

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

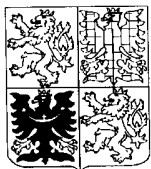
2000 - 4136

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19822122**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03071**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58647**

(71) Přihlašovatel:

**AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH
& CO. KG, Frankfurt am Main, DE;**

(72) Původce:

**Hüls Christoph, Wackernheim, DE;
Gallert Karl-Christian, Karben, DE;
Körner Christof, München, DE;
Wahle Elmar, Wattenberg, DE;**

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Humánní deadenylační nukleasa, způsob její
přípravy a její použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká nukleové kyseliny kódující humánní deadenylační nukleasu, která má aminokyselinovou sekvenci odpovídající SEQ 11 nebo některé z jejích funkčních variant nebo jejich částí obsahujících nejméně 8 nukleotidů. Dále se týká způsobů jejich výroby a léčiv a diagnostik tyto látky obsahujících. Rovněž se týká použití uvedených látek.

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 11

MEIRSNPKS	NEIKVQALIS	EADYFAIDKE	PSGISGSPSV	SALINGTDT	EEKYQKLCGH	60
SHDFLLQFG	LCITFDYTD	SKITKSNFY	VYVYKPNRS	SPDKVPCGS	SSIDFLASQG	120
FUNDVFRNG	IPFLNQEEER	QLRQIDEXR	SOANGAGALS	FVSPNTEGZ	VIPEDQKGP	180
LDQVREKED	LLQSESDHGL	DLRPTQTPR	VELTQGLSNK	FYSGIVETL	ETSEKERTIV	240
ISKVDEERSK	RREQQRDAKE	QKELRDAVCF	SRVIRALINS	GLVIGRQHL	LQVSTVWQF	300
YCVLPADLSE	FEENTCVFP	RLDSTKLNAS	TQFFKDTIYN	TSIAELEKOL	KEPTFNPKY	360
ESAGDFPSTD	TASEQLREAG	YDAITITLCP	ISHAMNLSGF	LSPPKIRVSA	RAKLEIEFTN	420
KLFLSRVMDI	PYLMLOGZUL	QPERGHVLEY	TFPDKSRISD	LHQLSAGCH	IQLISWIDTS	480
AVVLSQSGEQ	VKRAVWIKK	ASSTLRQPTA	YDGHQREKX	QIRQVWIDS	WQAD-GEELH	540
PQCIFITLON	MYIRNNSPTA	PSTVGRKMLS	PSQREKMGED	GVSCEISDTE	LEQDSCAEP	600
LSERAKKQKX	LKRMKCLSP	AGSISKNSPA	YLFYVDTM			639

Humánní deadenylační nukleasa, způsob její přípravy a její použití

Oblast techniky

Tento vynález se týká humánní deadenylační nukleasy (DAN), její kódující nukleové kyseliny a rovněž způsobu její přípravy a jejího použití.

Dosavadní stav techniky

Intracelulární koncentrace mRNA je pravděpodobně řízena nejenom rychlostí její tvorby, nýbrž i rychlostí odbourávání. Přitom mRNA zřejmě nejsou odbourávány nějakou náhodnou nukleolytickou reakcí, nýbrž specifickými mechanismy a při rychlostech odbourávání, které jsou pro příslušnou RNA specifické. V současné době jsou známy dva způsoby odbourávání, při nichž mají rozhodující úlohu poly(A)-konce molekul. V E.coli jsou poly(A)-konce molekul navázány na mRNAs nebo mRNA-fragmenty generované působením RNase E. Zdá se, že poly(A)-konec molekuly funguje jako relativně nestrukturovaná jednotka určující vytváření komplexu, který obsahuje vedle jiných proteinů i procesivní 3'-exonukleasu představovanou polynukleotid-fosforylasou, a který obsahuje RNA-závislou ATPasu, která pomáhá exonuklease překonávat inhibující sekundární struktury v mRNA. Podobný mechanismus zřejmě funguje v chloroplastech.

V eukaryontech vede exonukleolytické zkracování poly(A)-konců molekul rovněž k odbourávání mnoha, nikoli však všech mRNA. Na rozdíl od tohoto procesu, probíhajícího v bakteriích, zřejmě poly(A)-odbourávající exonukleasa nepokračuje v odbourávání 3'-UTR a kódující sekvence.

Namísto toho zřejmě eukaryotická exonukleasa po odbourání poly(A)-konce molekul přestane působit. U *S. cerevisiae* zahrnuje druhý krok odbourávání mRNA odstranění 5'-Cap-struktury působením specifické pyrofosfatasy. K odstranění CAP však dochází teprve až po zkrácení poly(A)-konce na cca 10 až 15 nukleotidů. Odstraněním CAP-struktury se uvolní přístup k mRNA pro 5'-exonukleasy, jejichž nejdůležitější zástupce je kódován XRN1-genem.

