişten sonraki ilk gün hariç, bir saat boyunca bir inkübatörde önceden ısıtılmış taze ortam ile günde bir kez beslenmiştir. Aynı soyun kontrol hücreleri, Matingel (BD Biosciences) üzerinde, Rodin et al., Doğa Biyoteknolojisi, cilt 28, sayfa 611-615 (2010) içinde tarif edildiği şekilde
30 03 ortam içinde kültürlendi. Kontrol hücreleri parçalar halinde geçirildi.

Hücre kültürü çanağı kaplanması

Doksan altı oyuklu doku hücre kültür çanakları, hepsi 30 mg / ml (5 mg / cm²) konsantrasyondaki ECM proteinleri fare LN-111 (Invitrogen), insan rekombinantı LN-511 ve insan rekombinantı LN-521'in steril solüsyonları ile 4°C'de bir gece boyunca kaplanmıştır. Kontrol hücreleri için, üreticinin talimatlarına göre BD Matrigel™ hESC onaylı (BD Biosciences) kullanıldı.

Hücre yapışma deneyi

Deney, tarif edildiği gibi yapıldı (Ekstrasellüler matris Protokolleri, 2000). Kısaca, 96 gözlü plakalar yukarıda tarif edildiği gibi hücre dışı matris proteinleri ile kaplandı ve sığır serumu albümini içeren 03 ortamı tarafından bloke edildi. ES hücreleri, hücre dışı matris kaplı plakalar üzerinde 600 hücre / mm² lik bir hücre yoğunluğunda kaplandı ve hücre inkübatöründe 1 saat veya 1 gün boyunca yapışmaya bırakıldı. Yapışkan olmayan hücreler yıkanmış ve yapışık hücreler %0.1 kristal viyole ile boyanmış %20 glutaraldehit ile 20 dakika sabitlenmiştir.

MRNA'ların gerçek zamanlı PCR ölçümü

Toplam RNA izole edildi ve cDNA, Rodin et al., Doğa Biyoteknolojisi cilt 28, sayfa 611-615 (2010) içinde tarif edildiği şekilde sentezlendi. Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR Taqman deneyleri, Applied Biosystems 7300 Gerçek Zamanlı PCR Sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar primerleri içeren önceden oluşturulmuş gen ekspresyon analiz karışımı (Applied Biosystems) ve ilgili mRNA için bir prob ile dört kat olarak gerçekleştirildi. Her bir deney için ilave reaksiyonlar, GAPDH için RNA girişini normalleştirmek amacıyla kullanılan önceden gen ekspresyon analizi karışımını içermiştir. Tüm veriler 7300 System SDS yazılımı sürüm 1.4 ile analiz edildi.

FACS analizi

OCT4 ekspresyonu, Ludwig T.E. et al. İnsan Embriyonik Kök Hücrelerinin Tanımlanmış Koşullarda Türetilmesi'nde tarif edildiği şekilde analiz edildi. Doğa Biyoteknolojisi 24, 185-187 (2006). Hücreler FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson) üzerinde çalıştırıldı. Veriler CellQuest yazılımı (Becton Dickinson) ile analiz edildi.

Referans Örnek 1 Sonuçları

Farklı hücre kültürü kaplamalarının, hiçbir katkı maddesi olmaksızın 03 ortamında insan ES hücrelerinin tek hücre 10 sağkalımını nasıl etkilediğini anlamak için, HS181 hücrelerini tamamen ayrıştırdık ve Matrigel, fare laminin-111, insan r-laminin-511, insan r-laminin-521 veya bir r-laminin-511 ve r-laminin-521 karışımı.üzerinde kapladık. Sonuçlar ŞEKİL 4'te görülmektedir. Beklendiği gibi, 15 kaplamadan 24 saat sonra Matrigel veya fare laminin-111'e yapışık hiç hücre kalmamıştır. Aksine, insan r-laminin-521 üzerindeki hücreler, karışım ve daha az ölçüde insan r-laminin-511 üzerinde hayatta kaldı.

Deney, insan ES hücreleri üzerinde, ROCK inhibitörü Y-27632 20 ile tedavi edilen 03 ortamında tekrarlandı. Sonuçlar ŞEKİL 5'te görülmektedir. Kök hücreler, tüm 5 kaplamaya yapışık kaldı.

Bu etkiyi ölçmek için, yukarıda bahsedilen kaplamaların hepsinde, kaplamadan 1 saat ve 1 gün sonra (yani, Y-27632 25 olan ve olmayan beş kaplamadan her biri) hücre yapışma deneyleri gerçekleştirdik. ŞEKİL 6 Y-27632 olmadan LN-521, LN-511 ve Matrigel (MG) için 1 saatlik deney sonuçlarını göstermektedir. İnsan ES hücrelerinin herhangi bir katkı maddesi içermeyen 03 ortamında yapışması, bu zaman noktasında 30 kabaca aynıydı.

ŞEKİL 7 tüm kaplamalar için 1 günlük deney sonuçlarını göstermektedir. Y-27632 inhibitörünü içeren plakalar, kaplama ile birlikte "In &" olarak etiketlenir. Kaplamadan 1 gün

sonra, kök hücreler, katkı maddeleri olmaksızın Matrigel'den 20 kat daha iyi katkı maddesi içermeyen LN-521'e yapışır. Ek olarak, sonuçlar, hücrelerin LN-521'e katkısız bir şekilde yapışmasının, ROCK inhibitörü dahil olmak üzere tüm 5 çanaklarda hücrelerin yapışmasına benzer olduğunu göstermiştir. Başka bir deyişle, ROCK inhibitörünü ihtiva eden kaplamalara benzer sonuçlar elde etmek için LN-532 kaplaması ile ROCK inhibitörü gerekli değildir.

Her 10-12 günde bir 1:25 ila 1:30 oranlarında tek hücre 10 süspansiyonu içinde tam ayrışmadan sonra bunları geçirerek İnsan ES hücrelerini insan r-laminin-521'i üzerinde kültürledik. Hücreler, en az 9 geçiş (3 ay) için sağlam ve yüksek bir oranla güçlü bir şekilde çoğaldı. Ayrıca, 3 geçişi (1 ay) takiben, geleneksel yöntemler kullanılarak kültürlenen 15 20 geçiştten (100 gün) sonra, kök hücre olarak aynı sayıda hücre çiftlemesi geçirdiler. Bu, ayı zamanda zamana göre hücre sayısındaki artışı gösteren ŞEKİL 2'de resmedilmiştir. LN-521'deki hücreler Matrigel'den çok daha hızlı bir oranda arttı. Böylece, yeni r-laminin-521 hES hücre kültürü yöntemi, 20 zaman ve iş gücü açısından avantajlı olmaktadır.

HES hücrelerinin kimliğini, herhangi bir katkı maddesi olmaksızın, 03 ortamında insan r-laminin-521 üzerinde birkaç tek hücre süspansiyonu geçişinden sonra teyit etmek için, pluripotensin bir belirteci olan Oct4 için FACS analizi 25 gerçekleştirdik. ŞEKİL 9 r-LN-521 üzerinde büyütülen hücrelerin sonuçlarını gösterirken; ŞEKİL 10 Matrigel'de yetiştirilen hücrelerin sonuçlarını göstermektedir. Pozitif hücrelerin yüzdeleri parantez içinde belirtilmiştir. R-LN-521, daha yüksek bir pluripotent hücre yüzdesine sahipti.

30 Ek olarak pluripotentlik markerleri Oct4 ve Nanog'un mRNA transkriptlerinin sayısı belirlenmiştir. ŞEKİL 11 bu sonuçları göstermektedir. Her iki marker için, LN-521'deki hücreler daha yüksek sayıda transkript gösterdi.

Her iki yöntem, yeni yöntemlerin Matrigel'i bir hücre kültürü çanak kaplama malzemesi olarak kullanan ve hücrelerin küçük kümeler halinde geçirilmesini sağlayan, mevcut yönteme göre aynı veya daha iyi kalitede hES hücrelerini sağladığını göstermiştir.

Referans ÖRNEK 2

Bu Referans Örneği 2'de, pluripotent hES hücrelerinde de eksprese edilen ifade edilmiş ve saflaştırılmış rekombinant LN-521, kültürlenmiş hES ve iPS hücreleri üzerindeki etkileri açısından incelenmiştir. Sonuçlar, tek başına LN-521'in pluripotent hES ve iPS hücrelerinin kendi kendini yenilemesini güçlü bir şekilde desteklediğini ve önemli bir şekilde, LN-521'deki yüksek seyreltilerde tek hücreli süspansiyonda tripsinlenmiş kök hücrelerin kaplanmasını takiben pluripotent kök hücrelerin hayatta kalmasına imkan verdiğini gösterdi. LN-521'in etkilerinin, hES hücre migrasyonu ve PI3K / Akt yolu aktivasyonunun indüksiyonu vasıtasıyla $\alpha 6\beta 1$ integrin üzerinden sinyalleme için aracılık ettiği gösterilmiştir. Sonuçlar pluripotent hES ve iPS hücrelerinin büyük ölçekli üretimi için ve aynı zamanda pluripotent kök hücrelerin kendi kendini yenilemesi için yeni ortam formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik olarak etkili ve hatta otomatik bir genişleme yöntemi için uygulanabilir. Burada tarif edilen yeni hES / hiPS hücre kültürü usulü, standart hücre kültürü yöntemlerine, ör. Fibroblastları kültürlemek için kullanılanlara benzer ve bu nedenle, özel yetenek gerektirmez. Bir hücre bölünmesi başına önemli ölçüde daha az hücre kaplama malzemesi tüketir ve zaman açısından verimlidir, böylelikle kültürleme hES / hiPS hücreleri için önceki prosedürlere kıyasla önemli ekonomik fayda sağlar.

Daha önce saf formda bulunmayan insan rekombinantı LN-521, tam uzunluklu laminin $\beta 2$ cDNA klonlanarak ve insan laminin

$\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ zincirleri ile HEK293 hücrelerinin üçlü transfeksiyonu gerçekleştirilerek üretildi. İnsan rekombinantı LN-111 ve LN-121, tam uzunluktaki $\alpha 1$ ve $\beta 2$ zincir cDNA'larının klonlanması ve HEK293 hücrelerinin sırasıyla insan $\alpha 1$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ ve $\alpha 1$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ zincir cDNA'ları ile üçlü transfeksiyonunu takiben benzer şekilde oluşturuldu. Saflaştırılmış LN-521, LN-111 ve LN-121 proteinleri, sırasıyla saf $\alpha 5$, $\beta 2$, ve $\gamma 1$ zincirleri, $\alpha 1$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ zincirleri, bunların yanı sıra $\alpha 1$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ zincirlerini proteinle boyama ve Western blot analizi vasıtasıyla gösterildiği gibi içerecek şekilde görüntülendi.

Yöntemler

İnsan ES ve iPS hücre kültürleri.

HS181 ve HS401'in insan ES hücreleri, 03 ortamında LN-521 kaplı kültür tabakları üzerinde (Rodin et al., Doğa Biyoteknolojisi, cilt 28, sayfa 611-615 (2010) içinde tarif edilmiş, pH 7.35 olarak ayarlanmış), mTeSR1 (STEMCELL Teknolojileri) ve kimyasal olarak tanımlanmış ve ksenonsuz TeSR2 (STEMCELL Teknolojileri) 37°C, %5 CO₂'de kültürlenmiştir. Başlangıçta soyların hücreleri, daha sonraki tripsinizasyonla steril bir bıçak kullanılarak dikkatli bir şekilde çizilerek insan besleyici hücre katmanından LN-521 kaplamasına aktarıldı veya hücreler, LN-511 kaplamasından tek bir hücre süspansiyonuna tripsinlendi. Hücreler, günde birkaç kez taze ortamın eklendiği kaplamadan sonraki ilk gün hariç, bir saat boyunca bir inkübatörde önceden ısıtılmış taze ortam ile günde bir kez beslendi. Hücreler rutin olarak 10-12 gün içinde 37°C'de %5 CO₂'de 5 dakika süreyle Tripsin / EDTA'ya (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, İskoçya) maruz bırakılarak geçirildi. Daha sonra tek hücreli süspansiyona ayrılmak üzere hassas şekilde pipetlendiler ve bir Defined Tripsin İnhibitörü (GIBCO Invitrogen) eklendiler. Hücre süspansiyonu, 4 dakika boyunca 25 rcf'de santrifüj edildi,

süpernatant atıldı, hücre topağı önceden ısıtılmış 03 ortamında yeniden süspanse edildi ve hücreler daha sonra 40 µm'lik bir elekten geçirildi. Daha sonra bu hücreler 30.000 hücre / cm² (1:25-1:30 oranlı) konsantrasyonda yeni r-laminin-521 kaplanmış çanaklara konuldu. Aynı soyun kontrol hücreleri daha önce tarif edildiği gibi Matrigel (STEMCELL Technologies) ve LN-511 üzerinde 03 ortamında kültürlendi.⁹

Tanımlanmış ve ksenonsuz kültürler için, TeSR2 (STEMCELL Teknolojileri) ortamı ve herhangi bir hayvandan türetilmiş bileşen içermeyen olarak tanımlanan TrypLE™Select (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland) enzimleri kullanıldı. Hücreler, 10-14 günde bir TrypLE™Select'e 37°C'de %5 CO₂ altında 4-5 dakika süreyle maruz bırakılarak geçirildi. Daha sonra enzim dikkatli bir şekilde aspire edildi ve önceden ısıtılmış TeSR2 ortamı eklendi. Bundan sonra, hücreler tek hücreli süspansiyona ayrılmak üzere hassas bir şekilde pipetlendi, santrifüje edildi, süpernatant atıldı ve hücre pelleti önceden ısıtılmış TeSR2 içinde yeniden süspanse edildi. Hücreler daha sonra 40 µm'lik bir elek içinden geçirildi ve taze LN-521 kaplı bir çanak üzerine konuldu.

Doku hücre kültür plakaları, gece boyunca 30 µg / ml'lik (5 mg / cm²) bir konsantrasyonda, insan rekombinantı LN-521 gibi ECM proteinlerinin steril çözeltileri ile 4°C'de gece boyunca kaplandı. Kontrol plakaları, STEMCELL Technologies'in talimatlarına göre Matrigel ile kaplandı. Kullanımdan önce, tabaklar bir kuluçka makinesinde bir saat boyunca önceden ısıtılmış olan 03 ortamına, çanağa ilave bir yıkama yapılmadan eklendi. Taze bir LN-521 çözeltisi yeni bir çanağa uygulandıktan sonra, kalan LN-521 çözeltisi en az bir kez daha kullanılabilir. Yaşama deneylerinin tüm adezyon, hayatta kalma ve inhibisyonu, taze kaplama malzemeleri kullanılarak gerçekleştirildi.

İnsan iPS hücreleri, ChiPSW soyu, OCT-4 / SOX2 / NANOG / LIN28 yeniden programlama genleri ile lentiviral olarak transdüse edilmiş insan sünnet derisi fibroblastlarından (HFF) türetildi. ChiPSW soyu, farklı geçişlerde tekrar test edilen normal erkek karyotip 46, XY idi. Hücre kültürü ve geçiş deneylerinden önce, hücreler ilk olarak pluripotentlik markerlerinin ekspresyonu için in vitro karakterize edildi. Oct3 / 4 (SC-5279), Nanog (SC-33759), TRA-1-60 (SC-21705) ve SSEA4 (sc-21704) karşı antikolar ile immünofloresan çalışma hücrelerin pluripotentliğin tüm bu merkerlerini ekprese ettiğini gösterdi. RT-PCR analizi, hücrelerin viral transgenlerin ekspresyonundan yoksun olduğunu doğruladı. ChiPSW hücrelerinin pluripotentliği in vitro (embriyoid cisim formasyonu ve immünofloresan çalışması) ve in vivo (SCID bej farelere deri altından enjeksiyon) deneyleri ile doğrulandı. ChiSW soyunun hücreleri, kardiyomiyositlerin atmasına daha fazla ayrılabilirdiler. Aynı zamanda hematopoietik farklılaşma geçirebildiler.

Mevcut besleyici serbest kültürlerle alınmadan önce iPS hücreleri, ışınlanmış insan sünnet derisi fibroblastları üzerinde muhafaza edildi ve genişletildi. Knock-out serumu (KSR, Invitrogen) destekli ortam, 8 ng / ml temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF, R & D Systems) ile katkılanmış, çoğaltma için kullanılmıştır. Hücreler günlük olarak beslendi ve gerektiğinde kollajenaz IV (1 mg / ml, Roche) veya manuel diseksiyon kullanılarak haftalık geçişler yapıldı.

Bu deneylerden önce, CutB1.2 hücrelerinin pluripotens markerleri Oct4 / Naog / Sox2 / TRA-1-60 / TRA-1-81'i ekprese ettiği, viral transgenlerin ekspresyonunu yapamadığı gösterildi ve hücrelerin pluripotentliği hem in vivo hem de in vitro farklılaşma çalışmaları ile doğrulandı.

Laminin-521 ve diğer kaplama malzemeleri

BioLamina, AB, Stockholm'den (www.biolamina.com) temin edilebilen insan rekombinantı LN-521, esas olarak tam uzunluklu laminin γ 1, β 2 ve α 5 yapılanmaları ile transfekte edilmiş insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293; ATCC CRL-1573) daha önce tarif edildiği şekilde sırayla üretildi. Protein üretimi için, HEK293 hücreleri, altı güne kadar GlutaMax I ile takviye edilen Dulbecco'nun tadil edilmiş Eagle's ortamında (DMEM) kültürlendi. LN-521 molekülleri, anti-FLAG matrisi (Sigma) kullanılarak afinite ile saflaştırıldı ve daha sonra indirgeyici ve indirgeyici olmayan koşullar altında %3-8 ve %4-15 gradyan SDS-PAGE kullanılarak karakterize edildi. Proteinler, Sypro Ruby (Bio-Rad) protein boyaması ve poliviniliden diflorür zarları üzerindeki zincirlerin immün boyanması kullanılarak görselleştirildi. Proteini daha fazla karakterize etmek için, laminin α 5, β 2 ve γ 1 zincirlerine karşı antikorlarla Western blot analizi gerçekleştirildi. İnsan rekombinantı laminin-111 ve laminin-121, LN-521'ne benzer şekilde üretildi ve Western ve SDS-PAGE ile tahmin edilen moleküler boyutlarının doğru zincirlerini içerdiği gösterildi. Aksi belirtilmediği takdirde, ilgili fare laminin-111 (Invitrogen) LN-111 olarak belirtildi.

Reaktifler ve antikorlar

InSolution™ LY 294002 (spesifik bir Akt inhibitörü), InSolution™ Wortmannin (spesifik bir PI3K inhibitörü) ve InSolution™ 98059 (spesifik bir MEK1/Erk inhibitörü) Calbiochem'den satın alındı. Fosfo-Akt (# 4060), toplam-Akt (# 9272), fosfo-Erk (# 9101) ve toplam-Erk (# 9102) antikorları, Cell Signaling Technology'den tedarik edildi. PathScan Phospho-Akt1 sandviç ELISA kiti (# 7160), PathScan toplam Akt1 sandviç ELISA kiti (# 7170), PathScan Phospho-Akt2 sandviç ELISA kiti (# 7048) ve PathScan toplam Akt2 sandviç ELISA kiti (# 7046) Cell Signaling Technology'den

satın alındı. Calnexin'e karşı antikorlar (# ab10286) Abcam'dan tedarik edildi. Çeşitli integrin alt birimlerine karşı işlev blokaaj antikorları, fare izotip antikorları ve α -dystroglikana Millipore'dan satın alındı. α V (MAB1980) ve α 6 (MAB1378)'e karşı işlev bloke eden antikorlar sodyum azid ile birlikte bir çözelti içinde sunulduğundan, hayatta kalma deneyinin inhibisyonundan önce alfa integrin alt birimlerine ait tüm antikorlar, her seferinde 2 saat boyunca 03 ortama karşı üç kez diyaliz edildi. Lutheran reseptörü ve α -fetoprotein antikorları ve sıçan izotip kontrol antikorları, R&D Systems'dan tedarik edildi. Oct4, Nanog, SSEA-4, düzgün kas aktin ve MAP-2 antikorları Millipore'dan satın alındı.

İmmunofloresans

İmmunofloresans çalışmaları için, ES hücreleri kültürlenmiş ve 8 oyuklu slayt bölmelerinde (BD Biosciences) veya 96 oyuklu plaka oyuklarında %4 paraformaldehit ile sabitlenmiş, %0.1 Triton-X ile permeabilize edilmiş ve bir saat boyunca %0.1 Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>) içeren fosfat-salin tamponu (PBS) içinde %10 sığır fetal serumu (GIBCO Invitrogen Corporation) tarafından bloke edilmiştir. Primer antikör ile inkübasyon, oda sıcaklığında 1.5 saat boyunca gerçekleştirildi. Sekonder antikör ve 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes) ile inkübasyon 40 dakika boyunca gerçekleştirildi. Inkübasyonlar arasında örnekler, PBS tamponu içinde %0.1 Tween-20 ile üç ila beş kez yıkandı. Örnekler floresans gömülü bir ortamda (Dako, Glostrup, Danimarka, <http://www.da-ko.com>) korunmuş ve bir floresans mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Leica, Heerbrugg, İsviçre, <http://www.leica.com>).

mRNA'ların gerçek zamanlı PCR miktar ölçümü

Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene, La Jolla CA, www.stratagene.com)

kullanılarak izole edildi. cDNA, üreticinin talimatlarına göre oligo (dT) 12-18 primerleri ve Superscript II revers transkriptazı (GIBCO Invitrogen Corporation) içeren 20 µl reaksiyon karışımı içinde 0.2 µg toplam RNA kullanılarak sentezlendi. Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR Taqman deneyleri, Applied Biosystems 7300 Gerçek Zamanlı PCR Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (Applied Biosystems, Foster City, CA). Tüm reaksiyonlar, ilgilenilen mRNA için primerler ve bir prob içeren önceden oluşturulmuş bir gen ekspresyon analiz karışımı (Applied Biosystems) kullanılarak dörder kere yapıldı. Her bir deney için ilave reaksiyonlar, GAPDH için RNA girişini normalleştirmek amacıyla önceden gen ekspresyon analizi karışımını içermiştir. Tüm veriler 7300 System SDS yazılımı sürüm 1.4 ile analiz edildi.

15 FACS analizi.

Hücreler, tripsin / EDTA ile kültür kabından çıkarıldı, tek hücre süspansiyonuna ayrıldı ve buz gibi soğuk FACS tamponu (%2 fetal sığır serumu, Hank tamponunda %0.1 sodyum azit) içinde yeniden süspanse edildi. SSEA-4'rimer e karşı pantikorlar ile inkübasyon (Millipore, Billerica, MA, <http://www.millipore.com>) buz üzerinde bir saat süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler üç kez buz gibi soğuk FACS tamponu ile yıkandı. Ardından hücreler karanlıkta 30 dakika süreyle 1: 400 Alexa Fluor anti-fare sekonder antikorları (GIBCO Invitrogen Corporation) ile FACS tamponu içinde problandı ve dört kez yıkandı. Kontrol hücreleri, fare immunoglobulinleri ve daha sonra, yukarıda tarif edildiği gibi sekonder antikor ile inkübe edildi. Hücreler FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) üzerinde analiz edildi. Veriler, CellQuest yazılımı (Becton Dickinson) ile analiz edildi.

Karyotipleme

Hücre soylarının karyotiplenmesi, standart Q-bantlama teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi Hücre örnekleri 4 saate kadar kolimid KaryoMAX (0.1 µg / ml; Gibco Invitrogen Corporation) ile muamele edildi, ardından Trypsin / EDTA çözeltisi (Gibco Invitrogen Corporation) ile ayrıştırıldı. Hücreler santrifüj yoluyla topak haline getirildi, önceden ısıtılmış 0.0375 M KCl hipotonik solüsyonda yeniden süspansiyon edildi ve 10 dakika süreyle inkübe edildi. Santrifüjlemeyi takiben hücreler fiksatif (3:1 metanol: asetik asit) içinde yeniden süspansiyon edildi. Metafaz yayıllımları cam mikroskop lamları ve G bantlı olarak tripsine kısa süreli maruz bırakılarak hazırlandı ve 4:1 Gurr's / Leishmann's boyası (Sigma-Aldrich Co.) ile boyandı. En az 10 metafaz yayılımı analiz edildi ve ilave 20 adet sayıldı.

15 Teratoma formasyonu

Teratoma formasyon deneyleri, şiddetli kombine immün yetmezliği olan (SCID) genç (7 haftalık) farelerin testis kapsülünün altındaki yaklaşık 10^6 hücrenin implantasyonu ile gerçekleştirildi. Her hücre soyu için üç hayvan kullanıldı.

20 Teratoma büyümesi haftalık palpasyonla gözlemlendi ve fareler implantasyondan sekiz hafta sonra kurban edildi. Teratomlar sabitlendi ve bölümler hematoksinin ve eozin (HE) veya hematoksinin, eozin ve PAS (HE-PAS) ile boyandı. Her üç embriyonik germ soyu katmanının doku bileşenlerinin varlığı, 25 lekeli bölümlerden analiz edildiği gibi gösterildi. Tüm hayvan deneyleri etik komite onayı uyarınca Karolinska Üniversitesi Hastanesi enfeksiyonsuz hayvan tesislerinde yapıldı.

Embriyoit gövde oluşumu

30 LN-521 kaplı hücre kültürü çanaklarından elde edilen ES hücreleri, 37°C'de, %5 CO₂'de bir dakika süreyle TrypLE™Select'e maruz bırakıldı, iki kez bir ortamla yıkandı, büyük parçalar halinde kırıldı ve düşük yapışkanlık

plakalarında süspansiyon halinde kültürlendi. Bunun için kullanılan ortam 2 mM L-glutamin, %20 cenin buzağı serumu (GIBCO Invitrogen Corporation), 0.1 mM β -merkaptoetanol (GIBCO Invitrogen Corporation) ve %1 esansiyel olmayan amino asitler ile takviye edilmiş Knockout DMEM (GIBCO Invitrogen Corporation) oldu. Süspansiyonda 1-2 hafta sonra embriyoit gövdeleri, jelatin kaplı doku hücre kültürü 96-oyuklu plakalara (Sarstedt) aktarıldı, 1-2 hafta kültürlendi, daha sonra sabitlendi, her üç embriyonik germ soyu katmanının markerlerine karşı antikorlarla boyandı (düz kas aktin, MAP-2 ve α -fetoprotein) ve immünofloresan için yukarıda tarif edildiği gibi analiz edildi.

Hücre yapışma deneyi

Kısaca, 96 gözlü plakalar yukarıda tarif edildiği gibi hücre dışı matris proteinleri ile kaplandı ve sığır serumu albümini içeren 03 ortamı tarafından bloke edildi. ES hücreleri, hücre dışı matris kaplı plakalar üzerine 50,000 hücre/cm²'lik hücre yoğunluğunda kaplandı ve bir hücre inkübatöründe 1 saat boyunca yapışmaya bırakıldı. Bundan sonra plakalar yapışkan olmayan hücreleri çıkarmak için ortam ile 3 kez yıkandı ve daha sonra yapışan hücreler %0.1 Kristal Violet ile boyanan %5 glutaraldehid ile 20 dakika süreyle sabitlendi. (Kebo Lab, Spanga, İsveç, <http://www.kebolab.se>). Bir saat ve 3 kere su ile yıkandıktan sonra kristal viyole %10 asetik asit ile ekstrakt edildi ve 570 nm'de optik yoğunluğun ölçülmesiyle miktarı belirlendi. Tüm deneyler dört kez yapıldı.

Hücre sağkalımı ve sağkalım deneylerinin inhibisyonu

Sağkalım deneyi, hücrelerin hücre inkübatöründe 24 saat bekletilmesi haricinde, yukarıdaki hücre yapışma deneyi için tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Sağkalım deneyinin inhibisyonu için hücreler 30 dakika süreyle üreticiler tarafından tavsiye edilen konsantrasyonlarda işlev bloklayıcı antikorları olan bir ortamda veya metinde belirtilen

konsantrasyonlarda yol inhibitörlerinin içinde tutulur ve daha sonra kaplanmış çanaklar üzerinde kaplanır. Tüm deneyler dört kez yapıldı.

Western blotlama ve ELISA

- 5 HS 181 hücreleri, yukarıda tarif edildiği gibi tek hücre süspansiyonuna tripsinize edildi. İnhibisyon deneyleri için, hücreler, 30 dakika süreyle bloke edici antikorlar veya yol inhibitörleri ile birlikte 03 ortamında tutuldu ve daha sonra 450K hücreler, uygun matris kaplamasıyla önceden kaplanmış 35
- 10 mm çanaklar üzerine kaplandı. Diğer deneyler için, aynı sayıda hücre, tripsinizasyondan sonra doğrudan kaplandı Her durumda hücreler 1 saat boyunca 37°C' de %5 CO₂'de yayılmaya bırakıldı. Buzla soğutulmuş PBS içinde iki kere yıkamanın ardından, hücreli plakalar sıvı azot içinde donduruldu ve -
- 15 80°C'de saklandı. Western blotları ve ELISA örnekleri hazırlamak için plakaların buzları yavaşça çözüldü ve 100-150 µl liziz tamponu (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, %0.5 deoksikolat, %0.5 SDS, %1 Triton X-100, %1 Igepal, Complete™ (Roche) ve Phospho-Stop™ (Roche)) ile buz üzerinde tutuldu.
- 20 Daha sonra hücreler kazındı, pipetlendi ve bir 27G 3/4" iğne vasıtasıyla kesildi. Bundan sonra, hücre topakları 4°C'de 15 dakika boyunca 16,100 rcf'de santrifüjleme ile berraklaştırıldı. Western blotları için SDS elektroforezi için %4-12 gradyan jeli kullanıldı ve proteinler PVDF
- 25 membranlarına aktarıldı. Membran, imalatçının talimatlarına göre ilgili antikor ile melezlenmiştir. Görselleştirme için Amersham Biosciences'ın kemoluminesan HRP substratı kullanılmıştır. Densitometri analizi için filmler 2,400 dpi'de tarandı ve Chemilmager5500 programı (1D-Multi Line
- 30 densitometri modu) ile analiz edildi. ELISA için örnekler, üreticinin talimatlarına göre oyuklara uygulandı.

In vivo görüntüleme ve migrasyon deneyi

24 oyuklu plakalar hücre dışı matris proteinleri ile kaplandı ve sıgır serum albümini içeren 03 ortamı tarafından bloke edildi. ES hücreleri, hücre dışı matris kaplı plakalar üzerine 30,000-40,000 hücre / cm² hücre yoğunluğunda kaplandı ve bir hücre inkübatöründe yarım saat boyunca kalacak şekilde bırakıldı. Bundan sonra, levha, 37°C, %5 CO₂ tutmaya izin veren, çevre kontrol birimi ile donatılmış yüksek içerikli görüntüleme sistemi Operetta (PerkinElmer) içine aktarıldı. Yapılan iki film için, parlak alan görüntüleri Harmony yazılımı (PerkinElmer) kullanılarak kaplandıktan sonra 24 saat içinde 15 dakikada bir alındı, dışa aktarıldı ve ImageJ yazılımı (NIH, ABD) kullanılarak analiz edildi. Migrasyon deneyi için görüntüler, kaplamadan sonra 18 saat boyunca her yedi dakikada bir alındı. Kaplama sonrası beşinci ve yedinci saat arasında elde edilen görüntüler MTrackJ eklentisi (University Medical Centre, Rotterdam, Hollanda) kullanılarak analiz edildi. Her bir kaplama üzerindeki 100 bağlı hücre izlendi ve akımın pistin bir önceki noktasına olan uzaklıkları hesaplandı. Hata çubukları, ortalama standart ölçüm hatalarını göstermektedir (n=100).

İstatistik. İstatistiksel anlamlılık, Student'in eşit olmayan varyanslar için iki kuyruklu t-testi ile belirlenmiştir.

Referans Örneği 2 Sonuçlarının Tartışılması

Pluripotent hES hücreleri $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$ laminin zincirlerini eksprese eder. Tek hücre süspansiyonundan farklı kaplama substratlarına kadar kaplanmış hES hücrelerinin yapışmasını ve klonal sağkalımını karşılaştırmak için, LN-511 üzerinde tek katmanlar veya bir besleyici katmanı olarak büyüyen hES hücreleri, 03 ortamında tek hücre süspansiyonuna tripsinize edilmiş ve bir ROCK inhibitörünün (Y-27632) yokluğunda veya varlığında Matrigel, LN-111, LN-511, LN-521 veya LN-511 ve LN-521 karışımı ile kaplı hücre kültür çanakları üzerine kaplandı ve 24 saat sonra analiz edildi.

Hücreler Matrigel veya LN-111 üzerinde sağ kalamadılar, ancak insan rekombinantı LN-511 ve LN-521 ve ayrıca bunların ikisinin karışımı üzerindeki tek hücreler olarak sağ kaldılar. Bununla birlikte, LN-521 üzerindeki hücrelerin hayatta kalması, LN-511'den önemli ölçüde daha yüksekti (aşağıdaki sayılar ile karşılaştırıldı). İnsan rekombinantı LN-111 veya LN-121 üzerine kaplanan hücreler 24 saat sonra sağ kalamadılar (veriler gösterilmemiştir), bu da laminin trimerindeki $\beta 2$ zincirin mevcudiyetinin etkiyi desteklemek için yeterli olmadığını göstermektedir. ROCK inhibitörü Y-27632'nin varlığında, hES hücreleri tüm yüzeylerde sağ kaldı. Bununla birlikte, kaplamadan 24 saat sonra ROCK inhibitörünün yokluğunda veya varlığında LN-521 üzerinde büyüyen hücreler arasındaki hücre şekilleri açısından açık farklar vardı. Kaplamadan 24 saat sonra ROCK inhibitörünün yokluğunda, LN-521 üzerinde büyüyen hücreler yuvarlak iken, ROCK inhibitörünün varlığında büyüyen hücreler, muhtemelen aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinin neden olduğu iç ya da hilal şeklini aldı. LN-521'in insan pluripotent hücrelerinin uzun süreli kendini yenilemesi kapsamında bir hücre kaplama malzemesi olarak kullanılıp kullanılamayacağını test etmek için, HS181, HS401, H1 hücreleri ve insan iPS ChiPSW ve CutB1.2 hücreleri, 03, mTeSR1'de proteini veya TeSR2 ortamı üzerinde kültürlendi. 03 veya TeSR1 ortamında büyüyen hücreler, her 10-14 günde 1:20-1:30 oranlarında tek hücreli süspansiyona geçirildi. Pluripotent hES hücreleri, küçük kümelere geçtiğinde LN-511 veya Matrigel üzerinde büyütülen hücrelerinkine benzer veya daha yüksek bir stabil hızda çoğaldı. Böylece, LN-521 üzerindeki bir geçiş, kümelerin içinde iki kez geçirilen kontrol hücrelerinkinden daha yüksek sayıda hücre bölünmesi verdi. HS181, HS401 ve H1 hücreleri, bir 03 ortamında sırasıyla en az 24, 5 ve 15 geçiş (sırasıyla 9, 2 ve 6 ay)

için çoğaldı. CutB1.2 iPS ve ChiPSW hücreleri, sırasıyla mTeSR1'de 5 ve 3 geçişler için kültürlendi. İlginç bir şekilde, ayrılan hES hücreleri tamamen tanımlanmış ve ksenonsuz koşullar altında, TeSR2 ortamı ve TrypLE Select enzimi kullanılarak LN-521 üzerinde kültürlenebildi. Bir geçişten sonraki kaplama etkinliği, 03 veya mTeSR1 ortamındaki hücrelerden biraz daha düşüktü ve ayrılmış hücreler, her 10-14 günde bir 1:15-1:20 oranlarında normal olarak geçirildi. H1 ve HS401 hücreleri, TeSR2'de sırasıyla 12 ve 4 geçiş için kültürlenmiştir (5 ve 1.5 ay).

hES hücreleri genellikle ek hücre süspansiyonu içinde 1 cm²'lik kültür çanağı başına 30,000 hücre olarak LN-521 ile kaplandı, ardından hücreler münferiden birbirleriyle doğrudan temas kuramadı. Kaplamadan sekiz saat sonra hES hücreleri, pluripotentlik markörler Oct4, Nanog ve Sox2'yi eksprese eden tek hücreler olarak gözlemlenebildi. Kaplama işleminden yirmi dört saat sonra hücreler, sonunda çukurların çoğunu kaplayan büyük mono katman adaları şeklinde birleşmiş küçük tek katmanlı koloniler oluşturdular.

LN-521 üzerinde büyütülen hücreler, Matrigel üzerine kaplanan ve küçük kümeler halinde geçirilen hücrelerdekine benzer olan pluripotentlik markerleri Oct4, Nanog ve SSEA4'ün kararlı ekspresyon seviyelerini gösterdi. LN-521 ve Matrigel kültürlerindeki spontan farklılaşma düzeyini karşılaştırmak için, Matrigel kültürlerinde ve LN-521 kültürlerinde eksprese edilen farklılaşma işaretleyicileri PAX6, SOX17 ve SOX7 için mRNA'ların miktarı bir (10 gün) ve 10 geçişten sonra (4 ay) sonra karşılaştırılmıştır. Kantitatif RT-PCR, LN-521 kültürlerindeki üç farklı markerin tümünün geçiş numarasından bağımsız olarak benzer veya daha az ekspresyon gösterdiklerini ortaya çıkardı.

Karyotiplerin hES hücre soyları HS181 ve H1 için, 03 ortamında sırasıyla LN-521 üzerinde 12 ve 10 geçişten ve

TeSR2 ortamında 7 geçişten sonra H1 için normal olduğu teyit edildi. Teratomaların histolojik olarak incelenmesi SCID farelerinde 13 ve 12 geçişler için kültürlenmiş HS181 ve H1 hücrelerinin sırasıyla 03 ortamında LN-521 ve TeSR2’de LN-521 üzerinde 7 geçiş için kültürlenmiş H1 hücrelerinin enjeksiyonundan sonra, insan embriyosunun üç germ soyunu içeren dokuların gelişimini ortaya çıkardı. in vitro farklılaşma da, üç olgunun her birindeki hücrelerin, mezoderm (düz kas aktin), ektoderm (MAP-2) ve endoderm (α -fetoprotein) markerlerini eksprese eden embriyotik cisimcikleri oluşturma yetkinliğini koruduğunu ortaya çıkardı.

Matrigel, LN-111, LN-511, LN-521 ile LN-511 ve LN-521’in eşit karışımındaki ayrılmış hES hücrelerinin kaplama substratı, bir saat sonra tutunma ve 24 saat sonra tutunma etkinliğinin ölçülmesi için çalışma yapıldı. İlginç bir şekilde, hücrelerin yayılmasının LN-521 ve LN-511 üzerinde Matrigel ya da LN-111 (gösterilmedi) üzerindeki daha iyi olmasına rağmen, bir saat sonra aynı %75-80 hücre tüm kaplamalara yapışmıştı. 24 saat sonra Matrigel veya LN-111 üzerinde neredeyse hiç hücre sağ kalmadı ve LN-511’de çok az hücre sağ kaldı. Bunun aksine, LN-521 üzerindeki hES hücrelerinin sağ kalma oranı,

Matrigel’den yaklaşık 20 kat ve LN-511’den üç kat daha yüksek idi.

LN-521 ve ROCK inhibitörünün (Y-27632) etkilerini niceliksel olarak karşılaştırmak için, aynı tek hücre süspansiyonundan hücreleri aynı kaplama yoğunluğunda (1 cm² başına 40,000 hücre) 10 μ M Y-27632 içeren bir ortam içinde kapladık ve farklı kaplamalarda sağ kalmalarını inceledik. LN-521 üzerindeki işlenmemiş hücreler ve Y-27632 ile işlenmiş Matrigel üzerindeki hücreler, kaplamadan 24 saat sonra benzer sağ kalma oranı gösterdi. İlginç bir şekilde, Y-27632

ile işlenmiş insan ES hücreleri bile LN-521 üzerinde Matrigel'dekinden daha iyi bir sağkalım gösterdiler.

Egzojen bFGF'nin 03 ortamından çıkarılması durumunda, hücreler LN-521 üzerinde hala Matrigel'den 20 kat daha fazla
5 sağkalım gösterdiler. Dahası, HES hücrelerinin TeSR1 formülasyonunun (bFGF, LiCl, γ -aminobutirik asit (GABA), piperkolik asit ve TGF β)¹⁶ tüm büyüme faktörlerini barındırmayan bir ortamda bile, kaplamadan 24 saat sonra LN-521 üzerinde sağ kalması, sağkalım mekanizmasının bu
10 faktörlerin neden olduğu sinyallemeden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Plazma membranı üzerinde LN-521 için potansiyel reseptörlere işlev bloke edici antikorlar kullanılarak hücre sağkalımının inhibisyonu için bir deney, integrinler $\alpha 6$ 'ya karşı
15 antikorlar ve biraz daha az $\beta 1$ 'e kadar, LN-521 üzerindeki insan ES hücrelerinin hayatta kalmasını inhibe ettiğini gösterdi. Diğer test edilmiş integrin alt birimlerinin yanı sıra Lutheran reseptörü ve α -dystroglikan ile işlev bloke edici antikorlar LN-521 üzerinde insan ES hücresi
20 sağkalımına, eğer varsa, çok az bir etki göstermiştir.

Son zamanlarda, ROCK inhibitörleri ve blebbistatinin, miyozin hafif zincirinin (MLC) fosforilasyonunun aracılık ettiği aktin-miyozin kontraktilesinin ortadan kaldırılması yoluyla etki ettiği gösterildi. LN-521'in benzer aktiviteye sahip
25 olup olmadığını test etmek için, Matrigel, LN-111, LN-511 ve LN-521 üzerindeki ayrılmış hücreler arasında, kaplamadan bir ve altı saat sonra, fosforile MLC seviyeleri karşılaştırıldı (ŞEKİL 12 ve (ŞEKİL 13). İlginç olarak Western blot, LN-511 ve LN-521 üzerindeki hücrelerde MLC'nin fosforilasyonunun
30 Matrigel ve LN-111 üzerindeki hücrelerden daha yüksek olduğunu gösterdi. Aktin-miyozin yeniden düzenlemeleri sadece kasılmalar için değil, aynı zamanda hücre motilitesi için de gerekli olduğundan, hücre migrasyonunun LN-521 ve onun

integrin reseptörü $\alpha 6 \beta 1$ arasındaki etkileşimin neden olabileceği sonucuna vardık. Matrigel ve LN-521 üzerindeki hücrelerin in vivo olarak görüntülenmesi, hücrelerin ikincisine çok daha hızlı migrasyon yaptığını ve küçük hızlı hareket eden kolonilere agregasyonla sağ kaldığını ortaya çıkardı. Dört kaplama üzerindeki hES migrasyonu, hücreler hala tüm durumlarda bağlı iken, kaplama işleminden sonra beşinci ve yedinci saat arasında da karşılaştırıldı (ŞEKİL 14). LN-521 üzerindeki hES hücrelerinin motilitesi, diğer kaplamalardaki hücrelerden daha yüksekti ve o kaplamalardaki hayatta kalma yeteneği ile ilişkiliydi. Integrin 1'e karşı antikoru bloke eden işlev ile muamele, LN-521 üzerindeki hücrelerin motilitesini (ŞEKİL 15) ve yapışmayı (veriler gösterilmedi) önemli ölçüde azaltmıştır.