Sledování počátečního deadenylačního procesu v buňkách savců je poměrně jednoduché, naproti tomu sledování dalších kroků je obtížné vzhledem k rychlosti následujících procesů odbourávání a vzhledem k tomu, že chybějí analyzovatelné meziprodukty. Nepřímé důkazy však nasvědčují tomu, že k odstranění CAP-struktury dochází ve druhém kroku. Jeden homolog XRN1-genu byl popsán u myši. Stabilní mRNA se obecně deadenylují pomalu a nestabilní mRNA se deadenylují rychle. Rychlost odbourávání závisí na přítomnosti určitých destabilizujících sekvencí v 3'-UTR nebo v kódující sekvenci. Mutace v těchto sekvencích vedou nejenom ke stabilizaci mRNA, ale rovněž i ke zpomalení deadenylace. Naproti tomu inaktivace stabilizujícího prvku α -globulin-mRNA vede k nestabilitě a k urychlení deadenylace. Tyto údaje jednoznačně nasvědčují tomu, že odbourávání mRNA je regulováno rychlostí deadenylace.

Deadenylace některých mRNA může vést i k inaktivaci translace. To lze vysvětlit důležitostí poly(A)-konce pro iniciaci translace. Deadenylace jako kontrolní mechanismus translace má rozhodující roli při zrání oocytů a při rané embryonegesi u řady živočišných druhů. Tak např. u *Drosophila* reguluje polaritu embrya tzv. hunchback mRNA.

U obratlovců je možno v podstatě rozlišit při zrání oocytů a rané embryogenezi tři deadenylační reakce:

1. V nezralých oocytech je většina mRNA uložena v translačně-inaktivní formě s krátkými poly(A)-konci řetězce. Příkladem je mRNA pro tPA tkáně (tissue plasminogen activator) u myší. Zpočátku získá tato mRNA dlouhý poly(A)-konec řetězce při normální polyadenylační reakci, a tento konec se potom při deadenylaci zkrátí na oligo(A)-konec. Toto zkrácení je řízeno sekvencemi v 3'-UTR.
2. Při zrání oocytů probíhá deadenylace vedoucí k inaktivaci těch mRNA, které měly původně dlouhé poly(A)-konce řetězce a které byly aktivní v raných stádiích vývoje vajíčka. Tato deadenylace není závislá na specifických sekvencích v mRNA. Deadenylují se všechny mRNA s výjimkou těch, které jsou chráněny aktivním adenylačním procesem.
3. V průběhu rané embryogeneze se určité mRNA deadenylují při specifické reakci, která rovněž vyžaduje specifické sekvence v 3'-UTR.

Všechny tři deadenylační reakce probíhají v cytoplasmě. Na rozdíl od somatických buněk však zůstávají tyto oligoadenylované nebo deadenylované mRNA v oocytech stabilní a znovu se adenylují nebo odbourávají až v pozdějších vývojových stádiích.

Enzymy řídící tyto reakce nebyly doposud plně identifikovány. Bylo prokázáno, že odbourávání poly(A)- v kvassinkách je přímo nebo nepřímo závislé na poly(A)- vazném proteinu (PAB1). I když byla PAB1-závislá Poly(A)nukleasa (PAN) vyčištěna (Sachs A.B. a Deardoff (1992) Cell, 70,

961; Lovell, J.E. a spol. (1992) Genes Dev., 6, 2088), bylo možno zjistit u mutantů příslušných genů (PAN2 a PAN3) pouze nepatrné defekty při deadenylaci (Boeck, R. a spol. (1996) 271 (1), 432; Brown, C. a spol. (1996) 16 (10) 5744).

Körner Ch.G. a Wahle, E. (1997) J.Biol.Chem., 272, 10448, No.16 popsali poly(A)-specifickou 3'-exoribonukleasu z telecího brzlíku závislou na Mg^{2+} o molekulové hmotnosti 74 kDa, která byla rovněž označena jako deadenylační nukleasa (DAN). Tato popsaná DAN z telecího brzlíku byla za určitých reakčních podmínek stimulována cytoplasmatickým poly(A)-vázajícím proteinem I (PAB I) (Körner, Chr. a Wahle, E. (1997), supra) a byla použita jako Substrat Poly(A).

Podstata vynálezu

Cílem tohoto předkládaného vynálezu byla příprava humánní poly(A)-specifické 3'-exoribonukleasy.

V genové bance překvapivě nebyl nalezen žádný blíže charakterizovaný a sekvencovaný klon, který by podle tohoto vynálezu kódoval humánní deadenylační nukleasu (humánní DAN).