15 Kapsamlı bir veri kümesi, integrinler tarafından MEK1 / Erk veya PI3-kinaz / Akt yollarının aktivasyonunun anoikisleri bloke edebileceğini göstermiştir. LY 294002 ve PD 98059, sırasıyla Akt ve MEK1'in spesifik inhibitörlerinin etkileri, bu yolların LN-521 üzerinde bulunan hES hücresi sağkalımı üzerindeki potansiyel rolünü araştırmak üzere incelendi. LY 294002 tarafından Akt aktivasyonunun bloke edilmesinin, LN-521 üzerinde kaplamadan 24 saat sonra sağ kalan hücreler olmadan dekolmanı ve hES hücre ölümünü kolaylaştırdığı bulunmuştur (ŞEKİL 16). Bunun aksine, PD 98059 ile yapılan tedavi, ciddi ölçüde sağkalımı etkilemedi. Başka bir PI3K / Akt spesifik inhibitörü olan Wortmannin ile işlem gören hES hücreleri, LN-521 üzerinde kaplamadan 24 saat sonra hayatta kalmayı başaramadı, LN-521'de hücre sağkalımı için PI3K / Akt aktivasyonunun gerekli olduğunu teyit etti.

30 BFGF'nin etkisinin PD 98059 tarafından tam olarak inhibe edilemediği MEK1/Erk yolunun güçlü bir aktivatörü olduğu bilindiğinden, aynı deneyi aynı sonuçla birlikte ekzojen bFGF olmaksızın 03 ortamında gerçekleştirdik (ŞEKİL 17). LY

294002 ve PD 98059'ya uygulanan işleminin etkinliği, LN-521 üzerinde kaplamadan bir saat sonra işlenen ve toplanan kontrol hücrelerinin Western blot analizi ile doğrulanmıştır (ŞEKİL 18 ve (ŞEKİL 19).

5 Matrigel ve LN-521 üzerinde büyüyen hücrelerin ekstraktlarının fosfo-Akt antikorları ile yapılan Western blot analizi, her iki durumda da PI3K / Akt yolunun aktif olduğunu gösterdi (veriler gösterilmedi). Farklı kaplama üzerindeki hücrelerde Akt aktivasyon seviyelerini belirlemek için, hücreler henüz birbirleri ile direkt temas halinde değilken Matrigel, LN-111, LN-511 ve LN-521 üzerinde bir saat sonra toplanan hücre lizatları üzerinde gerçekleştirildi (ŞEKİL 20 ve (ŞEKİL 21). Farklı kaplamalarda bulunan hücrelerdeki Akt2 fosforilasyon seviyesi, kaplamalarda sağ kalma ile ilişkilidir.

$\alpha 6$ ve $\beta 1$ integrinlerin, sırasıyla alfa ve beta alt birimleri arasında insan ES hücrelerinde en bol miktarda eksprese edilen integrin izoformları olduğu gösterildi. $\alpha 6\beta 1$ integrin , farklı lamininlere karşı geniş bir spesifite spektrumu gösterir, fakat LN-521 veya LN-511 için bağlanma afinitesi LN-111 için olandan daha yüksektir. Son zamanlarda, $\beta 2$ lamininin integrinler için $\beta 1$ lamininlerden daha yüksek afiniteye sahip olduğu belirlendi. Bu nedenle, integrin için en yüksek afiniteye sahip olan LN-521, migrasyon için en iyi ankrajı sağlayabilir ve $\alpha 6\beta 1$ integrin üzerinden en yüksek sinyal dozunu iletebilir, ayrıca LN-511 bunu daha az ölçüde yapabilmesine rağmen ayrıştırılmış pluripotent hES hücrelerinin en iyi sağkalımı ile sonuçlanır.

Bu çalışmanın sonuçları genel olarak pluripotent insan kök hücrelerinin kültürlenmesini ve genişlemesini kolaylaştırabilir ve hatta klinik uygulamalara yönelik hücre dahil olmak üzere bu hücrelerin otomatik olarak genişlemesini mümkün kılabilir. LN-521 üzerindeki ayrılmış hES hücrelerinin

sağ kalması, migrasyona bağlı gibi görünmekte olup bu nedenle hücreler, ultra düşük yoğunluklarda kaplandıktan sonra hayatta kalamazlar. Burada tarif edilen yeni hES hücre kültürü yöntemi, sadece ROCK inhibitörü

- 5 veya blebbistatin muamelesi gibi sitoskeletona zarar vermeyen, doğal olarak oluşan bir LN-521 yapışma proteinini kullanır. Dolayısıyla, LN-521, muhtemelen hücre yüzeyinde sadece doğru integrin profili ile hücrelerin hayatta kalmasını desteklemektedir. Mevcut sonuçlar ayrıca LN-521
- 10 üzerine kaplanan ve 1 cm² başına 20,000-30,000 hücre gibi nispeten düşük yoğunluklarda bulunan hES hücrelerinin en azından diğer hES kültür sistemlerinde olduğu gibi etkin bir şekilde sağ kalabildiğini ve çoğalabildiğini gösterdi. Yeni yöntem, standart hücre kültürü prosedürlerini, ör.
- 15 fibroblastların kültürlenmesi ve bu nedenle, LES-521 üzerindeki hES hücre kültürleri, hES hücrelerinin kültürlenmesi teknolojik bir zorluk olduğu için daha önce önemli bir sorun olan, özel olarak eğitilmiş personel gerektirmez.
- 20 İnsan pluripotent kök hücre kendini yenileme için yaygın olarak kullanılan TeSR1 formülasyonu, Matrigel ile birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir ve çoğunlukla, MEK1 / Erk yolunu hedefleyen yüksek dozlarda bFGF içerir ki bunun da pluripotent hES hücreleri için faydalı bir etkisinin olduğu
- 25 pek düşünülmez.. Mevcut sonuçlar, kaplama malzemesi olarak LN-521'in yararlarını kullanan yeni ortam formülasyonlarının ve insan ES hücresinin kendi kendini yenilemesi için önemli olan spesifik olarak hedefleme yollarının geliştirilmesine yol açabilir.
- 30 Özetle, bu çalışma, pluripotent hES tarafından normal olarak salgılanan LN-521'in, tek bir kaplama malzemesi olarak LN-511'e benzer şekilde kültür içinde insan pluripotent kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesini destekleyebildiğini

gösterdi. Her iki laminin de, hücrelerin in vitro olarak homojen tek tabaka halinde büyümesini kolaylaştırdı. Bununla birlikte, iki laminin arasındaki önemli bir fark hES / hiPS hücrelerinin tek hücre süspansiyonu içinde tripsinize edilebilmeleri ve kümelerinin manuel olarak ayrılmasının aksine, mevcut durumda Matrigel veya besleyici hücrelerde yetiştirilen hES/IPS hücrelerinin genişlemeleri için gerekli olduğu üzere, LN-521 üzerindeki tek hücrelerden etkili bir şekilde genişletilmiş ve kaplanabilir olmasıdır. Bu çalışmanın sonuçları pluripotent insan kök hücrelerinin kültürlenmesini ve bu tür hücrelerin otomatik genişlemesini kolaylaştırabilir.

Referans ÖRNEK 3

İnsan embriyonik kök hücreleri, iki farklı hücre kültürü ortamında bir laminin-521 substratı üzerinde kültürlendi. İki hücre kültürü ortamında 3.9 ng / ml ve 100 ng / ml olmak üzere farklı miktarlarda bFGF vardı.

ŞEKİL 22 tam siyahta 5 geçişten (40 gün) sonra laminin-521 substratı olan 3.9 ng / mL bFGF'yi içeren bir 03 ortamında kültürlenen HS181 hES hücrelerinin büyüme eğrisini gösterir. 03 ortamı, hayvandan elde edilen tek bileşen olarak, bovin serum albümini içeren, ticari olarak temin edilebilen mTeSR1 ortamının bir çeşididir. Bir laminin-521 substratı ile 100 ng / mL bFGF içeren bir 03 ortamında kültürlenen HS181 hES hücrelerinin büyüme eğrisi kesikli çizgi olarak gösterilmektedir. Hücreler, geçiş için tek hücre süspansiyonuna ayrıldı. Burada görüldüğü gibi, daha düşük bFGF miktarı için büyüme eğrisi, daha yüksek miktarda bFGF kadar iyi veya ondan daha da iyi olmuştur.

ŞEKİL 23 gerçek zamanlı kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi kullanılarak elde edilen her iki ortam için 5 geçişten (40 gün) sonra pluripotentlik markerler Oct4 ve Nanog için mRNA

transkriptlerinin bağıl miktarını göstermektedir. Yine, her iki hücre kültür ortamında da benzer miktarlar elde edildi ki bu da, bFGF'nin düşük miktarındaki kök hücrelerin pluripotentliği koruduğunu gösterdi. Böylelikle, daha düşük bir miktarda bFGF kullanılabilir ve halen özellikle laminin-521 substratı ile kombinasyon halinde iyi sonuçlar elde edilebilir.

Referans ÖRNEK 4

Örnek 1 ve 2'ide, ayrılan kök hücreler, çoğunlukla, LN-521 üzerindeki aktif hareketlilik ve küçük etkili bir şekilde büyüyen ve göç eden tek tabakalı adacıklar arasındaki ilişki sayesinde hayatta kalmıştır. Çok düşük klonlama yoğunluklarında kaplanan hücreler, özel bir programlanmış hücre ölümü formu olan anoikis vasıtasıyla öldü. Normal olarak, hücre dışı matris moleküllerinden integrin ile ilgili sinyaller, ör. lamininler ve cadherin ilişkili hücre-hücre sinyalleri, anoikisi engelleyebilir. İnsan ES hücre yüzeyindeki en bol kaderin izoformu epitel-kaderin (E-Kaderin)'dir. Örnek 3'teki deneyler, LN-521 ve E-Kaderin'in bir kombinasyonunun insan ES hücrelerini anoikisden koruyup korumayacağını ve hücrelerin klonal sağ kalmasına izin verip vermediğini bulmak için gerçekleştirildi.

HES hücreleri, cm² başına 250 hücre yoğunluğunda farklı kaplamalar üzerinde mTeSR1 ortamında kaplandı ve bir alkalın fosfataz boyama kiti kullanılarak 5 gün sonra kültürde izlendi. Ne laminin-521 ne de E-Kaderin tek başına hES hücrelerinin etkin klonal sağ kalmasına izin vermedi.

Daha sonra, laminin-521 ve E-Kaderin kombinasyonları, kombinasyonların hücrelerin klonal hayatta kalmasını sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek için test edildi. Titre edilmiş E-Kaderin ile kombinasyon halinde hücre kültürü tabakası kaplaması için sabit miktarlarda laminin-521 kullanıldı. Hücrelerin klonal sağkalımı, E-Kaderin'in laminin-521'e

farklı oranlarında, ağırlıkça yaklaşık 1:10 ila 1:5 dahil olmak üzere, sağlandı.

Çeşitli modifikasyonların mTeSR1 ortamına etkilerini test etmek için ek testler gerçekleştirilmiştir. Levhaların kaplanması için E-Kaderin'in laminin-521'e yaklaşık 1/10 oranında bir karışımı kullanılmıştır. Beklenmedik bir şekilde, albümin konsantrasyonundaki 2x bir artışın, laminin-521 / E-Kaderin matrisi üzerindeki hES hücrelerinin klonal sağkalımını önemli ölçüde geliştirdiği keşfedilmiştir. Bu koşullar altında münferitleştirilmiş hES hücrelerinin hayatta kalma oranı %10 ila %15 idi ve her iki mTeSR1 ortamı ve ek albüminli mTeSR1 ortamı ile tek başına Matrigel, laminin-521 veya E-Kaderin üzerindeki hücrelerinkinden en az bir kademe büyük idi. Hücrelerin hızlandırılmış fotoğrafçılığı laminin-521 / E-Kaderin kaplamalarının, farklı hücrelerin agregasyonu yoluyla değil, tek hücrelerin proliferasyonu yoluyla hücre sağkalımını kolaylaştırdığını doğruladı. Laminin-521 / E-Kaderin benzer şekilde tamamen kimyasal olarak tanımlanmış ve ksenon içermeyen TeSR2 ortamı içinde hücrelerin rekombinant insan serum albümini (rHSA) eklenmesiyle klonal hayatta kalmasını sürdürmüştür.

Ek testlerde, buluşun bir parçası olmayan hES hücre soyları türetildi. Yirmi dört iyi doku hücre kültürü tabakası, iki kez Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzlu ile yıkandı. Daha sonra çanaklar aşağıdakileri ihtiva eden steril çözelti ile 2 saat 37°C'de kaplandı: 100 µg/mL'den 48 µL laminin-521 (BioLamina AB, Stockholm); 82 µg/mL'den 6 µL E-Cadherin (R DSistemleri); ve laminin-521 / E-Cadherin matrisini üretmek için 300 µL DPBS kalsiyum ve magnezyum (GIBCO).

Buluşun bir parçası olmayan hES hücre dizilerini türetmek için kullanılan bağışlanmış embriyolar, her iki eşin onayı ve etik onay alındıktan sonra akredite edilmiş bir in vitro fertilizasyon kliniğinden temin edildi. İnfertilite tedavisi

için kullanılamayan sadece taze veya dondurulmuş embriyolar, türetme prosedürlerinde kullanılmıştır. Bir ya da iki hücre, bu amaçla tasarlanmış bir lazer aparatı ile zona pellucidaya küçük bir açıklık yaptıktan sonra bir mikropipet kullanılarak bir 8 hücre aşamalı embriyodan izole edildi. Hücreler, ilave rHSA ile TeSR2 ortamında laminin-521 / E-Kaderin matrisine yerleştirildi. Hücreler başarıyla bağlandı ve çoğalmaya başladı. Ebeveyn embriyoların bir blastosist aşamasına kadar büyümesine ve dondurulmasına izin verildi. Embriyo kültürü, 37°C'de ve %5 O₂ / %10 CO₂'de yağ altında damlalar halinde ksenonsuz standartlaştırılmış in vitro fertilizasyon kültür ortamı kullanılarak gerçekleştirildi. Zona pellucida'nın çıkarılmasından sonra beş insan blastosistinin iç hücre kütleleri mekanik olarak izole edildi ve laminin-521 / E-Kaderin matrisi üzerine 4 oyuklu kültür plakalarına (Nunc) kaplandı. 48 saatlik bir kültürün ardından, kültür ortamı günlük olarak değiştirildi. 10 ila 14 gün sonra, çıkıntılar mekanik olarak izole edildi ve laminin-521 / E-Kaderin matrisi üzerine tekrarlandı. Sonraki 2 - 3 geçiş için mekanik geçiş kullanıldı, daha sonra, TrypLE Select (GIBCO) kullanılarak koloniler geçirildi.

Yukanda yukarıda sözü edilen bovin albümini içeren mTeSR1 ortamı ile anlatılan laminin-521 / E-Cadherin matrisinin kullanılmasıyla, buluşun bir parçası olmayan üç yeni hES hücre dizisi, altı kültürlü blastosistden türetilmiştir. Kaplamadan dört gün sonra, iç hücre kütleleri kök hücre benzeri dışa büyümeler verdi. ŞEKİL 24 laminin-521 / E-Cadherin matrisi üzerinde buluşun bir parçası olmayan yeni bir insan embriyonik soyu HS841 hücre soyunun erken bir evresini göstermektedir. İç hücre kütlelerinin mekanik izolasyonundan dört gün sonra laminin-521 / E-Kaderin matrisinin kaplanması ve bir gün altı blastosistin iç hücre kütlelerinden çıkan morfolojik olarak tipik insan embriyonik kök hücreleri gösterilmiştir.

Beklenmedik bir şekilde, hücre kültürü sistemi ve yöntemi, standart yöntemlerden daha yüksek bir türev oranı olan 6 embriyodan 3'ünde (%50) stabil, hES hücre çizgileri verdi.

Tamamen kimyasal olarak tanımlanmış ve kseno içermeyen bir ortam olan ilave rHSA ile bir laminin-521 / E-Kaderin matrisi ve TeSR2 ortamının kullanılması, buluşun parçası olmayan yeni hES hücre soylarının türetilmesinde benzer sonuçlar vermiştir. .

Aşağıdaki Tablo 5, bu örnekte kullanılan mTeSR1 ortamı için formülasyon sağlamaktadır. Her bir bileşenin miktarı% 20'ye kadar değişebilir.

Özel uygulamalarda insan serum albümini (HSA) konsantrasyonu, 0.3 mM - 1 mM veya 0.3 mM - 0.4 mM dahil olmak üzere 0.195 mM - 1 mM arası değişebilir. bFGF miktarı da 0 - 105 ng/mL veya 0 - 3.9 ng/mL veya 0.5 ng/mL - 3.5 ng/mL arasında değişebilir. HSA ve bFGF miktarındaki bu iki değişme bağımsız olarak veya birlikte meydana gelebilir.

Tabla 5. mTeSR1 formülasyonu.

mTeSR1 Ingredient	Molar kütle (g/mol)	Konsantrasyon (ng/mL)	Konsantrasyon (mM)
İNORGANİK TUZLAR			
Kalsiyum klorür (susuz)	110,98	9.14E+04	8.24E-01
HEPES	238,3	2.81E+06	1.18E+01
Lityum Klorür (LiCl)	42,39	4.15E+04	9.80E-01
Magnezyum klorür (susuz)	95,21	2.26E+04	2.37E-01
Magnezyum Sülfat)	120,37	3.84E+04	3.19E-01
Potasyum klorür (KCl)	74,55	2.43E+05	3.26E+00

Sodyum bikarbonat	84,01	1.51E+06	1.80E+01
Sodyum klorür (NaCl)	58,44	5.53E+06	9.46E+01
Sodyum fosfat, dibazik	141,96	5.56E+04	3.92E-01
Sodyum fosfat, monobazik monohidrat (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	137,99	4.90E+04	3.55E-01
ESER MİKTARDA MİNERALLER			
Ferrik nitrat (Fe(NO ₃) ₃ -	404	3.92E+01	9.71 E-05
Demir sülfat heptahidrat	278,01	3.28E+02	1.18E-03
Bakır (II) sülfat	249,69	1.02E+00	4.08E-06
Çinko sülfat pentahidrat	287,56	3.39E+02	1.18E-03
Amonyum metavanadat	116,98	1.28E+00	1.09E-05
[00220] Manganez sülfat	169,02	3.33E-01	1.97E-06
NiSO ₄ -6H ₂ O	262,85	2.55E-01	9.70E-07
Selenyum	78,96	1.40E+01	1.77E-04
Sodyum meta silikat	284,2	2.75E+02	9.66E-04
SnCl ₂	189,62	2.35E-01	1.24E-06
Molibdik asit, amonyum	1235,86	2.43E+00	1.97E-06
CdCl ₂	183,32	2.24E+00	1.22E-05
CrCl ₃	158,36	3.14E-01	1.98E-06
AgNO ₃	169,87	1.67E-01	9.81E-07
AlCl ₃ -6H ₂ O	241,43	1.18E+00	4.87E-06
Baryum asetat	255,42	2.50E+00	9.79E-06
CoCl ₂ -6H ₂ O	237,93	2.33E+00	9.81E-06
GeO ₂	104,64	5.20E-01	4.97E-06
KBr	119	1.18E-01	9.89E-07
KI	166	1.66E-01	1.00E-06
NaF	41,99	4.13E+00	9.83E-05
RbCl	120,92	1.19E+00	9.81E-06

ESER MİKTARDA MİNERALLER			
ZrOCl ₂ -8H ₂ O	178,13	1.75E+00	9.80E-06
ENERJİ SUBSTRATLARI			
D Glikoz	180,16	2.47E+06	1.37E+01
Sodyum piruvat	110,04	4.31E+04	3.92E-01
LİPİTLER			
Linoleik asit	280,45	5.27E+01	1.88E-04
Lipoik asit	206,33	8.25E+01	4.00E-04
Arakidonik asit	304,47	3.93E+00	1.29E-05
Kolesterol	386,65	4.33E+02	1.12E-03
DL alfa tokoferol asetat	472,74	1.37E+02	2.90E-04
Linoleik asit	278,43	1.95E+01	6.99E-05
Miristik asit	228,37	1.96E+01	8.59E-05
Oleik asit	282,46	1.96E+01	6.94E-05
Palmitik asit	256,42	1.96E+01	7.65E-05
Palmitoleik asit	254,408	1.96E+01	7.71E-05
Stearik asit	284,48	1.96E+01	6.89E-05
AMİNO ASİTLER			
L Alanin	89,09	1.22E+04	1.37E-01
L Arginin hidroklorür	147,2	8.07E+04	5.48E-01
L Asparagin H ₂ O	150,13	2.06E+04	1.37E-01
L Aspartik asit	133,1	1.82E+04	1.37E-01
L Sistein HCl-H ₂ O	175,63	1.38E+04	7.83E-02
L Sistein diklorür	313,22	2.45E+04	7.83E-02
L Glutamik asit	147,13	2.02E+04	1.37E-01
L Glutamin	146,15	4.30E+05	2.94E+00
Glisin	75,07	2.21E+04	2.94E-01
L Histidin monodiklorür	209,63	2.47E+04	1.18E-01

İzolösin	131,17	4.28E+04	3.26E-01
L Lösin	131,17	4.64E+04	3.54E-01
L Lisin hidroklorür	182,65	7.14E+04	3.91E-01
L Metionin	149,21	1.35E+04	9.06E-02
L Fenilalanin	165,19	2.79E+04	1.69E-01
L Prolin	115,13	2.49E+04	2.16E-01
L Serin	105,09	3.09E+04	2.94E-01
L Treonin	119,12	4.19E+04	3.52E-01
AMİNO ASİTLER			
L Tritofan	204,23	7.07E+03	3.46E-02
L Tirozin disodyum tuz	225,15	3.78E+04	1.68E-01
L Valin	117,15	4.16E+04	3.55E-01
VİTAMİNLER			
Askorbik asit	176,12	4.46E+04	2.53E-01
Biyotin	244,31	2.74E+00	1.12E-05
B12	1355,37	5.34E+02	3.94E-04
Kolin klorür	139,62	7.02E+03	5.03E-02
D Kalsiyum pantotenat	238,27	8.79E+02	3.69E-03
Folik asit	441,4	2.08E+03	4.71E-03
i-İnositol	180,16	9.89E+03	5.49E-02
Niasinamit	122,12	1.59E+03	1.30E-02
Pridoksin hidroklorür	205,64	1.57E+03	7.62E-03
Riboflavin	376,36	1.72E+02	4.56E-04
Tiamin hidroklorür	337,27	8.16E+03	2.42E-02
BÜYÜME			
GABA	103,12	1.01E+05	9.79E-01
Pipekolik asit	129	1.27E+02	9.84E-04
bFGF	18000	1.04E+02	5.77E-06
TGF beta 1	25000	5.88E-01	2.35E-08

İnsan İnsülini	5808	2.28E+04	3.92E-03
İnsan Holo transferini	78500	1.08E+04	1.37E-04
İnsan serumu Albümin	67000	1.31E+07	1.95E-01
Glutation (indirgenmiş)	307,32	1.96E+03	6.38E-03
DİĞER BİLEŞENLER			
Hipoksantin Na	136,11	1.61E+03	1.18E-02
Kırmızı Fenol	354,38	5.99E+03	1.69E-02
Putrsin 2HCl	161,07	6.36E+01	3.95E-04
Timidin	242.22 9	2.86E+02	1.18E-03
2 Merkaptoetanol	78,13	7.66E+03	9.80E-02
Pluronik F-68	8400	1.96E+05	2.33E-02
Tween 80	1310	4.31E+02	3.29E-04

LN-521 / e-kadherin substratı ve ilave albümin bulunan mTeSR1 ortamını içeren sistemler, tamamen kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda ve ksenonsuz koşullarda besleyici veya apoptosisin herhangi bir inhibitörü olmadan, farklılaşmamış kök hücrelerini (örneğin embriyonik ve uyarılmış pluripotent kök hücreleri) korumak ve çoğaltmak için son derece iyi çalışır.

Bu bağlamda, LN-521 ve LN-511, e-kaderin ile birleştirilmiş bir substratta kullanılabilir. LN-521 / LN-511, bozulmamış bir protein veya bir protein fragmanı olarak mevcut olabilir. Yine bir "fragman" başka bir moleküle veya reseptöre bağlanma aktivitesine sahip olan bir, iki veya üç işlevsel alanı içerir. Genel olarak, etkinliğin, kök hücrelerin substrat üzerinde çoğalıp çoğalmadığıyla belirlendiği herhangi bir etkili laminin kullanılabilir. Lamininler de genellikle rekombinanttır.

Ayriyeten, bir laminin substratı ve hücre kültür ortamı içeren sistemler, yeni retina pigment epiteli (RPE) hücrelerini yapmak için kullanılabilir. Bu bağlamda, görme bozukluğu ciddi morbiditenin ana nedenidir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), görme alanı (makula) merkezinde retinaya verilen hasar nedeniyle görme kaybına yol açan bir tıbbi durumdur. Yaşa bağlı maküler dejenerasyon, makülada retina pigment epiteli ve altta yatan koroid arasındaki karakteristik sarı çökeltilerle (drusen) başlar. İleri AMD'nin "kuru" formunda retina atrofilerinin altındaki retina pigment epiteli katmanını, gözün orta kısmında fotoreseptörlerin (çubuklar ve koniler) kaybı ile görme kaybına neden olur.

AMD, Batı dünyasında sağlık hizmetleri üzerindeki ekonomik yük nedeniyle felç riskini de aşan görme bozukluğunun en yaygın nedenidir. Yalnız Avrupa ve Kuzey Amerika'da, 5 milyondan fazla insan son evre AMD'den (yani neovasküler veya coğrafi atrofi) muzdarip olup yılda yaklaşık 500.000 kadar vakaya rastlanmaktadır. Tekrarlama sıklığının 2040 yılında %75 oranında artması beklenmektedir. Dahası görme bozukluğu, yaşlanan popülasyonda hassasiyet nedeniyle kırılmalar gibi bazı önemli komorbiditeler ile ilişkili olup sağlık ve toplum kaynakları üzerinde büyük bir yüke neden olur.

RPE, retina görsel hücrelerini besleyen nörosensör retinanın hemen dışındaki pigmentli hücre katmanı olup alttaki koroide ve üstteki retinal görsel hücrelere sıkıca bağlıdır. Bu tek RPE hücre katmanı normal nöroretinal ve koroidal fonksiyon için gereklidir. Örneğin RPE fagositoz, fotoreseptör dış bölümlerini, böylelikle de normal hücre döngüsünü korur (sindirir). RPE ayrıca Bruch membranının yapısal proteinlerini sentezler ve bu da dış kan-retinal bariyeri oluşturur. Erken AMD'de, RPE'de ve RPE fonksiyonunu giderek azaltan alt RPE boşluğunda sindirilmemiş hücre içi debris

birikimi meydana gelir. İleri derecede AMD'de RPE işlev bozukluğu, Bruch membranındaki (yani neovasküler AMD) kırılmalar yoluyla koroidal damarların büyümesine ve/veya coğrafi atrofiye yol açar.

- 5 Coğrafi atrofide (GA), dejenerasyon esas olarak RPE'yi ve fotoreseptörleri etkiler ve hücre transplantasyonu ile restorasyon mantıklı görünür. İnsan embriyonik kök hücrelerinin (hESC) farklılaşmasıyla RPE hücrelerinin elde edilmesine yönelik birkaç farklı yöntem yayınlanmış olup
- 10 bunların bir çoğu uzun süre gerektirse bile başarılıdır. Yayınlanmış farklılaşma programlarının hepsinde bir problem, ya hayvandan türetilmiş ya da tanımlanmamış bileşenler (ör. besleyici hücreler, insan serumu) içermeleri olup bu da bunları klinik kullanım için daha zor hale getirmektedir.
- 15 Mevcut açıklamada RPE hücreleri, besleyici içermeyen tamamen kimyasal olarak tanımlanmış ve kseno içermeyen yöntemler kullanılarak kök hücrelerden türetilmektedir. "Kimyasal olarak tanımlanmış" terimi, ortamdaki bütün bileşenlerin herhangi bir biyolojik dokudan izole edilmeyen bilinen
- 20 kimyasal maddeler olduğu anlamına gelir. "Ksenosuz" terimi, yöntemlerde hayvansal kökenli hiçbir maddenin kullanılmadığı anlamına gelir. İnsan embriyonik kök hücreleri, kaderin içerebilen bir laminin substratı üzerinde kültürlenebilir ve hayvan kökenli herhangi bir madde (yani klinik sınıf RPE
- 25 hücreleri) olmaksızın tamamen kimyasal olarak tanımlanmış koşullarda RPE hücreleri olarak farklılaştırılabilir.

Başlangıçta kök hücreler, örneğin bir TeSR2 ortamı ya da Nutristem ortamı (Stemgent'ten temin edilebilir) olarak bazik fibroblast büyüme faktörü, diğer bir deyişle bFGF veya FGF2

30 gibi bir büyüme faktörünü ihtiva eden bir birinci hücre kültür ortamı kullanılarak kültürlenir. Hücre kültürü ortamındaki büyüme faktörü (yani FGF2) miktarı 3.9 ng / ml veya daha azdır. Hücreler hemen hemen birleştiklerinde,

yukarıda tarif edilen ve uygun şekilde modifiye edilen TeSR2 ortamı gibi büyüme faktörünü (yani FGF2) içermeyen bir ikinci hücre kültürü ortamında kültürlenir. Bu birleşme bir hafta sonra meydana gelebilir. Birinci hücre kültür ortamına (FGF2 içeren) maruz kalmanın ilk zaman periyodundan sonra, hücreler birinci hücre kültür ortamına daha fazla maruz kalmadan ortamdan alınır. Bu, birinci hücre kültür ortamının laminin substratından boşaltılmasıyla yapılabilir veya alternatif olarak kök hücreler, ikinci bir laminin substratına yeniden kaplanabilir. Kök hücreler daha sonra ikinci hücre kültür ortamına yerleştirilir, yani ikinci hücre kültür ortamında kültürlenir. İkinci hücre kültür ortamı, örneğin her hafta periyodik olarak değiştirilir veya yenilenir. Sekiz hafta sonra kök hücreler, RPE hücreleri olarak farklılaşmıştır. FGF2'nin mevcudiyeti, tipik olarak pluripotent halde kök hücreleri korumak için gereklidir, onun mevcudiyetini ortadan kaldırmak kök hücrelerin RPE hücreleri olarak farklılaşmasına neden olur. Bu örnekte, kök hücreler bir hafta boyunca ilk hücre kültür ortamına (büyüme faktörü içeren) maruz bırakılmış ve daha sonra yedi hafta boyunca ikinci hücre kültürü ortamında (büyüme faktörü yok) kültürlenmiştir. Prensipte kök hücrelerin %100'ü daha sonra subretinal enjeksiyon veya başka nakil işlemleri ile AMD hastalarını tedavi etmek için kullanılabilen klinik sınıf RPE hücreleri haline gelebilir.

Referans ÖRNEK 5

Maküler dejenerasyonun tedavisi için insan rekombinantı laminin 521 üzerinde klinik sınıf insan retina pigment epitelinin ksenon içermeyecek besleyici içermeyecek şekilde farklılaştırılması

Bir laminin-521 substratının yüzeyinde ksenon içermeyen besleyici içermeyen koşullarda oluşturulan insan embriyonik kök hücreleri kullanıldı. İnsan embriyonik kök hücreleri

(HS980 soyu) bir LN-521 substratı üzerine pipetlendi. Kök hücreler daha sonra iki farklı kimyasal olarak tanımlanmış ksenonsuz kültür ortamında (TeSR2, Stem Cell Technologies veya Nutristem, Stemgent) kültürlendi Her iki ortam da FGF2 içermekte olup bu ortamlara hiçbir ek büyüme faktörü eklenmemiştir.

Bir hafta sonra, kök hücreler başka bir LN-521 substratının yüzeyi üzerine yeniden kaplandı. Daha sonra, kök hücreler, FGF2 olmadan yapılmış bir Nutristem XF ortamına maruz bırakıldı. Hücreler bu şartlarda muhafaza edildiler ve sonunda küçük pigmentli agrega içeren bir tek katman oluşturdular. Nutristem XF ortamının haftalık medya değişiklikleri ile altı hafta sonra hücreler RPE'nin tipik parke taşı formuna göre farklılaşmıştı ve çok daha fazla pigment içeriyorlardı. Sekiz hafta sonra, tipik RPE hücreleri haline gelmiştir. ŞEKİL 25 ve ŞEKİL 26 RPE hücrelerinin sekiz hafta sonraki parke taşı şeklini gösteren fotomikrograflardır.

RPE hücreleri kimyasal olarak tanımlanmış olup kimyasal madde veya büyüme faktörleri ile hayvansal madde içermezler. RPE hücreleri, eşit olarak farklılaşmış popülasyonlar olmayıp çeşitli kümeler veya embriyoid gövdeler yerine tek katman halinde büyürler. Klinik sınıf RPE hücreleri daha sonra subretinal enjeksiyon veya diğer benzeri tedaviler veya işlemler vasıtasıyla AMD hastalarını tedavi etmek için kullanılabilir.

SEKANS LİSTESİ

<110> Hovatta, Outi

Tryggvason, Karl

<120> Methods of Producing RPE Cells

<130> LCTI-200026001

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

5 <211> 3695

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Lys Arg Leu Cys Ala Gly Ser Ala Leu Cys Val Arg Gly Pro
1 11 22

Arg Gly Pro Ala Pro Leu Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala
23 25 31

Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Phe Phe
35 41 45

Tyr Phe Asn Leu Ala Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ala Ser Ala Thr Cys
50 55 60

Gly Glu Glu Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Arg Pro Ser Glu Asn Leu
65 70 75 81

Tyr Cys Lys Leu Val Gly Gly Pro Val Ala Gly Gly Asn Pro Asn Glu
85 90 95

Ser Ile Arg Gly Glu Tyr Cys Asn Ile Cys Ser Ala Ala Asn Ser Asn
100 105 110

Lys Ala His Phe Ala Ser Asn Ala Ile Asp Gly Thr Glu Arg Trp Trp
115 120 125

Glu Ser Phe Phe Leu Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Asn Glu Val Asn Val
130 135 140

Thr Leu Asp Leu Gly Glu Val Phe His Val Ala Tyr Val Leu Ile Lys
145 150 155 160

Phe Ala Asn Ser Pro Arg Pro Asn Leu Thr Val Leu Glu Arg Ser Met
165 170 175

Asp 180 Gly 189 Thr 190 Tyr 191 Ser 192 Gly 193
180 195 194

Asp 194 Cys 195 Leu 196 Arg 197 Phe 198 Gly 199 Pro 200 Thr 201 Leu 202 Glu 203 Asp 204 Ile 205 Thr 206
194 202 206

Arg 210 Asp 211 Ala 212 Ile 213 Lys 214 Thr 215 Thr 216 Glu 217 Tyr 218 Ser 219 Arg 220 Ile 221 Val 222 Phe 223
210 215 220

Leu 225 Glu 226 Asn 227 Gly 228 Thr 229 Val 230 Val 231 Ser 232 Leu 233 Val 234 Asn 235 Gly 236 Arg 237 Phe 238 Gly 239
225 230 235 240

Asp 245 Val 246 Asn 247 Phe 248 Ser 249 Thr 250 Ser 251 Pro 252 Leu 253 Leu 254 Ala 255 Glu 256 Phe 257 Thr 258 Iles 259 Ala 260
245 250 255

Thr 260 Asn 261 Val 262 Arg 263 Leu 264 Arg 265 Phe 266 Leu 267 Arg 268 Thr 269 Asn 270 Thr 271 Leu 272 Leu 273 Gly 274 His 275
260 265 270

Leu 278 Met 279 Gly 280 Lys 281 Ala 282 Leu 283 Arg 284 Arg 285 Arg 286 Thr 287 Val 288 Thr 289 Arg 290 Arg 291 Tyr 292 Lys 293
278 285 290

Tyr 297 Ser 298 Ile 299 Lys 300 Asn 301 Ile 302 Ser 303 Ile 304 Gly 305 Gly 306 Asp 307 Cys 308 Val 309 Cys 310 His 311 Gly 312
297 300 305

His 315 Ala 316 Asp 317 Ala 318 Cys 319 Asp 320 Ala 321 Lys 322 Asp 323 Phe 324 Thr 325 Asp 326 Phe 327 Phe 328 Arg 329 Leu 330
315 320 325 330

Gln 335 Cys 336 Thr 337 Cys 338 Glu 339 Asn 340 Thr 341 Lys 342 Gly 343 Gly 344 Thr 345 Cys 346 Asp 347 Arg 348 Cys 349
335 340 345 350

Lys 355 Pro 356 Gly 357 Phe 358 Asn 359 Glu 360 Glu 361 Pro 362 Asp 363 Lys 364 Pro 365 Ala 366 Thr 367 Ala 368 Asn 369 Ser 370
355 360 365 370

Ala 375 Arg 376 Glu 377 Lys 378 Glu 379 Ser 380 Lys 381 Arg 382 Cys 383 Lys 384 Gly 385 Asn 386 Ala 387 Thr 388 Asp 389 Cys 390
375 380 385 390

Tyr 395 Tyr 396 Asp 397 Phe 398 Glu 399 Val 400 Asn 401 Arg 402 Arg 403 Arg 404 Ala 405 Ser 406 Glu 407 Ser 408 Leu 409 Asn 410
395 400 405 410

Gly 415 His 416 Tyr 417 Glu 418 Gly 419 Gly 420 Val 421 Cys 422 Ala 423 Asp 424 Cys 425 Glu 426 His 427 Ala 428 Thr 429 His 430
415 420 425 430 435

His 435 Gly 436 Val 437 Asn 438 Cys 439 Glu 440 Arg 441 Cys 442 Leu 443 Phe 444 Gly 445 Phe 446 Lys 447 Arg 448 Ser 449 Pro 450
435 440 445 450

Asn 455 His 456 Thr 457 Leu 458 Asn 459 Ser 460 Pro 461 Phe 462 Val 463 Cys 464 Ala 465 Arg 466 Cys 467 Asn 468 Cys 469 Glu 470
455 460 465 470

Ser Arg Phe Thr Arg Gly Thr Cys Thr Arg Leu Thr Gly Arg Cys Tyr
435 440 445
Cys Arg Ala Asn Phe Ser Gly Cln Arg Cys Arg Val Cys Ala Cln Gly
450 455 460
Phe Thr Gly Phe Pro Ser Cys Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Ser Asn Asn
465 470 475 480
Thr Arg Glu Gln Val Leu Pro Ala Gly Cln Ile Val Asn Cys Asp Cys
485 490 495
Ser Ala Ala Gly Thr Gln Gly Asp Ala Cys Arg Lys Asp Pro Arg Val
500 505 510
Gly Arg Cys Leu Cys Lys Pro Asn Phe Gln Gly Thr His Cys Glu Leu
515 520 525
Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Gly Cys Gln Pro Cys Gln Cys Ser
530 535 540
Ser Pro Gly Val Ala Arg Arg Arg Cys Asp Pro Asp Thr Gly Glu Cys
545 550 555 560
Arg Cys Arg Val Gly Phe Gln Gly Ala Thr Cys Arg Arg Cys Ala Thr
565 570 575
Gly Tyr Phe Ala Phe Pro Pro Leu Cys Gln Leu Cys Gly Cys Arg Pro Ala
580 585 590
Gly Thr Leu Thr Gln Gly Cys Asp Gln Ala Gly Arg Cys Leu Cys Gln
595 600 605
Pro Gln Phe Ala Gly Pro His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Tyr His
610 615 620
Gly Phe Pro Asn Cys Gln Ala Cys Thr Cys Asp Pro Arg Gly Ala Leu
625 630 635 640
Asp Gln Leu Cys Gly Ala Gly Gly Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Tyr
645 650 655
Thr Gly Thr Ala Cys Gln Gln Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Phe Pro
660 665 670
Ser Tyr Val Pro Cys His Cys Ser Ala Gln Gly Ser Leu His Ala Ala

675

680

685

Cys Arg Pro Arg Ser Gly Gln Cys Ser Cys Arg Thr Arg Val Thr Gly
690 695 700

Leu Arg Cys Asp Thr Cys Val Phe Gly Ala Tyr Asn Phe Pro Tyr Cys
705 710 715 720

Glu Ala Gly Ser Cys His Pro Ala Gly Leu Ala Pro Val Asp Pro Ala
725 730 735

Met Pro Cys Ala Gln Val Pro Cys Met Cys Arg Ala His Val Cys Gly
740 745 750

Pro Ser Cys Arg Arg Cys Lys Phe Gly Ser Arg Gly Leu Ser Pro Ser
755 760 765

Asn Thr Gln Gly Cys Ser Arg Lys Ser Cys Asp Leu Arg Gly Thr Leu
770 775 780

Gly Gly Val Ala Glu Cys Gln Phe Gly Thr Gly Gln Cys Glu Cys Lys
785 790 795 800

Pro His Val Cys Gly Ser Ala Cys Ala Ser Cys Lys Asp Gly Phe Phe
805 810 815

Cys Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Cys Arg Cys Asp
820 825 830

Le Gly Gly Ala Leu Gly Gln Ser Cys Gln Pro Arg Thr Gly Val Cys
835 840 845

Arg Cys Arg Pro Asn Thr Gln Gly Pro Thr Tyr Ser Glu Pro Ala Arg
850 855 860

Asp His Tyr Leu Pro Asp Leu His His Leu Arg Leu Glu Leu Glu Glu
865 870 875 880

Ala Ala Thr Pro Cys Gly His Ala Val Arg Phe Gly Phe Asn Pro Leu
885 890 895

Gln Pro Gln Arg Glu Ser Thr Arg Gly Tyr Ala His Val Ala Pro Val
900 905 910

Gln Pro Arg His Val Ala Arg Leu Arg Leu Thr Ser Pro Arg Leu Phe
915 920 925

Trp Leu Val Phe Arg Tyr Val Asn Arg Gly Ala Met Ser Val Ser Gly
 930 935 940

Arg Val Ser Val And Gly Gly Gly Arg Ser Ala Thr Cys A a Asn Cys
 941 950 955 960

Thr Ala Gly Ser Gly And Val Ala Phe Pro Pro Ser Thr Glu Pro A a
 965 970 975

Phe Ile Thr Val And Gly And Gly Phe Gly Glu Pro Phe Val Leu Asn
 980 985 990

Pro Gly Thr Thr Ala Leu And Val Glu Ala Gly Gly Val Leu Leu Asn
 995 1000 1005

Tyr Val Val Leu Leu Pro Ser Ala Tyr Tyr Glu A a A a Leu Leu
 1010 1015 1020

Gly Leu And Val Thr Glu Ala Cys Thr Tyr Arg Pro Ser A a Glu
 1025 1030 1035

Glu Ser Gly Asp Asn Cys Leu Leu Tyr Thr His Leu Pro Leu Asp
 1040 1045 1050

Gly Phe Pro Ser Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu Cys Arg Glu Asp
 1055 1060 1065