Předmětem tohoto vynálezu je tudíž nukleová kyselina kódující humánní DAN s aminokyselinovou sekvencí podle SEQ 11 nebo její funkční varianta a její části s minimálně 8 nukleotidy, přednostně s minimálně 15 nebo 20 nukleotidy, zejména s minimálně 100 nukleotidy a zvláště preferovaně s minimálně 300 nukleotidy (dále uváděná jako "nukleová kyselina podle tohoto vynálezu").

Tato kompletní nukleová kyselina kóduje protein se 639 aminokyselinami a s molekulovou hmotností 73,5 kDa. Exprese této nukleové kyseliny v E.coli vedla k proteinu, který vykazoval obdobné enzymatické aktivity jako DAN, kterou popsal Körner, Chr. a Wahle, E. (1997, supra). Další pokusy provedené podle tohoto vynálezu potvrdily, že v případě této nukleové kyseliny jde o nukleovou kyselinu, která kóduje humánní DAN. Tato nukleová kyselina podle tohoto vynálezu byla uložena dne 25. března 1998 v Německé sbírce mikroorganismů a buněčných kultur DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, pod číslem DSM 12075.

Preferovanou formou provedení je nukleová kyselina podle tohoto vynálezu, kterou je DNA nebo RNA, přednostně dvouvláknová DNA, zejména DNA se sekvencí nukleových kyselin podle SEQ 12 v pozici 58 až v pozici 1977. Obě tyto pozice označují podle tohoto vynálezu začátek a konec kódující oblasti.

Pojmem "funkční varianta" se podle tohoto vynálezu rozumí nukleová kyselina, která se funkčně používá s humánní DAN-kódující nukleovou kyselinou a je zejména humánního původu. Jako příklady použitých nukleových kyselin je možno uvést nukleové kyseliny z různých lidských buněk resp. tkání nebo alelické varianty. Tento předkládaný vynález zahrnuje rovněž varianty nukleových kyselin, které mohou pocházet z různých lidských jedinců.

V dalším významu se rozumí pod pojmem "varianty" podle tohoto vynálezu nukleové kyseliny vykazující homologii, zejména identitu sekvencí minimálně z cca 60 %, raději z cca 75 %, zejména z cca 90 % a především z cca 95 %.

Části nukleových kyselin podle tohoto vynálezu mohou být např. použity pro získávání jednotlivých epitopů, jako sondy pro identifikaci dalších funkčních variant nebo jako antisense-nukleové kyseliny. Tak např. nukleová kyselina skládající se minimálně z cca 8 nukleotidů je vhodná jako antisense-nukleová kyselina, nukleová kyselina skládající se minimálně z cca 15 nukleotidů je vhodná jako primér při PCR-postupu, nukleová kyselina skládající se minimálně z cca 20 nukleotidů je vhodná pro identifikaci dalších variant a nukleová kyselina skládající se minimálně z cca 100 nukleotidů je vhodná jako sonda.

V další preferované formě provedení obsahuje nukleová kyselina podle tohoto vynálezu jednu nebo několik nekódujících sekvencí a/nebo jednu poly(A)-sekvenci. Nekódujícími sekvencemi jsou např. intronové nebo regulační sekvence, jako jsou promotorové nebo enhancerové sekvence, pro řízení exprese genu kódovaného humánní DAN.

V další formě provedení je nukleová kyselina podle tohoto vynálezu obsažena ve vektoru, přednostně v expresním vektoru nebo v genově-terapeuticky účinném vektoru.

Těmito expresními vektory mohou být např. prokaryotické nebo eukaryotické expresní vektory. Příkladem prokaryotických expresních vektorů pro expresi v *E.coli* jsou např. T7 expresní vektor pGM10 (Martin, 1966) kódující expresi N-terminálního Met-Ala-His6-Tagu, který umožňuje výhodné čištění exprimovaného proteinu přes sloupec Ni^{2+} -NTA. Jako eukaryotické expresní vektory pro expresi v *Saccharomyces cerevisiae* jsou vhodné např. vektory p426Met25 nebo p426GAL1 (Mumberg a spol. (1994) Nucl. Acids

Res., 22, 5767), pro expresi v buňkách hmyzu je možno použít např. Baculovirus-vektory, uvedené v EP-B1-0127839 nebo EP-B1-0549721 a pro expresi v buňkách savců je možno použít např. vektory SV40, které jsou všeobecně dostupné.

Expresní vektory obsahují zpravidla regulační sekvence vhodné i pro hostitelskou buňku, jako jsou např. trp-promotor pro expresi v E.coli (viz např. EP-B1-0154133), ADH-2-promotor pro expresi v kvasinkách (Russel a spol. (1983), J.Biol.Chem. 258, 2674), baculovirus-polyhedrin-promotor pro expresi v buňkách hmyzu (viz např. EP-B1-0127839) nebo raný (früh) SV40-promotor nebo LTR-promotory např. z MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus /virus tumoru myších mléčných žláz/; Lee a spol. (1981) Nature, 214, 228).