Asn Ser Leu Pro Arg Pro Cys Pro Thr Glu Glu Leu Ser Pro Ser
 1070 1075 1080

His Pro Pro Leu Ile Thr Cys Thr Gly Ser Asp Val Asp Val Glu
 1085 1090 1095

Leu Glu Val Ala Val Pro Glu Pro Gly Arg Tyr Ala Leu Val Val
 1100 1105 1110

Glu Tyr Ala Asn Glu Asp Ala Arg Glu Glu Val Gly Val Ala Val
 1115 1120 1125

His Thr Pro Gly Arg Ala Pro Glu Glu Gly Ser Ser Ser Ser His
 1130 1135 1140

Pro Cys Leu Tyr Ser Thr Leu Cys Arg Gly Thr Ala Arg Asp Thr
 1145 1150 1155

Glu Asp His Leu Ala Val Pro His Leu Asp Ser Glu Ala Ser Val
 1160 1165 1170

Arg Trp	Thr Ala Glu Thr Ala	Arg Pro Thr Ser His	Val Lys Val Thr
1177		1180	1183
Leu Val	Pro Ile Glu Glu Ser	Pro Pro Glu Phe Val	Glu Pro Arg
1187		1190	1200
Val Ser	Cys Ile Ser Ser His	Lys Ala Thr Lys Pro	Asn Ser Ala
1205		1210	1215
Ala Cys	Leu Pro Ser Arg Phe	Pro Cys Pro Pro Glu	Pro Thr Ile
1220		1221	1230
Leu Arg	Asp Cys Glu Val Ile	Pro Leu Pro Pro Gly	Leu Pro Leu
1231		1240	1241
Thr His	Ala Glu Asp Leu Thr	Pro Ala Met Ser Pro	Ala Lys Pro
1251		1255	1260
Arg Trp	Arg Pro Thr Thr Ala	Val Asn Thr Asn Ala	Lys Pro Thr
1264		1270	1275
Leu Leu	Arg Glu Arg Glu Ala	Thr Val Val Phe Thr	Thr His Val
1280		1285	1290
Pro Thr	Leu Gly Arg Lys Ala	Phe Leu Leu His Gly	Lys Glu Pro
1295		1300	1305
Ala Thr	Pro Thr Thr Pro Val	Lys Val Leu Thr Asn	Asn Gly Arg
1310		1311	1320
Val Trp	Ile Gly Ala Ala Asn	Ala Ser Phe Cys Pro	His Gly Tyr
1325		1330	1335
Gly Cys	Arg Thr Leu Val Val	Cys Glu Gly Thr Ala	Leu Thr Asp
1340		1345	1350
Val Thr	His Ser Glu Leu Thr	Val Thr Val Asn Val	Pro Lys Gly
1355		1360	1361
Arg Trp	Leu Trp Leu Asn Tyr	Val Leu Val Val Pro	Lys Asn Val
1370		1375	1380
Tyr Ser	Phe Gly Tyr Leu Ala	Lys Glu Pro Thr Asp	Lys Ser Tyr
1381		1390	1391
Asp Glu	Ile Ser Asn Cys Ala	Ala Glu Gly Lys His	Ile Ser Pro
1400		1405	1410

Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Phe	Cys	Arg	Asn	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser
1415						1420						1425		
Leu	Phe	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Gly	Cys	His	Glu	Val
1430						1435						1440		
Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Ser	Cys	Glu	Pro	Thr	Gly	Gly	Glu	Cys	Pro
1445						1450						455		
Cys	His	Ala	His	Val	Ile	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Arg	Cys	Ala	Pro
1460						1465						470		
Gly	Tyr	Thr	Gly	Thr	Pro	Asn	Cys	Arg	Thr	Cys	Asp	Cys	Gly	Ala
1475						1480						485		
Arg	Leu	Cys	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Glu	Cys	Ile	Cys	Pro	Thr	Arg
1490						1495						1500		
Thr	Phe	Thr	Pro	Asp	Cys	Leu	Leu	Cys	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Gly
1505						1510						1515		
Cys	His	Thr	Ser	Val	Gly	Cys	Glu	Glu	Cys	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro
1520						1525						1530		
Gly	Ile	Glu	Glu	Leu	Thr	Asp	Pro	Thr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Gly
1535						1540						1545		
Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Pro	Asn	Val	Thr	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	Thr
1550						1555						1560		
Cys	Ser	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Tyr	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Cys	Asp
1565						1570						1575		
Cys	His	Glu	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Gly	Val	Cys	Asp	Pro	Leu	Pro
1580						1585						1590		
Gly	Glu	Cys	Lys	Cys	Lys	Glu	Asn	Val	Glu	Gly	Pro	Lys	Cys	Asp
1595						1600						1605		
Glu	Cys	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Asn	Lys	Lys
1610						1615						1620		
Gly	Cys	Thr	Arg	Cys	Phe	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Glu	Arg	Lys	Arg
1625						1630						1635		
Ser	Ser	Ser	Lys	Thr	Arg	Glu	Glu	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Gly	Arg

1640	1645	1650
Val Leu Ser Ser Thr Asp Arg Glu Val Val Pro His Glu Arg Glu 1655	1660	1665
Phe Gly Thr Glu Met Leu Arg Ala Asy Leu Arg His Val Pro Glu 1670	1675	1680
Ala Val Phe Glu Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Trp Glu Ala Pro Pro 1685	1690	1695
Ser Tyr Leu Gly Asp Arg Val Ser Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Arg 1700	1705	1710
Tyr Glu Ser Ser Ser Ser Glu Thr Glu Arg Gly Arg Val Phe Val Pro 1715	1720	1725
Ser Glu Ser Arg Pro Asp Val Val Leu Glu Gly Asn Glu Met Ser 1730	1735	1740
Leu Thr Phe Leu Glu Phe Ala Tyr Pro Thr Pro Gly His Val His 1745	1750	1755
Arg Gly Glu Leu Glu Leu Val Glu Gly Ser Thr Arg His Thr Val 1760	1765	1770
Thr Arg Asn Thr Val Ser Arg Glu Glu Leu Met Met Val Leu Ala 1775	1780	1785
Ser Leu Glu Glu Ser Glu Ile Arg Ala Leu Phe Ser Glu Ile Ser 1790	1795	1800
Ser Ala Val Phe Leu Arg Arg Val Ala Leu Glu Val Ala Ser Pro 1805	1810	1815
Ala Gly Glu Gly Ala Leu Ala Ser Asn Val Glu Leu Cys Leu Cys 1820	1825	1830
Phe Ala Ser Tyr Arg Gly Asn Ser Cys Glu Glu Cys Ala Pro Gly 1835	1840	1845
Phe Tyr Arg Arg Val Lys Gly Leu Ser Leu Gly Arg Cys Val Pro 1850	1855	1860
Cys Glu Cys Ser Gly His Ser Asp Arg Cys Leu Pro Gly Ser Gly 1865	1870	1875

Val Cys Val Asp Cys Glu His Asn Thr Glu Gly Ala His Cys Glu
 1880 1885 1890

Arg Cys Glu Ala Gly Phe Val Ser Ser Arg Arg Arg Pro Ser Ala
 1895 1900 1905

Phe Cys Val Ser Cys Pro Cys Pro Leu Ser Val Pro Ser Asn Asn
 1910 1915 1920

Phe Ala Glu Gly Cys Val Leu Arg Gly Gly Arg Glu His Cys Leu
 1925 1930 1935

Cys Cys Pro Gly Cys Ala Gly Ala Ser Cys Glu Arg Cys Ala Pro
 1940 1945 1950

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Ser Cys His Pro
 1955 1960 1965

Cys Arg Cys Ser Gly Asn Gly Asp Phe Asn Leu Leu Leu Ser Asp
 1970 1975 1980

Cys Asn Pro Leu Thr Gly Ala Cys Arg Gly Cys Cys Leu Arg His Thr
 1985 1990 1995

Thr Gly Pro Arg Cys Leu Ala Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Gly Asn
 2000 2005 2010

Ala Leu Leu Pro Gly Asn Cys Thr Arg Cys Asp Cys Thr Pro Cys
 2015 2020 2025

Gly Thr Glu Ala Cys Asp Pro His Ser Gly Thr Cys Leu Cys Lys
 2030 2035 2040

Ala Gly Val Thr Gly Arg Arg Cys Asp Arg Cys Glu Glu Gly Thr
 2045 2050 2055

Phe Gly Phe Asp Gly Cys Gly Gly Cys Arg Thr Cys Ala Cys Gly
 2060 2065 2070

Phe Ala Ala Glu Gly Ser Glu Cys His Phe Glu Ser Gly Glu Cys
 2075 2080 2085

His Cys Arg Pro Gly Thr Met Gly Pro Gly Cys Arg Glu Cys Ala
 2090 2095 2100

Pro Gly Tyr Thr Gly Leu Pro Gly Gly Gly Cys Arg Arg Cys Glu
 2105 2110 2115

Cys Pro Gly Gly Arg Cys Asp Pro His Thr Gly Arg Cys Asn Cys
 2172 2185 2192

Pro Pro Gly Ser Ser Gly Glu Arg Cys Asp Thr Cys Ser Gln Gln
 2195 2202 2210

His Gln Val Pro Val Ser Gly Gly Pro Val Gly Arg Ser His His
 2213 2225 2232

Cys Ser Val Cys Asp His Cys Val Val Leu Leu Leu Asn Asn Leu
 2235 2248 2255

Gln Arg Ala Gly Ala Leu His Pro Ala His His Gln Gln His Arg
 2258 2270 2277

Cys Leu Asp Ala Ser Ser Val Ala Thr Ser Arg Leu His Arg Leu
 2280 2293 2300

Asn Ala Ser His Ala Asp Leu Gln Ser Gln Leu Arg Ser Phe Leu
 2303 2315 2322

Gly Pro Ala His Gln Thr Ala Gln Gln Leu Gln Val Leu Glu Gln
 2325 2338 2345

Gln Ser Thr Ser Leu Gly Gln Asp Ala Arg Arg Leu Gly Gly Gln
 2348 2360 2367

Ala Val Gly Thr Arg Asn Gln Ala Ser Gln Leu Leu Ala Gly Thr
 2370 2383 2390

Gln Ala Thr Ser Gly His Ala His Thr Ser Ser Ala Ala His Arg
 2393 2405 2412

Ala Val Asp Arg Thr Leu Ser Gln Leu Met Ser Gln Thr Gly His
 2415 2428 2435

Leu Gly Leu Ala Arg Ala Ser Ala Pro Ser Gly Gln Gln His Leu
 2438 2450 2457

Arg Thr Leu Ala Gln Val Glu Arg Leu Leu Trp Gln Met Arg Ala
 2460 2473 2480

Arg Asp Leu Gly Ala Thr Gln Ala Ala Ala His Ala Gln His Ala
 2483 2495 2502

Ala Ala Gln Arg Leu Leu Ala Arg Val Gln Gln Gln Leu Ser Ser
 2505 2518 2525

Leu Thr Glu Glu Asn Glu Ala Leu Ala Thr Glu Thr Arg Asp Arg
 2385 2386 2387

Leu Ala Glu His Glu Ala Gly Leu Met Asp Leu Arg Glu Ala Leu
 2388 2389 2390

Asn Arg Ala Val Asp Ala Thr Arg Glu Ala Glu Glu Leu Asn Ser
 2391 2392 2393

Arg Asn Glu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Leu Glu Arg Val Glu Glu
 2401 2402 2403

Leu Ser Arg Asp Asn Ala Thr Leu Glu Ala Thr Leu His Ala Ala
 2420 2421 2422

Arg Asp Thr Leu Ala Ser Val Thr Arg Leu Leu His Ser Leu Asp
 2423 2424 2425

Glu Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser Leu Asn Gly
 2430 2431 2432

Ala Arg Thr Pro Leu Leu Glu Arg Met Glu Thr Phe Ser His Ala
 2460 2461 2462

Gly Ser Lys Leu Arg Leu Val Glu Ala Ala Glu Ala His Ala Glu
 2480 2481 2482

Glu Leu Gly Glu Leu Ala Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ile Leu Asp
 2495 2496 2497

Val Asn Glu Asp Arg Leu Thr Glu Arg Ala Ile Glu Ala Ser Asn
 2510 2511 2512

Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Glu Ala Val Glu Ala Ala Glu Asp Ala
 2525 2526 2527

Ala Gly Glu Ala Leu Glu Glu Ala Arg His Thr Arg Ala Thr Val
 2540 2541 2542

Val Arg Glu Gly Leu Val Asp Arg Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg
 2555 2556 2557

Ser Thr Ala Leu Glu Glu Ala Met Leu Glu Glu His Glu Arg Leu
 2570 2571 2572

Gly Leu Val Arg Ala Ala Leu Glu Gly Ala Arg Thr Glu Leu Arg

2585	2590	2595
Asp Val 2600	Arg Ala Lys Lys 2605	Asp Glu Leu Glu Ala 2610
Ala Glu 2615	Ala Met Leu Ala Met 2620	Asp Thr Asp Glu Thr 2625
Ile Ala 2630	Ile Ala Lys Ala Val 2635	Ala Ala Glu Ala Glu 2640
Thr Arg 2645	Val Glu Ser Glu Leu 2650	Glu Ala Met Glu Glu 2655
Arg Trp 2660	Glu Gly Glu Lys Glu 2665	Gly Leu Arg Gly Glu 2670
Glu Ala 2675	Val Leu Asp Ala Gly 2680	His Ser Val Ser Thr 2685
Thr Leu 2690	Pro Glu Leu Leu Ala 2695	Lys Leu Ser Ala Leu 2700
Gly Val 2705	His Asn Ala Ser Leu 2710	Ala Leu Ser Ala Ser 2715
Val Arg 2720	Glu Leu Ile Ala Glu 2725	Ala Arg Gly Ala Ala 2730
Lys Val 2735	Pro Met Lys Phe Asn 2740	Gly Arg Ser Gly Val 2745
Thr Pro 2750	Arg Asp Leu Ala Arg 2755	Leu Ala Ala Tyr Thr 2760
Phe Tyr 2765	Leu Glu Gly Pro Glu 2770	Pro Glu Pro Gly Glu 2775
Asp Arg 2780	Phe Val Met Tyr Met 2785	Gly Ser Arg Glu Ala 2790
Tyr Met 2795	Gly Val Ser Ser Arg 2800	Asp Tyr Tyr Val His 2805
Glu Leu 2810	Gly Gly Ala Lys Thr 2815	Ala Val Leu Ser Thr 2820

Ala Gly	Glu Glu Phe Ala	Ala	Val Ser Leu Asp	Arg	Leu Leu Glu
2825		2830		2835	
Phe Gly	His Met Ser Val	Thr	Val Glu Arg Glu	Met	Leu Glu Glu
2840		2845		2850	
Thr Tyr	Gly Arg Thr Val	Ala	Pro Gly Ala Glu	Gly	Leu Leu Asp
2855		2860		2865	
Leu Arg	Pro Arg Arg	Phe	Val	Glu Tyr Val Gly	Gly Tyr Phe Ser
2870		2875		2880	
Thr Phe	Thr Pro Pro Pro	Leu	Leu Arg Phe Pro	Gly	Tyr Arg Gly
2885		2890		2895	
Cys Ile	Glu Met Asn Thr	Leu	Asn Glu Glu Val	Val	Ser Leu Tyr
2900		2905		2910	
Asn Phe	Glu Arg Thr Phe	Glu	Leu Asn Thr Ala	Val	Asn Arg Pro
2915		2920		2925	
Cys Ala	Arg Ser Lys Ser	Thr	Gly Asn	Phe Thr Leu	Thr Asn Gly
2930		2935		2940	
Ser Tyr	Leu Asn Gly Thr	Gly	Phe Ala Asn Ile	Ser	Phe Asn Ser
2945		2950		2955	
Glu Ile	Ser Thr Thr Lys	Arg	Phe Glu Glu Glu	Leu	Arg Leu Val
2960		2965		2970	
Ser Tyr	Ser Gly Val Leu	Phe	Phe Leu Lys Glu	Glu	Ser Glu Phe
2975		2980		2985	
Leu Cys	Leu Ala Val Glu	Glu	Gly Ser Leu Val	Leu	Leu Tyr Asp
2990		2995		3000	
Phe Gly	Ala Gly Leu Lys	Lys	Ala Val Phe Leu	Glu	Phe Phe Phe
3005		3010		3015	
Pro Leu	Thr Ser Ala Ser	Lys	Ala Ile Glu Val	Phe	Leu Leu Gly
3020		3025		3030	
Gly Ser	Arg Lys Arg Val	Leu	Val Arg Val Glu	Arg	Ala Thr Val
3035		3040		3045	
Cys Ser	Val Glu Glu Asp	Asn	Asp Leu Glu Leu	Ala	Asp Ala Tyr
3050		3055		3060	

Lys Leu Gly Gly Val Phe Pro Arg Glu Leu Phe Pro Ser Leu Arg
 3076 3076

Arg Phe Phe Pro Thr Lys Gly Ser Val Arg Lys Cys Val Lys Gly
 3080 3085 3090

Ile Lys Ala Leu Gly Lys Tyr Val Asp Leu Lys Arg Leu Asn Thr
 3091 3095

His Gly Val Ser Ala Gly Cys His Ala Asp Leu Leu Val Gly Arg
 3100 3105 3110

Ala Met Phe Pro Phe Lys His Lys Pro Leu Arg Leu Ala Leu Ser
 3125 3130 3135

Asn Val Ala Pro Leu Thr Gly Asn Val Tyr Ser Gly Phe Gly Phe
 3140 3145 3150

His Ser Ala Glu Asp Ser Ala Leu Leu Tyr Lys Arg Ala Ser Pro
 3155 3160 3165

Asn Gly Leu Cys Gly Val Ser Leu Gly Gly Lys Arg Val Ser Phe
 3170 3175 3180

Glu Leu Leu Arg Thr Phe Val Lys Thr Ser Ala Gly Phe Ala Asp
 3185 3190 3195

Gly Ala Phe His Tyr Val Ala Phe Tyr Ser Asn Ala Thr Lys Val
 3200 3205 3210

Thr Leu Tyr Val Asp Asn Glu Leu Glu Glu Met Lys Phe His Arg
 3215 3220 3225

Gly Pro Phe Pro Ser Leu Glu Phe Glu Ser Glu Gly Phe Phe Arg
 3230 3235 3240

Leu Leu Leu Gly Gly Leu Pro Glu Ser Gly His Ile Tyr Asn Phe
 3245 3250 3255

Ser Gly Lys Ile Ser Asn Val Phe Val Ser Arg Leu Leu Gly Pro
 3260 3265 3270

Ala Arg Val Phe Asp Leu Glu Phe Asp Leu Lys Ser Val Asn Val
 3275 3280 3285

Ser Thr Lys Cys Ala Phe Ala Leu Glu Ala Phe Thr Thr Lys Thr
 3290 3295 3300

Gly Pro Arg Gly Leu Gln Ala Thr Ala Arg Lys Ala Ser Arg Arg
 3305 3310 3315

Ser Arg Gln Pro Ala Arg His Pro Ala Cys Met Leu Pro Pro His
 3320 3325 3330

Leu Arg Thr Ser Arg Arg Ser Tyr Gln Phe Gly Gly Ser Leu Ser
 3335 3340 3345

Ser His Leu Gln Phe Val Gly His Leu Ala Arg Phe Arg Asn Arg
 3350 3355 3360

Arg Ser Leu Ser Met His Val Leu Arg Arg Ser Ser Arg Gly Leu
 3365 3370 3375

Leu Ser Phe Thr Ala Arg Ser Arg Thr Gly Ser Thr Ser Leu Ala
 3380 3385 3390

Leu Phe Leu Ser Asn Gly His Phe Val Ala Gln Met Gln Gly Leu
 3395 3400 3405

Gly Pro Arg Leu Arg Ala Gln Ser Arg Gln Arg Ser Arg Thr Gly
 3410 3415 3420

Arg Trp His Lys Val Ser Val Arg Trp Gln Lys Asn Arg Ile Leu
 3425 3430 3435

Leu Val Thr Asp Gly Ala Arg Ala Trp Ser Gln Gln Gly Pro His
 3440 3445 3450

Arg Gln His Gln Gly Ala Gln His Pro Gln Pro His Thr Leu Phe
 3455 3460 3465

Val Gly Gly Leu Pro Ala Ser Ser His Ser Ser Lys Leu His Val
 3470 3475 3480

Thr Val Gly Phe Ser Gly Cys Val Lys Arg Leu Arg Leu His Gly
 3485 3490 3495

Arg Pro Leu Gly Ala Pro Thr Arg Met Ala Gly Val Thr Pro Cys
 3500 3505 3510

His Leu Gly Trp Leu His Ala Gly Leu Phe Thr Leu Gly Ser Gly
 3515 3520 3525

Gly Val His Ser Leu Asn Leu Thr Gly Ala Thr Leu Pro Asn Val
 3530 3535 3540

3530		3535		3540
Gly Leu	Glu Leu Glu Val	Arg Pro Leu Ala Val	Thr	Gly Leu Ile
3545		3550		3555
Phe His	Leu Gly Glu Ala	Arg Thr Pro Pro Tyr	Leu	Gln Leu Gln
3560		3565		3570
Val Thr	Glu Lys Glu Val	Leu Leu Arg Ala Asp	Asp	Gly Ala Gly
3575		3580		3585
Glu Phe	Ser Thr Ser Val	Thr Arg Pro Ser Val	Leu	Cys Asp Gly
3590		3595		3600
Gln Trp	His Arg Leu Ala	Val Met Lys Ser Gly	Asn	Val Leu Arg
3605		3610		3615
Leu Glu	Val Asp Ala Cys	Ser Asn His Thr Val	Gly	Pro Leu Leu
3620		3625		3630
Ala Ala	Ala Ala Gly Ala	Pro Ala Pro Leu Tyr	Leu	Gly Gly Leu
3635		3640		3645
Pro Glu	Pro Met Ala Val	Glu Pro Trp Pro Pro	Ala	Tyr Cys Gly
3650		3655		3660
Cys Met	Arg Arg Leu Ala	Val Asn Arg Ser Pro	Val	Ala Met Thr
3665		3670		3675
Arg Ser	Val Glu Val His	Gly Ala Val Gly Ala	Ser	Gly Cys Pro
3680		3685		3690
Ala Ala				
3695				

5 <210>2
 <211>1811
 <212>PRT

<213>Homosapiens

<400>2

5

Met Glu Leu Thr Ser Arg Glu Arg Gly Arg Gly Gln Pro Leu Pro Trp
1 5 10 15

Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala
20 25 30

Gln Ala Pro Ala Pro Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr

35

40

45

Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg Leu Thr Ala
50 55 60

Val Ser Thr Cys Gly Leu Asp Gly His Val His Tyr Cys Ile Val Ser
65 70 75 80

His Leu Glu Asp Glu Cys Leu Cys Phe Leu Cys Asp Ser Arg Arg His
85 90 95

Glu Ser Ala Arg Asp Asn Pro His Ser His Arg Ile Glu Asn Val Val
100 105 110

Thr Ser Phe Ala Pro Glu Arg Arg Ala Ala Trp Trp Glu Ser Glu Asn
115 120 125

Gly Ile Pro Ala Val Thr Ile Glu Leu Asp Leu Glu Ala Glu Phe His
125 130 135 140

Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Cys Thr Phe Arg Trp Ala Ala Met
145 150 155 160

Leu Val His Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His Val Tyr Arg
165 170 175

Tyr Phe Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Thr Gly Val His Leu Ala
180 185 190

Pro Pro Arg His Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg Tyr Ser Glu
195 200 205

Ile Glu Pro Ser Thr Glu Arg Glu Val Ile Tyr Arg Val Leu Asp Pro
210 215 220

Ala Ile Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Glu Asn Ile Leu
225 230 235 240

Cys Ile Thr Asn Leu Arg Val Asp Leu Thr Arg Leu His Thr Leu Gly
245 250 255

Asp Asn Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr
260 265 270

Ala Leu Tyr Glu Leu Val Val Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His
275 280 285

Ala Ser Gly Cys Ala Pro Arg Pro Gly Arg Pro Arg His Arg Leu Tyr
 290 295 300

Met Val His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn
 305 310 315 320

Cys Glu Glu Cys Glu Asn Phe Tyr Arg Asn Leu Phe Trp Arg Phe Ala
 325 330 335

Glu Asn Gly His Ser His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys His Gly His
 340 345 350

Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn
 355 360 365

Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Glu His Asn Thr Ala Gly Arg
 370 375 380

His Cys Glu Leu Cys Arg Phe Phe Phe Tyr Arg Asp Phe Thr Lys Asp
 385 390 395 400

Leu Arg Arg Arg Ala Val Cys Arg Ser Cys Arg Cys Arg Phe Met Gly
 405 410 415

Ser Glu Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Phe Ala Leu Gly
 420 425 430

Leu Val Ser Gly Glu Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg
 435 440 445

Cys Glu Glu Cys Arg Asn Asn Gly Phe Phe Gly Leu Ser Leu Ser Asp Arg
 450 455 460

Leu Gly Cys Arg Arg Cys Glu Cys Asn Ala Arg Gly His Val Phe Gly
 465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Asn Phe Asn Ser Gly Ser Cys Lys Cys Cys Arg Leu
 485 490 495

Val Thr Gly Arg Gly Cys Asn Arg Cys Leu Phe Tyr His Trp Lys Leu
 500 505 510

Ser His Arg Leu Leu Gly Cys Arg Phe Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly
 515 520 525

Ala Leu Arg Arg Glu Cys Asp Glu Gly Thr Gly Glu Lys His Lys Arg
 530 535 540

Glu Phe Met Val Gly Arg Arg Lys Glu Glu Val Glu Pro Gly Ty Phe
 541 550 559

Arg Phe Phe Leu Arg His Leu Ile Arg His Ala Glu Asp His Arg Gly
 561 570 579

Glu Val Leu Asp Val Val Glu Arg Leu Val Thr Pro Gly Ile Thr Trp
 580 589 598

Ser Trp Thr Gly Ser Gly Phe Val Ala Leu Phe Glu Gly Phe Thr Leu
 609 618 627

Glu Phe Leu Val Ala Ser Val Phe Lys Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu
 630 639 648

Leu Arg Leu Glu Phe Glu Val Phe Glu Glu Thr Ala Glu Leu Glu Leu
 655 664 673

Ile Val Glu Ala Phe Gly Phe Val Phe Ala His Ser Leu Lys Gly His
 680 689 698

Leu Val Phe Lys Asp Arg Arg Ile Glu Gly His Leu Glu Phe His Ala
 701 710 719

Arg Tyr Leu Ile Phe Pro Asp Phe Val Cys Leu Glu Thr Gly Ile Ser
 725 734 743

Tyr Lys Leu His Leu Lys Leu Val Arg Thr Gly Gly Ser Ala Glu Phe
 750 759 768

Glu Thr Phe Tyr Ser Gly Thr Lys Leu Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu
 775 784 793

Leu Phe Arg Val Leu Val Leu Phe Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala
 800 809 818

Ala Leu Glu Arg Glu Ala Thr Phe Glu Arg Lys Glu Cys His Glu Glu
 821 830 839

Gly Leu Val Thr Ser Lys Thr Ser Pro Ser Ile Ala Cys Asn Pro Leu
 845 854 863

Leu Ile Ser Leu Ser Thr Leu Ile Lys Asn Gly Ala Leu Phe Cys Glu
 870 879 888

Cys Asn Phe Glu Lys Ser Leu Ser Ser His Lys Asp Arg His Gly Gly
 895 904 913

Gln Cys Leu Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Leu Cys
805 810 815

Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Thr Gly Cys Gln Ala Cys Gln
820 825 830

Cys Ser His Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Gln Lys Thr Ser Gly
835 840 845

Gln Cys Leu Cys Arg Thr Gly Ala Thr Gly Leu Arg Cys Asn Arg Cys
850 855 860

Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Ser Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn
865 870 875 880

Gly His Ala Asp Glu Cys Asn Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys
885 890 895

Arg Asp His Thr Gly Gly Ser His Cys Glu Arg Lys Ile Ala Gly Phe
900 905 910

His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro
915 920 925

Cys Pro Gln Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His
930 935 940

Gln Asp Gln Tyr Ser Gln Ser Ile Val Cys His Lys Arg Ala Gly Tyr
945 950 955 960

Pro Gly Leu Arg Cys Gln Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Val
965 970 975

Ser Arg Thr Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Gln Cys Ser Gly Asn Ile
980 985 990

Asn Pro Met Asp Pro Asn Ala Cys Asn Pro His Thr Gly Gln Cys Leu
995 1000 1005

Arg Cys Leu His His Thr Gly Gly Thr His Cys Ala His Cys Lys
1010 1015 1020

Phe Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys
1025 1030 1035

Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asn Pro Gln Gln Cys Pro Ser Phe

1047	1048	1049
Asp Glu Cys His Cys Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys Phe Cys Leu 1055 1060 1065		
Pro Asn Val Glu Gly Pro Ser Cys Asn Arg Cys Ala Pro Asn Thr 1070 1075 1080		
Arg Asn Leu His Ser Gly His Gly Cys Glu Pro Cys Ala Cys His 1085 1090 1095		
Phe Ser Arg Ala Arg Gly Phe Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly Glu 1100 1105 1110		
Cys His Cys Arg Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu Cys 1115 1120 1125		
Glu Glu Leu His Trp Gly Asp Pro Gly Leu Glu Cys His Ala Cys 1130 1135 1140		
Asp Cys Asp Ser Arg Gly His Asp Thr Pro His Cys His Arg Thr 1145 1150 1155		
Thr Gly His Cys Ser Cys Arg Pro Gly Val Ser Gly Val Arg Cys 1160 1165 1170		
Asp Glu Cys Ala Arg Gly Phe Ser Gly His Phe Phe Ala Cys His 1175 1180 1185		
Pro Cys His Ala Cys Phe Gly Asp Trp Asp Arg Val Val Glu Asp 1190 1195 1200		
Leu Ala Ala Arg Thr Glu Arg Leu Glu Glu Arg Ala Glu Glu Leu 1205 1210 1215		
Glu Glu Thr Gly Val Leu Gly Ala Thr Glu Ser Ser Thr Trp His 1220 1225 1230		
Met Glu Glu Lys Leu Gly His Val Glu Gly His Val Gly Ala Arg 1235 1240 1245		
Arg Thr Ser Ala Ala Ser Thr Ala Glu Leu Val Glu Ala Thr Glu 1250 1255 1260		
Glu Leu Arg Arg Glu Thr Gly Glu Ala Thr Glu His Leu Thr Glu 1265 1270 1275		

Leu Glu Ala Asp Leu Thr Asp Val Ser Asp Glu Asn Thr Asn Ala
 1280 1281 1282

Asn His Ala Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Arg Leu Ala Leu Asn
 1285 1286 1287

Leu Thr Leu Arg Glu Leu Asp Glu His Leu Asp Leu Leu Lys His
 1290 1291 1292

Ser Asn Phe Leu Gly Ala Lys Asp Ser Ala Arg His Ala His Ser
 1295 1296 1297

Glu Ser Ala Glu Val Glu Arg Arg Ala Asn His Ser Ala Leu Ala
 1300 1301 1302

Val Phe Ser Phe Val Ser Asn Ser Ala Ser Ala Arg Ala Arg Thr
 1305 1306 1307

Glu Ala Leu Met Asp Ala Glu Lys Glu Asp Phe Asn Ser Lys Ser
 1310 1311 1312

Met Asn Asn Glu Arg Ala Leu Lys Lys Leu Ser Ala His Thr His
 1315 1316 1317

Thr Leu Ser Leu Thr Asp Ala Asn Glu Leu Val Asn Gly Ala Thr
 1320 1321 1322

Gly Asn Ala Phe Lys Ala His Ser Phe Lys Gly Gly Ala Gly Lys
 1325 1326 1327

Arg Asn Glu Asp Gly Ser Phe Arg Lys Gly Gly Leu Ser Gly Ser
 1330 1331 1332

Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Leu Gly Arg Ala Arg His
 1335 1336 1337

Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Ala Leu Ala Ser Gly Ser Thr
 1340 1341 1342

Leu Ser Arg Val Ala Glu Thr Arg Arg Ser Ala Ser Glu Ala Glu
 1345 1346 1347

Glu Arg Ala Glu Ala Ala Leu Asp Lys Ala Ser Ala Ser Arg Gly
 1350 1351 1352

Glu Val Glu Glu Ala Asn Ser Glu Leu Ser Ser Leu Thr Glu Ser
 1355 1356 1357

Val	Lys	Arg	Pro	Leu	Ala	Glu	Gln	Gly	Ala	Arg	Pro	Arg	Ser	Ala	1520
1520						1525					1530				
Glu	Met	Val	Ala	Thr	Arg	Val	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	Pro	Ala	Ser	1540
1535						1540					1545				
Ala	Glu	Gln	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Gln	Arg	Val	1550
1540						1545					1550				
Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	Gly	1555
1555						1560					1565				
Asp	Val	Arg	Arg	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Ile	Asp	Asp	Arg	Arg	Asp	1560
1560						1565					1570				
Arg	Ser	Thr	Ala	Glu	Asp	Gln	Lys	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Val	Glu	1565
1565						1570					1575				
Ala	Ala	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	1570
1570						1575					1580				
Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Val	Ala	Asp	Thr	Arg	Asp	Thr	Gln	Gln	Thr	1575
1575						1580					1585				
Leu	Tyr	Gln	Val	Gln	Gln	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Gln	Arg	Ala	Leu	1580
1580						1585					1590				
Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Ala	Arg	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	1585
1585						1590					1595				
Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Arg	Ala	Gln	Asn	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr	1590
1590						1595					1600				
Ala	Gln	Gln	Thr	Ala	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	Gln	Gln	Ala	1595
1595						1600					1605				
Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Thr	Val	1600
1600						1605					1610				
Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Arg	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Gln	1605
1605						1610					1615				
Ala	Arg	Ala	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Ile	1610
1610						1615					1620				
Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Ser	Gln	Arg	Leu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gly	Thr	1615
1615						1620					1625				

Tyr	Glu	Glu	Asn	Glu	Arg	Ala	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Ala	Gln	Leu
1760						1765					1770			

Asp	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Met	Arg	Ser	Val	Leu	Gln	Ala	Ile	Asn
1775						1780					1785			

Leu	Gln	Val	Gln	Ile	Tyr	Asn	Thr	Cys	Gln	Lys	Ser	Ser	Trp	Pro
1790						1795					1800			

Gly	Arg	Ala	Pro	Asn	Lys	Pro	Val
1805						1810	

<210>3

<211>1609

<212>PRT

5 <213>Homosapiens

<400>3

Met Arg Gly Ser His Arg Ala Ala Pro Ala Leu Arg Pro Arg Gly Arg
5 5

Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys
20 25 30

Ala Gln Ala Ala Met Asp Gln Cys Thr Asp Gln Gly Gly Arg Pro Gln
35 40 45

Arg Cys Met Pro Gln Phe Val Asp Ala Ala Phe Asp Val Gln Val Val
50 55 60

Ala Gln Asp Gln Cys Gly Gln Pro Pro Gln Gln Tyr Cys Val Gln Thr
65 70 75 80

Gly Val Gln Gly Val Gln Lys Ser Cys His Leu Cys Asn Ala Gly Gln
85 90 95

Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Cys Asn Asn Gln
100 105 110

Ala Arg Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln
115 120 125

Cys Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp
130 135 140

Ile Gln Tyr Val Arg Leu Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Gln Ser Phe
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Arg His Arg Val Asp Gly Pro Thr Leu Pro Tyr Cln
 185 190 195

Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Glu Asn Thr Tyr Ser Lys Ala Asn Arg Gly
 190 195

Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Ser Glu Glu Ala Leu Tyr Thr Arg Glu
 200 205

Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr
 210 215 220

Leu Glu Gly Arg Ser Ser Ala Cys Asn Ser Asp Asn Ser Pro Val Leu
 225 230 235 240

Cln Glu Arg Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Thr Leu Asn Arg Leu
 245 250

Asn Thr Phe Gly Asn Cln Val Phe Asn Asp Pro Lys Val Leu Lys Ser
 260 265 270

Tyr Tyr Tyr Ala Ile Ser Asn Phe Ala Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys
 275 280 285

Asn Gly His Ala Ser Cln Cys Met Lys Asn Cln Phe Asp Lys Leu Val
 290 295 300

Cys Asn Cys Lys His Asn Thr Tyr Gly Val Asp Cys Glu Lys Cys Ser
 305 310 315 320

Pro Phe Phe Asn Asp Arg Pro Trp Arg Arg Ala Thr Ala Glu Ser Ala
 325 330 335

Ser Glu Cys Leu Ser Cys Asp Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Glu Cys Tyr
 340 345 350

Phe Arg Pro Glu Leu Tyr Arg Ser Thr Gly His Gly Lys His Cys Thr
 355 360 365

Asn Cys Glu Asp Asn Thr Asp Gly Ala His Cys Glu Arg Cys Arg Glu
 370 375 380

Asn Lys Phe Arg Leu Cln Asn Asn Cln Ala Lys Ser Ser Cys His Lys
 385 390 395 400

Ser Leu Val Gly Ser Leu Ser Ser Cln Cys Asp Ser Tyr Gly Arg Cys

405

410

415

Asp Cys Lys Pro Gly Val Met Gly Asp Lys Cys Asp Arg Cys Glu His
410 425 430

Gly Phe His Ser Leu Thr Glu Ala Gly Cys Arg Pro Lys Ser Cys Arg
435 440 445

Pro Ser Gly Ser Ile Asp Glu Cys Asn Ile Glu Thr Gly Arg Cys Val
450 455 460

Cys Lys Asp Asn Val Glu Gly Phe Asn Cys Glu Arg Cys Lys Pro Gly
465 470 475 480

Phe Phe Asn Leu Glu Ser Ser Asn Pro Arg Gly Cys Thr Pro Cys Pro
485 490 495

Cys Phe Gly His Ser Ser Val Cys Thr Asn Ala Val Gly Tyr Ser Val
500 505 510

Tyr Ser Ile Ser Ser Thr Phe Glu Ile Asn Glu Asp Gly Trp Arg Ala
515 520 525

Glu Glu Arg Asp Gly Ser Glu Ala Ser Leu Glu Trp Ser Ser Glu Arg
530 535 540

Glu Asp Ile Ala Val Ile Ser Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Tyr Phe Ile
545 550 555 560

Ala Pro Ala Lys Phe Leu Gly Lys Glu Val Leu Ser Tyr Gly Glu Asn
565 570 575

Leu Ser Phe Ser Phe Arg Val Asp Arg Arg Asp Thr Arg Leu Ser Ala
580 585 590

Glu Asp Leu Val Leu Glu Gly Ala Gly Leu Arg Val Ser Val Pro Leu
595 600 605

Ile Ala Glu Gly Ser Ser Tyr Pro Ser Glu Ser Thr Val Leu Tyr Val
610 615 620

Phe Arg Leu His Glu Ala Thr Asp Tyr Pro Trp Arg His Ala Leu Thr
625 630 635 640

Pro Phe Glu Phe Glu Lys Leu Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Lys Ile
645 650 655 660

Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Arg Ser Ala Gly Tyr Leu Asp Asp Val Thr
 660 665 670

Leu Ala Ser Ala Arg Pro Gly Ser Gly Val Pro Ala Thr Trp Val Glu
 675 680 685

Ser Cys Thr Cys Pro Val Gly Tyr Gly Gly Gly Glu Phe Cys Glu Met Cys
 690 695 700

Leu Ser Gly Tyr Arg Arg Glu Thr Pro Asn Leu Gly Pro Tyr Ser Pro
 705 710 715 720

Cys Val Leu Cys Ala Iva Asp Gly His Ser Glu Thr Iva Asp Pro Val
 721 730 735

Thr Gly Val Cys Asn Tyr Arg Asp Asn Thr Ala Gly Pro His Cys Glu
 740 745 750

ys Cys Ser Asn Gly Thr Tyr Gly Asp Ser Thr Ala Gly Thr Ser Ser
 755 760 765

Asp Cys Glu Pro Cys Pro Cys Ser Gly Gly Ser Ser Cys Ala Val Val
 770 775 780

Pro Cys Thr Tyr Glu Val Val Cys Thr Asp Cys Pro Thr Gly Thr Thr
 785 790 795 800

Gly Lys Arg Cys Glu Leu Cys Arg Asp Gly Tyr Phe Gly Asp Pro Leu
 805 810 815

Gly Arg Asn Gly Pro Val Arg Leu Cys Arg Leu Cys Glu Cys Ser Asp
 820 825 830

Asn Thr Asp Pro Asn Ala Val Gly Asn Cys Asn Arg Leu Thr Gly Thr
 835 840 845

Cys Leu Lys Cys Ile Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Tyr Cys Asp Arg Tyr
 850 855 860

ys Asp Gly Phe Phe Gly Asp Thr Leu Ala Thr Asn Pro Ala Asn Lys
 865 870 875 880

Cys Lys Ala Cys Asn Cys Asn Leu Tyr Gly Thr Met Lys Glu Glu Ser
 885 890 895

Ser Lys Asn Thr Val Thr Gly Glu Cys Glu Cys Leu Pro Ser Val Thr
 900 905 910

Gly Glu Asp Cys Gly Ala Cys Arg Ser Gly Gln Tyr Asn Leu Glu Ser
925

Gly Glu Gly Cys Glu Arg Cys Asp Cys His Ala Leu Gly Ser Thr Asn
930

Gly Glu Cys Arg Ile Arg Ser Gly Glu Cys His Cys Glu Phe Gly Ile
935

Thr Gly Ser His Cys Glu Arg Cys Glu Val Asn His Phe Gly Phe Gly
940

Asn Glu Gly Cys Lys Phe Cys Asn Cys His Phe Glu Gly Ser Leu Ser
945

Leu Glu Cys Lys Asp Asp Gly Arg Cys Glu Cys Arg Glu Gly Phe Val
950

Gly Asn Arg Cys Asp Glu Cys Glu Glu Asn Tyr Gln Lys Arg Arg
955

Ser Thr Phe Gly Cys Ser Glu Cys Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Val
960

Lys Asp Lys Val Ala Asp Glu Arg Val Lys Leu Glu Glu Leu Glu
965

Ser Leu Phe Ala Asn Ser Gly Thr Gly Asp Glu Met Val Thr Asp
970

Glu Ala Phe Glu Asp Arg Leu Lys Glu Ala Glu Arg Glu Val Met
975

Asp Leu Leu Arg Glu Ala Glu Asp Val Lys Asp Val Asp Glu Asn
980

Leu Met Asp Arg Leu Thr Arg Val Asn Asp Thr Leu Ser Ser Glu
985

Ile Ser Arg Leu Glu Asn Ile Arg Asn Thr Ile Glu Glu Thr Gly
990

Asn Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala His Val Ile Asn Thr Thr Arg
995

Leu Ile Ser Ile Ala Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ala Lys Val Ala
1000

Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Phe	Gln	Ser	Thr	Gly	Arg	Phe	
1160							1165					1170			
Asn	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Ala	Gln	Gln	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Gln	
1175						1180					1185				
Arg	Phe	Lys	Gln	Gln	Ala	Asn	Asn	Ile	Val	Arg	Val	Ala	Lys	Phe	
1190						1195					1200				
Ala	Asn	Asp	Thr	Ser	Phe	Glu	Ala	Val	Asn	Leu	Ser	Leu	Arg	Phe	
1205						1210					1215				
Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Gln	Thr	Ala	Phe	Glu	Ile	Gln	Glu	Leu	Asn	
1220						1225					1230				
Arg	Lys	Tyr	Glu	Gln	Ala	Lys	Asn	Ile	Ser	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys	
1235						1240					1245				
Gln	Ala	Ala	Arg	Val	Ile	Glu	Gln	Ala	Lys	Arg	Ala	Gly	Asp	Lys	
1250						1255					1260				
Ala	Val	Gln	Ile	Tyr	Ala	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	
1265						1270					1275				
Ser	Gln	Ser	Leu	Gln	Asn	Gln	Ala	Asn	Asn	Ile	Lys	Met	Gln	Ala	
1280						1285					1290				
Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Gln	
1295						1300					1305				
Asp	Leu	Arg	Gln	Asn	Met	Arg	Gly	Lys	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Asn	
1310						1315					1320				
Leu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gln	Gln	Gln	Thr	Ala	Asp	Gln	Leu	
1325						1330					1335				
Leu	Ala	Arg	Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	
1340						1345					1350				
Tyr	Lys	Gly	Arg	Asn	Thr	Leu	Gln	Gln	Ala	Asn	Asp	Phe	Leu	Ser	
1355						1360					1365				
Asn	Leu	Lys	Asp	Phe	Asp	Arg	Arg	Val	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Ala	
1370						1375					1380				
Ala	Gln	Gln	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Phe	Ala	Ile	Asn	Gln	Thr	Ile	

1385		1390		1395
Thr Glu	Ala Asn Glu Lys	Thr	Arg Glu Ala Gln	Gln Ala Leu Gly
1400		1405		1410
Ser Ala	Ala Ala Asp Ala	Thr	Glu Ala Lys Asn	Lys Ala His Glu
1415		1420		1425
Ala Glu	Arg Ile Ala Ser	Ala	Val Glu Lys Asn	Ala Thr Ser Thr
1430		1435		1440
Lys Ala	Glu Ala Glu Arg	Thr	Pro Ala Glu Val	Thr Asp Leu Asp
1445		1450		1455
Asn Glu	Val Asn Asn Met	Leu	Lys Glu Leu Gln	Glu Ala Glu Lys
1460		1465		1470
Glu Leu	Lys Arg Lys Gln	Asp	Asp Ala Asp Gln	Asp Met Met Met
1475		1480		1485
Ala Gly	Met Ala Ser Gln	Ala	Ala Gln Glu Ala	Glu Ile Asn Ala
1490		1495		1500
Arg Lys	Ala Lys Asn Ser	Val	Thr Ser Leu Leu	Ser Ile Ile Asn
1505		1510		1515
Asp Leu	Leu Glu Gln Leu	Gly	Gln Leu Asp Thr	Val Asp Ser Asn
1520		1525		1530
Lys Leu	Asn Glu Ile Gln	Gly	Thr Leu Asn Lys	Ala Lys Asp Glu
1535		1540		1545
Met Lys	Val Ser Asp Leu	Asp	Arg Lys Val Ser	Asp Leu Glu Asn
1550		1555		1560
Glu Ala	Lys Lys Gln Gln	Ala	Ala Ile Met Asp	Tyr Asn Arg Asp
1565		1570		1575
Ile Glu	Glu Ile Met Lys	Asp	Ile Arg Asn Leu	Glu Asp Ile Arg
1580		1585		1590
Lys Thr	Leu Pro Ser Gly	Cys	Pro Asn Thr Pro	Ser Ile Glu Lys
1595		1600		1605

Pro

<210>4

<211>5518

<212>DNA

5 <213>Homosapiens

<400>4

atggagctga cctcaaggga aagaggagg ggacagcctc tgccttgga acttgactg	60
ggcctactgc taagcgtgct ggctgccaca ctggcacagg cccctgcccc ggatgtgccc	120
ggctgttcca ggggaagctg ctaccccgcc aaggggagac tgcctgtggg ccgagctgac	180
agactgaacg cctcctccac ttctggcctg catgcccccc agcctactcg catcgtccgt	240
ccccccagc agaaaacgaa atgcttccct ttctgctccc ggcgccccct cctctgctaga	300
gcacccccac accgcccctg cctccagcat atagtccccc gcttccacac acccagcccg	360
gcagcctggg ggcaatcaga gcatggatc cctggggcca ccttcagctt ggcaatggag	420
gctgagcttc atttcacaca cctcctatcg acatttcaga ccttcggccc tgcctgcccgt	480
ctggtaggac gctcagcaga ccttggcccg acctggatg tcttcagcta tctctcctat	540
gactylgggg cggaccccc aggagcccc ctacgcccc ccaggccatg ggalgalga	600
gctctgagtl cccgcccc ctgagatlgag ccccccactg aaggcgagtl catctatcg	660
gltctggacc cggcatalcc taccagagc ccccccagct ccaggatcca gaacclgltg	720
aagatcccca acctacgggt gaacctgact cgtctacaca cgttgggaga caacctactc	780
gaaccaaggc gggagatccg agagaagta tactatgccc tctatgagct ggttgtacgt	840
ggcaactgct tctgctacgg acacgcctca gagtgtgac ccgccccagg ggcaccagcc	900
cctgctgaag cctgctgaca cggccttacc ctatccacac accccccacc tgcctccacc	960
tcggagcact gtcaggcttc ctatcctaac ctgcctgac gtcaggctgc ggcggcccc	1020
actcctgact gtcaggctgc tgcctgccc ggcgcccccc accgctgccc cctcgacatg	1080
ggcgtatcac tggcgtctgg ccatgtgagc ggagtgtagt gtcgtggatg tcaggtatcac	1140
acagctgggc ggcagtgtga gctctgccc cctctctctt accgtgccc acccagggac	1200
ctggggggac ggctgtgtgt cggctcctgt gctgtgagc cctgtggctc tcagagcggc	1260
ggctgctg-g accccatga tgaacccga ctgggacgg cctccggcca g-gtctgctg	1320
aaagaacag tggtyggac tggctgccc caaaggcgt atgcttctt tgggcccc	1380
atcagtgacc gcttgggcty cggcgatgtl caaaglaatg ccaggggac agtgcttggg	1440
agcactcctt ggcaccccaa cagtggatcc tgttactgca aaagtctagt gactggacgt	1500
ggatgtgacc gctgctgccc tggccactgg ggctgagcc acgacctgct cggctgcgc	1560
ccctgtgact ggcagctggg tggctccttg gatccccagt gtgatgaggg cacaggtcaa	1620
ccccactgac ggcagcccat ggttgggcca cctatgagc aagtgcacac tgcctacttc	1680
ccgccttccc tgcaccccc aatttggag actgagaca ccgagagcc gctactcact	1740

aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 500
 aggggaggg aggggaggg aggggaggg aggggaggg aggggaggg aggggaggg 1000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 1500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 2000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 2500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 3000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 3500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 4000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 4500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 5000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 5500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 6000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 6500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 7000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 7500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 8000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 8500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 9000
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 9500
 aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa aatgaagaa 10000

115

<210>5

<211>11426

<212>DNA

<213>Homosapiens

5

<400>5

10

15

20

agaaacccag ggacccccc ccccccggcg tccctcgagg tccggggaagc ggcocggpagc	60
cgggaagatg ggaagccgc tctggcgccg pagccacac tctgttcgag gcccccgggg	120
ccccccagag ctctactaa tccacttgc tctactagc gacacccagc ccccccagaa	180
ggcagagaaa gacttcagct tctacccgc cctctcaac ctgcacagc ggcocagact	240
ccccccctcc agcccccgc ccccccagc ccccccagc ggcocccgc ccccccagaa	300
ggagctctac tctcagctg tgggggagc tctggccgag ggcagacaa tctcagct	360
cggggagagc tctctgagc tctggagagc tgcacacagc cactcagagc tctcagctg	420
ccctgccttc gtcgggagc aggcctgagc ggcagctcac cagctgagc cgggcttgc	480
gtacaaagag gtcacagaa cctgggact gggcagggc tctcagctg ctcagctcct	540
caacagcttc gtcacacac cccggcgga tctcgggag tgggagggc ctcagctcct	600
ggggcgagc tctcagctc ggcagcttc tgcacacac cagagggat tctcgggag	660
gttcgggaga cagaagcgg aggcctcac cggggaagac ggcgcatt tgcacacaga	720
gtactcagc atcctgcac tggagaaagc agcagacgc gctctcctg tgaagggag	780
tccgggggac atgaattct cctactgac gctgcacg cagttcaca aggcacaca	840
cgcacagctc gacttcac cctacacac gctactagc cactcctag ggcacagct	900
ccccacacac cacttcac cccactaca ctacacac cccactaca cactcagct	960
cactcagct tcccagct ccccccagc cctcctgac ccccccagc ccccccagct	1020
cagcttgcg tccacagc ccccccagc ccccccagc cactcagct cactcagct	1080
cagcttgcg ccccccagc ccccccagc cactcagct cactcagct cactcagct	1140
cagcttgcg tccacagc ccccccagc ccccccagc cactcagct cactcagct	1200
cagcttgcg cagcttgcg cactcagct cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1260
cactcagct cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1320
cactcagct cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1380
cactcagct cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1440
cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1500
cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1560
cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1620
cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg cagcttgcg	1680

aaqqqaaana aqqqaaqnaa naaaqaaqaa ataaqaaqaa taqaaqaaqaa	3600
naaaqaaqaa aqaaqaaqaa naaaqaaqaa taqaaqaaqaa ataaqaaqaaqaa taqaaqaaqaa	3660
qhtqhtqggag aqaa qggta qhtqhtqgg aqaa qgg qhtqhtqgg aqaa qgg	3720
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	3780
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	3840
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	3900
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	3960
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4020
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4080
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4140
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4200
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4260
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4320
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4380
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4440
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4500
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4560
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4620
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4680
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4740
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4800
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4860
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4920
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	4980
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5040
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5100
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5160
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5220
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5280
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5340
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5400
aaqatataaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa	5460

[illegible]

atqqaqaqaa ataatatqat atqqaqaqaa ataatatqat atqqaqaqaa ataatatqat	60
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	120
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	180
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	240
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	300
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	360
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	420
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	480
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	540
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	600
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	660
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	720
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	780
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	840
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	900
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	960
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1020
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1080
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1140
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1200
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1260
atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa atqqaqaqaa	1320

ggaatccatag ggaatgata ggggataag caaatgggt ggggcaag. aggtgggggt 5160
 agagcaagta ggaatcccc gtaataaga caaatgaga aatccatag aatagtaat 5220
 atttttcta ggaagaaaa atttgcata caaatagg atttcaac ccagtatat 5280
 aatcaatagg aaaaaaaa tgaattatga aatcaaaa atttcaaaa aatcaaaa 5340
 gaattcaaaa aatcaaaa tgggttttgg aatcaaaa tgaatggaga aatcaaaa 5400
 tgaattatgt aatcaaaa gtaaggaat ggaatgaat tgggttttga tgaattat 5460
 tatcaaatg aataggaga ataggatga gaaatata gtaataaa aatgatat 5520
 aatcaaatg aatcaaaa atttttca aatcaaat ttaataaa aatcaaat 5580
 taatcaaat aatcaaaa aatcaaat. gaaatata tatcaaat aatcaaat 5640
 aatcaaatg aatcaaaa aatcaaaa aatcaaaa aatcaaaa aatcaaaa 5700
 gattttatgt aatcaaaa tgggttttgg aatcaaaa tgaatggaga aatcaaaa 5760
 aatcaaatg aatcaaaa aatcaaaa aatcaaatg aatcaaat aatcaaat 5820
 ggaatcaaa aataggaga ggttttga aatcaaaa ggttttga aatcaaaa 5880
 gtttcaaga agagataat gaaataga aatcaaaa ttaataaa aatcaaaa 5940
 agaatcaaa aaaaaaaa gtttcaaaa aatggggga aatcaaaa aatcaaat 6000
 taatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg atttcaaat aatcaaat 6060
 ttaatcaaaa aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6120
 ttaatcaaaa aatcaaatg ttaatcaaaa aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6180
 ttaatcaaaa aatcaaatg ttaatcaaaa aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6240
 atttcaaga ggaagggga gggggggga aatcaaat tatcaaat aatcaaat 6300
 ttaatcaaaa aatcaaaa ttttcaaaa aatcaaatg atttcaaaa aatcaaat 6360
 aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6420
 ttaatcaaaa aatcaaaa aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6480
 ggaatcaaaa ggaatcaaaa aatcaaatg ggaatcaaaa aatcaaatg aatcaaat 6540
 tatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6600
 tatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6660
 ggaatcaaaa ggaatcaaaa aatcaaatg ggaatcaaaa aatcaaatg aatcaaat 6720
 tatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6780
 aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6840
 aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6900
 aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 6960
 aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaatg aatcaaat 7020

tggcgtgctg ttgcaaagt ttacagtcac tgtttctgg ctagttcatt ccattaagtg	7080
gtacatcct aacatagca ttgggtcaag gtgcagaag aggaactgaag attgaactgcc	7140
aagctagttt gggtagaagt cactccagca agctccagga cacaatgggg tgggttggt	7200
tggtttctt ctactttct tttgtatc tcttttctc ctcccccct ataggtatct	7260
tttccagcg actttctct tttaaacta aggtttctt ccacatgct accttctc	7320
cactccagca acacagccat tattttctt tctccccc attatctga ttttatgtac	7380
tgttaattgac aggaaggcg atgagagtg ctggttgaca cagggaatat tttactgca	7440
ttttctctg aatttttct ctttgaattt caactggga ctttttat atgtgtttac	7500
tttagctgtt agcttctac tctatagct tctctctgg ggtggttaac aaaaagcac	7560
actggcatt tttagttt aagaaaaa gtttttatt tataataaa ctgaataat	7620
tgtaacctt ca	7682

5 <210>7

<211> 24

<212>DNA

<213>ArtificialSequence

10 <220>

<223>primer

<400>7

gtggtacccacaggcagagttgac 24

15

<210>8

<211> 26

<212>DNA

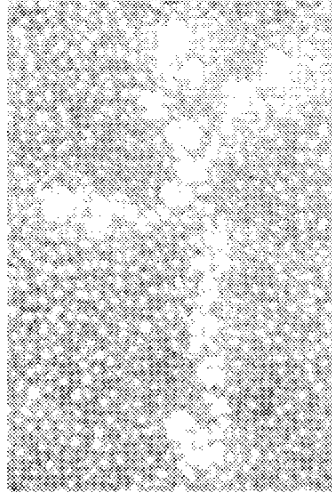
<213>ArtificialSequence

<220>

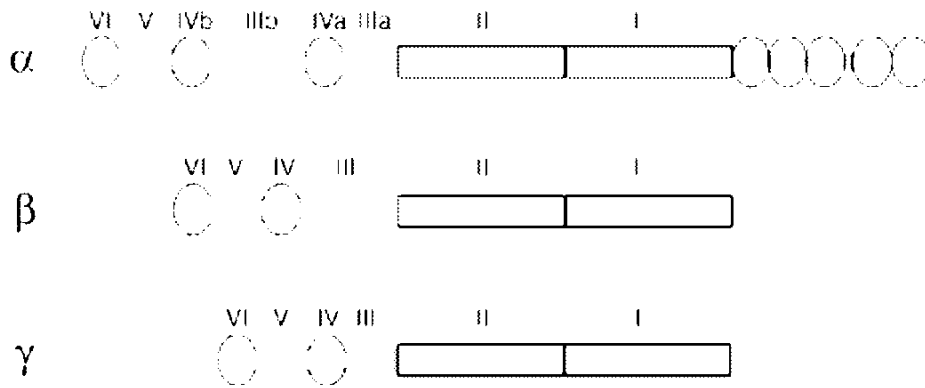
<223>primer

5 <400>8

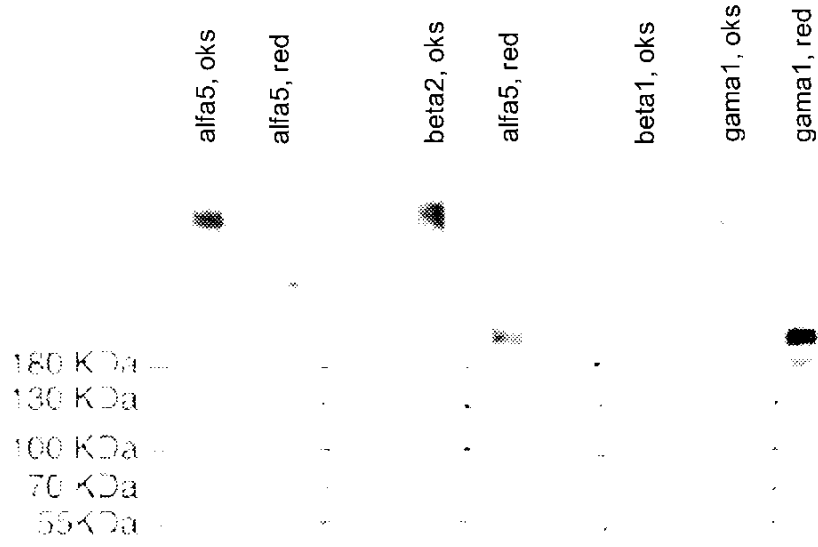
gctctagagctcttcagtgcataggc 26



ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3

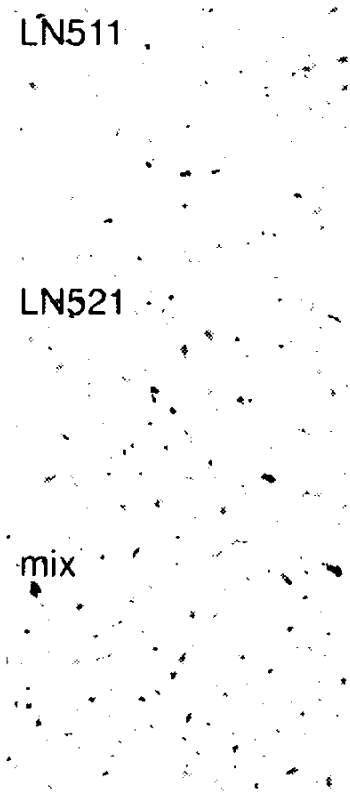
Mg

mLN111

LN511

LN521

mix



ŞEKİL 4

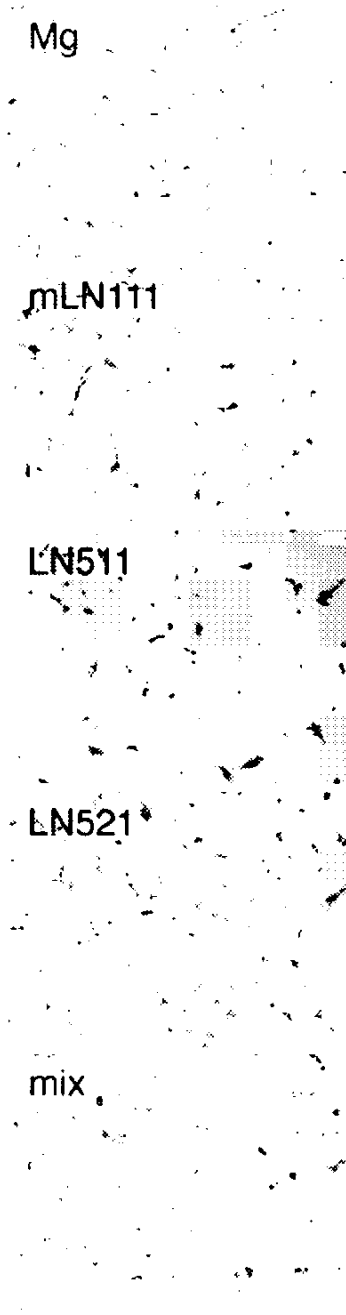
Mg

mLN111

LN511

LN521

mix

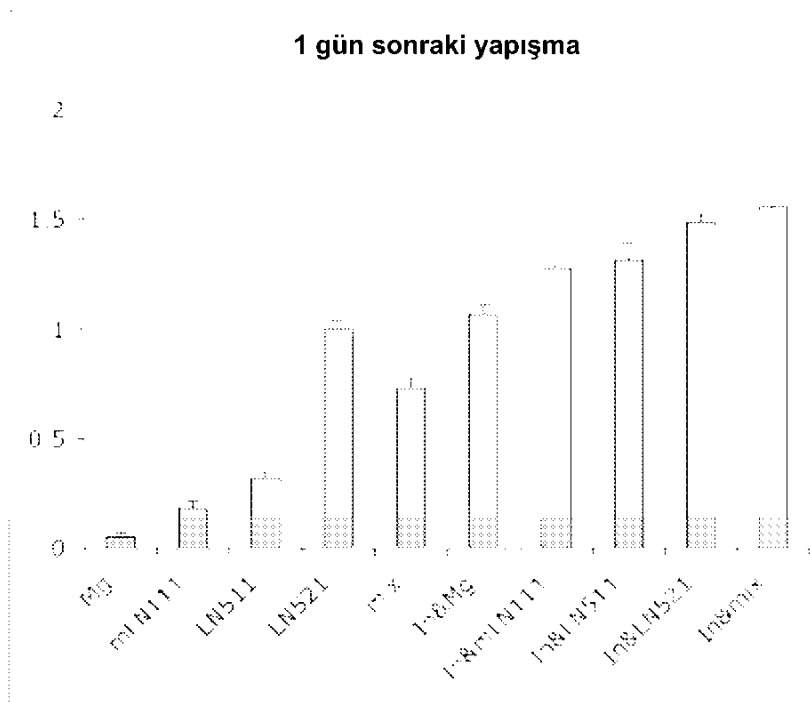


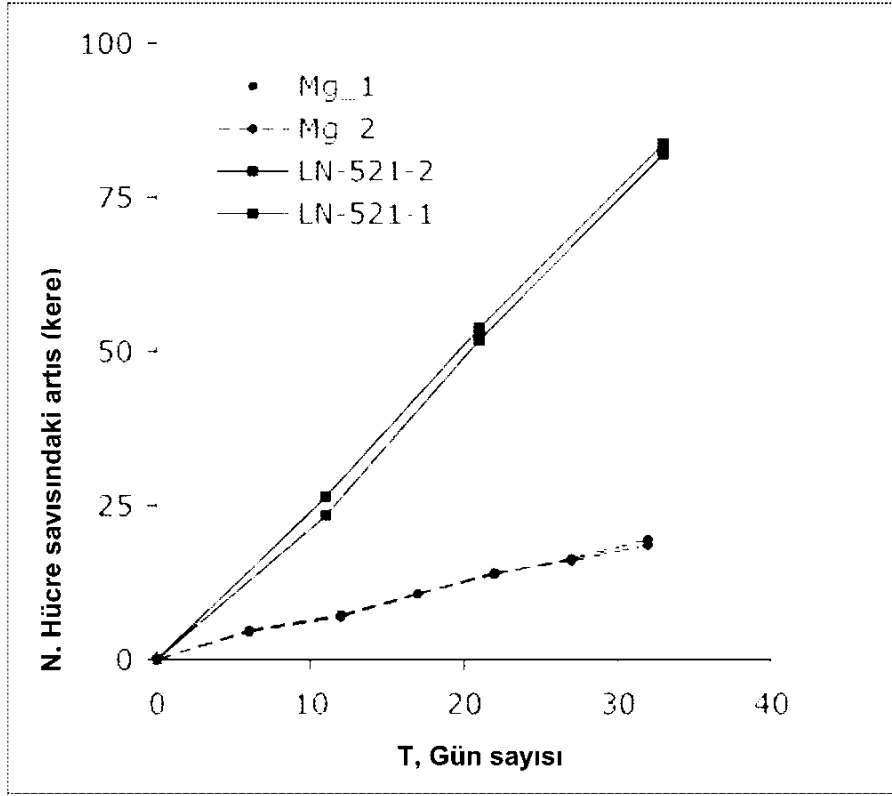
ŞEKİL 5

ŞEKİL 6

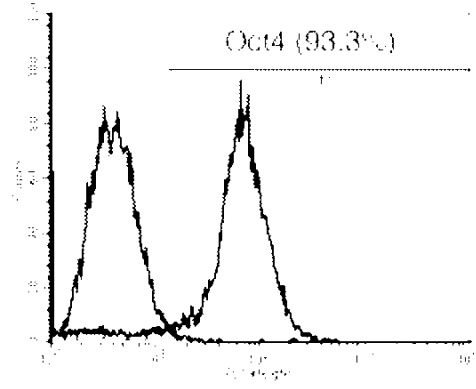


ŞEKİL 7

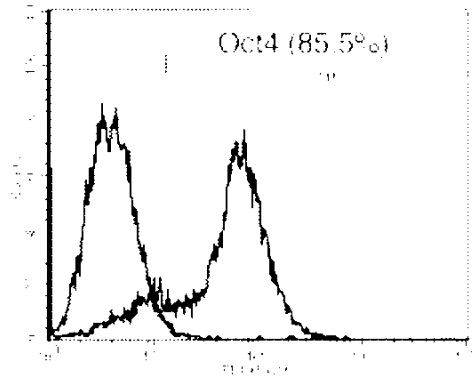




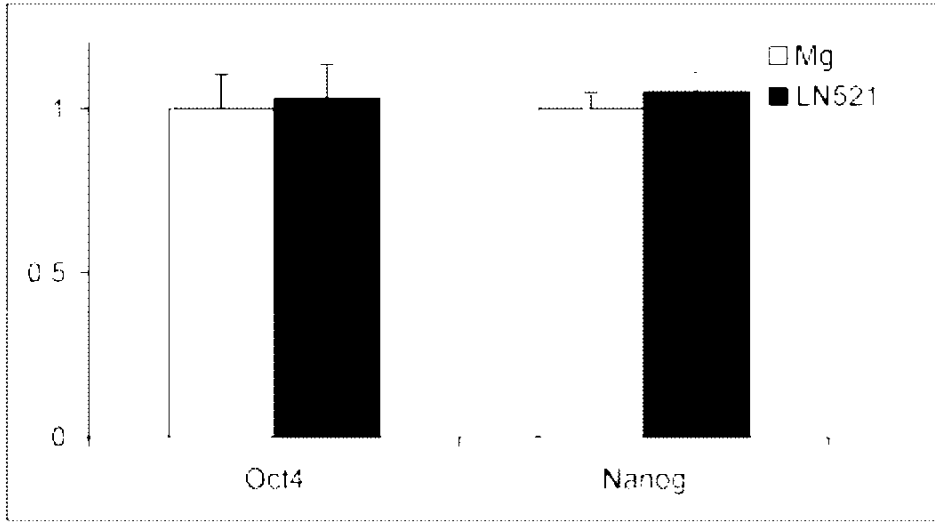
ŞEKİL 8

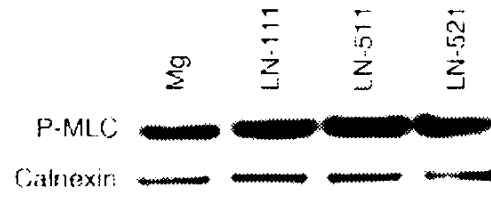


ŞEKİL 9

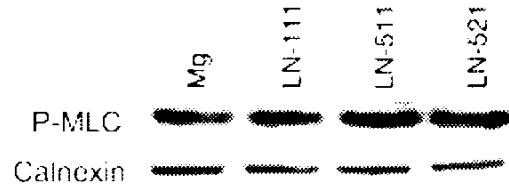


ŞEKİL 10

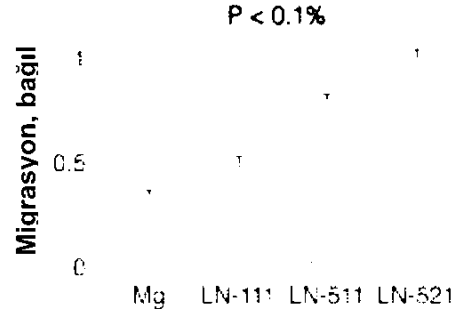
**ŞEKİL 11**



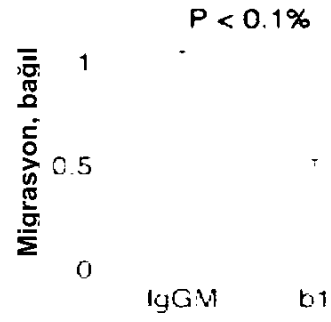
ŞEKİL 12



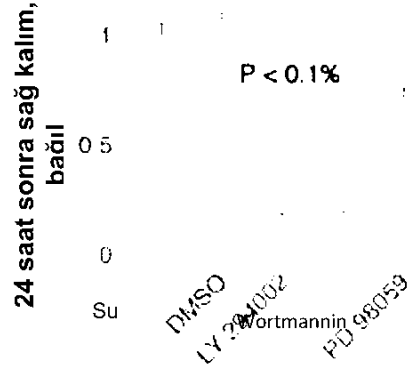
ŞEKİL 13



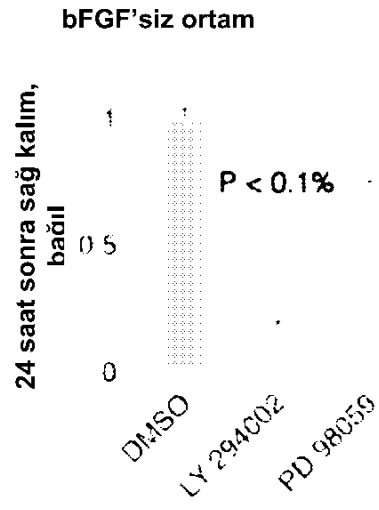
ŞEKİL 14



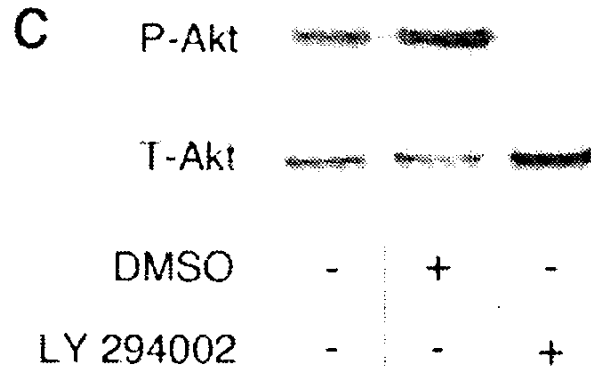
ŞEKİL 15



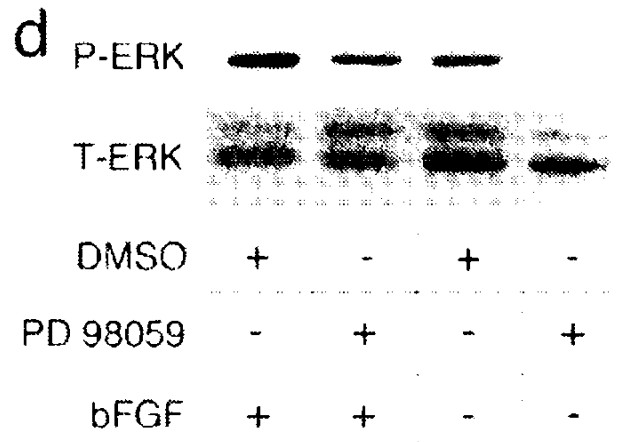
ŞEKİL 16



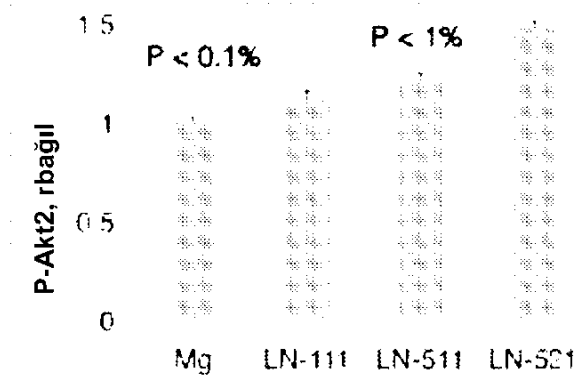
ŞEKİL 17



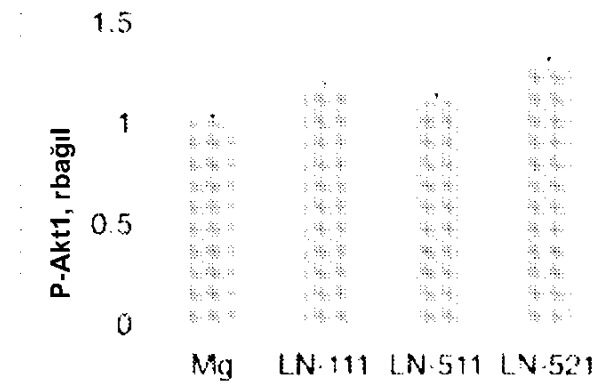
ŞEKİL 18



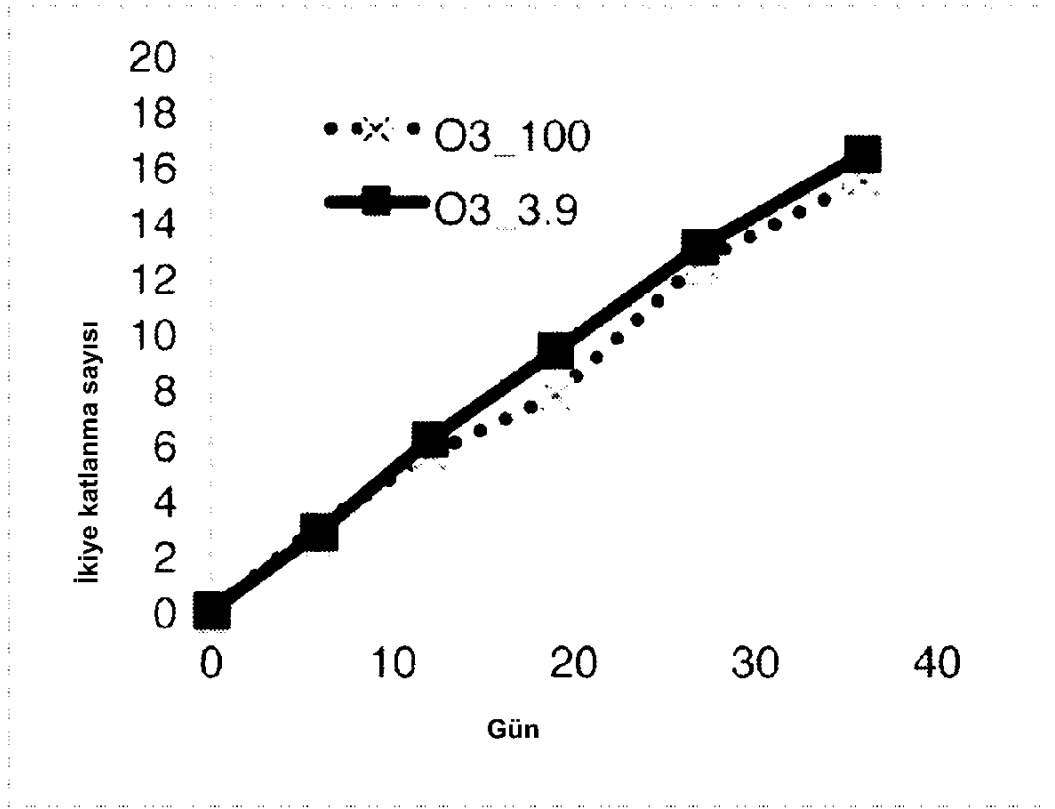
ŞEKİL 19



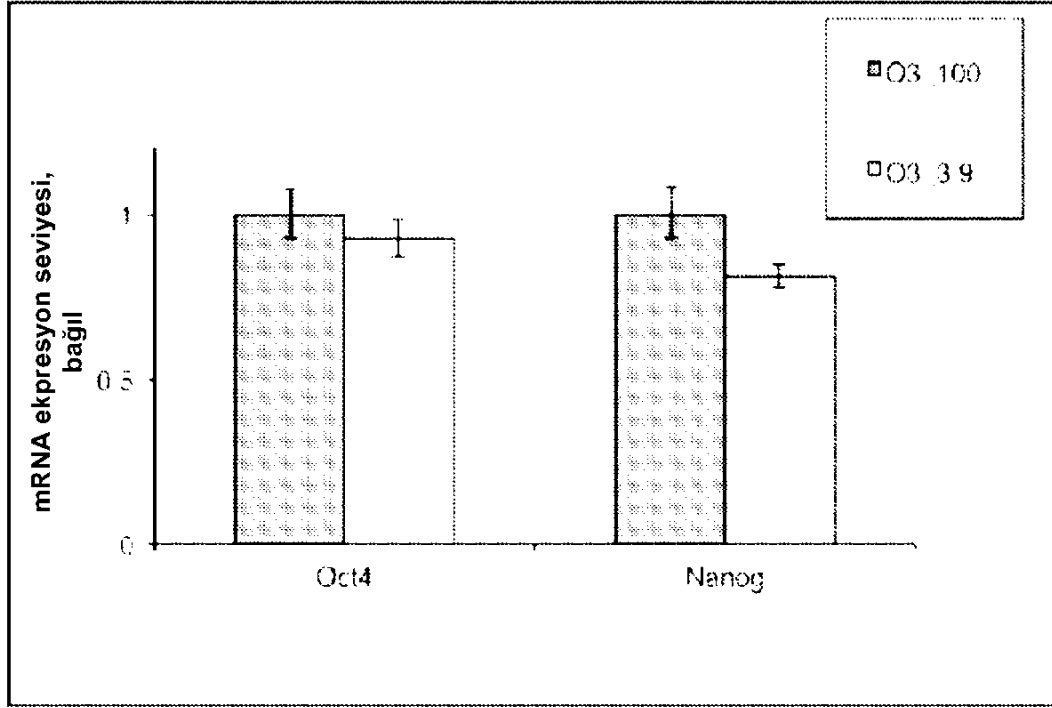
ŞEKİL 20



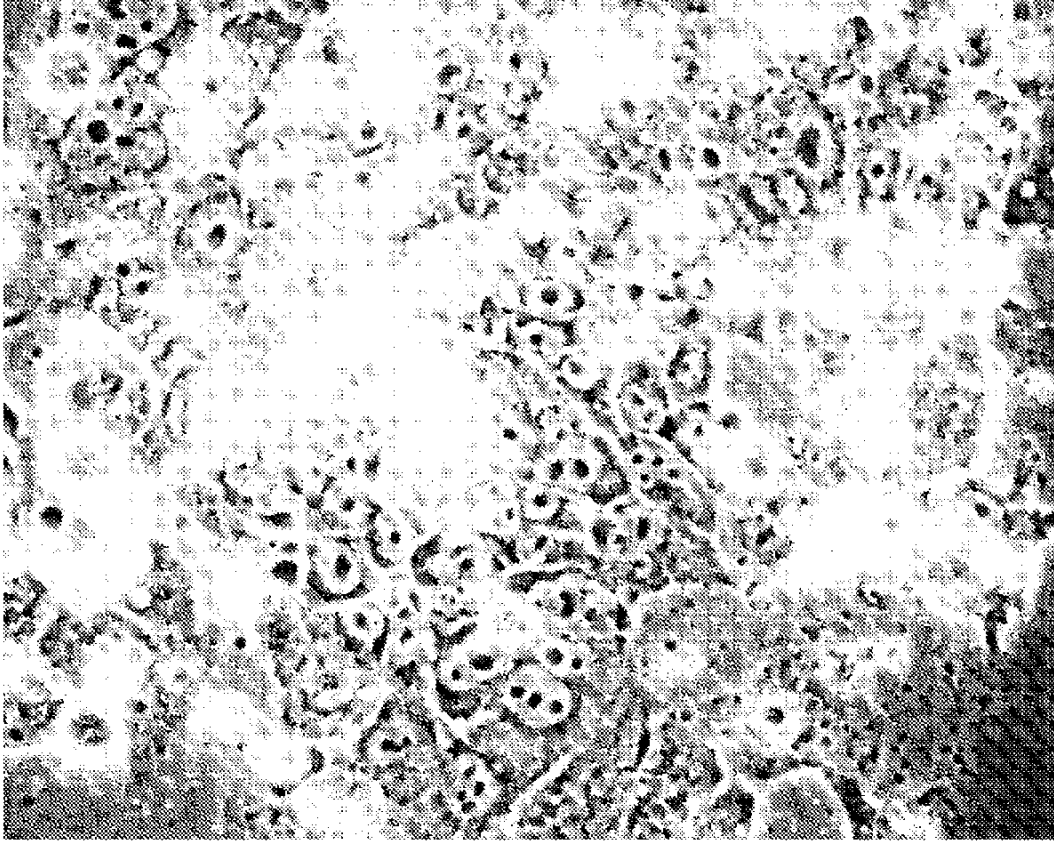
ŞEKİL 21



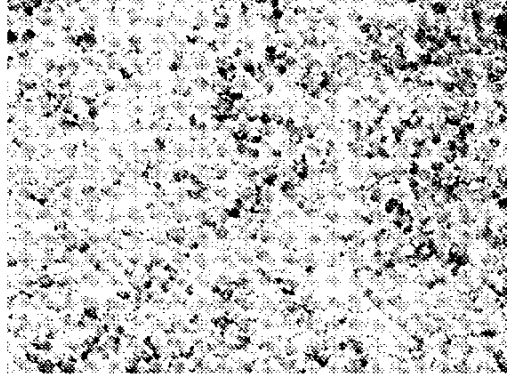
ŞEKİL 22



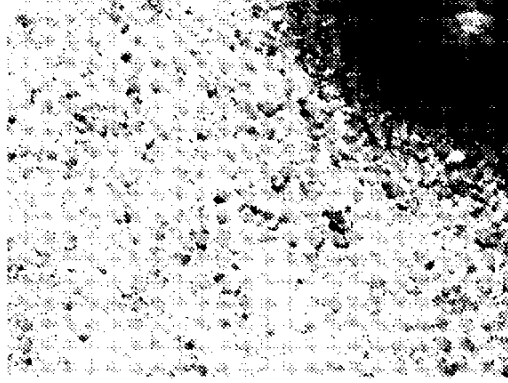
Şekil 23



ŞEKİL 24



ŞEKİL 25



ŞEKİL 26