Příklady genově-terapeuticky účinných vektorů jsou virusvektory, především adenovirusvektory, zejména replikačně-deficientní adenovirusvektory nebo adenoasociované virusvektory, např. adenoasociovaný virusvektor, skládající se výhradně ze dvou insertovaných terminálních opakovaných sekvencí (ITR).

Vhodné adenovirusvektory jsou popsány např. v pracích McGrory, W.J. a spol. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. a spol. (1982) v práci "Eukaryotic Viral Vectors" (Gluzman, Y. edit.), 187 Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. a spol. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. a spol. (1986) EMBO J. 5, 2377 nebo ve WO95/00655.

Vhodné adeno-asociované virusvektory jsou popsány např. v pracích Muzyczka, N. (1992) Curr.Top. Microbiol.

Immunol. 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) J. Virol. 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. a spol. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531 nebo Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793.

Genově-terapeuticky účinné vektory je možno získat i tak, že nukleová kyselina podle tohoto vynálezu vytvoří komplex s liposomy. K tomu jsou vhodné směsi liposomů, které popsali Felgner, P.L. a spol. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413; Behr, J.P. a spol. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. a spol. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 nebo Gao, X. a Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195. Při této přípravě liposomů se DNA naváže iontově na povrch liposomů, a to v takovém poměru, aby na povrchu zůstal výsledný kladný náboj (Nettoladung), a aby liposomy úplně navázaly DNA do komplexu.

Nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu je možno syntetizovat např. chemicky pomocí sekvence obsažené v SEQ12 nebo pomocí peptidové sekvence obsažené v SEQ11 s použitím genetického kódu např. podle fosfotriesterové metody (viz např. Uhlman, E. a Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No.4). Další možností pro získání nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu je izolace ze vhodné genové banky, např. z humánní genové banky pomocí vhodné sondy (viz např. Sambrook, J. a spol. (1989) Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2nd. Edition, Cold Spring Harbor, New York). Jako sondy jsou vhodné např. jednovláknové DNA-fragmety o délce cca 200 až 500 nukleotidů, zejména o délce cca 300 až 400 nukleotidů, jejichž sekvence je možno odvodit ze sekvence nukleové kyseliny podle SEQ 12.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je i samotný polypep-

tid s aminokyselinovou sekvencí podle SEQ 11 nebo jeho funkční varianta a jeho části minimálně se šesti aminokyselinami, přednostně minimálně s 12 aminokyselinami, zejména minimálně se 65 aminokyselinami a především se 638 aminokyselinami (dále uváděný jako "polypeptid podle tohoto vynálezu"). Tak na příklad je možno získat epitop obsahující polypeptid s cca 6-12, přednostně s cca 8 aminokyselinami, který po kopulaci s nosičem je možno použít pro přípravu specifických poly- nebo monoklonálních protilátek (viz např. US 5,656,435). Polypeptidy o délce minimálně 65 aminokyselin je možno používat pro přípravu poly- nebo monoklonálních protilátek i přímo bez nosiče.

Pojmem "funkční varianta" ve smyslu tohoto vynálezu se rozumí polypeptidy, které mají obdobnou funkci jako peptid podle tohoto vynálezu, t.zn., že mají poly(A)-specifickou 3'-exoribonukleasovou aktivitu a jsou aktivní zejména při dvojích reakčních podmínkách. Při prvních reakčních podmínkách je za nepřítomnosti soli aktivita zcela závislá na přítomnosti spermidinu. Za nepřítomnosti spermidinu je aktivita tohoto enzymu závislá na koncentraci soli. Kromě toho za přítomnosti PAB1 bylo za určitých reakčních podmínek pozorováno postupné odbourávání poly(A)-konce řetězce (viz též Körner, Chr.G. a Wahle, E. (1997), supra). Produkty odbourání se liší především svou délkou o cca 30 nukleotidů. Variantami se rozumí i alelické varianty nebo polypeptidy odvozené z jiných lidských buněk resp. tkání. Rozumí se tím i polypeptidy pocházející z různých lidských jedinců.

V dalším smyslu se tím rozumí i polypeptidy vykazující homologii sekvencí, zejména identitu sekvencí z cca 70 %, raději z cca 80 %, zejména z cca 90 % a především z 95 % s polypeptidem s aminokyselinovou sekvencí podle SEQ 11.

Dále se sem zahrnuje i delece polypeptidu v oblasti 1 - 60, výhodně cca 1 - 30, zejména 1 - 15 a především cca 1 - 5 aminokyselin. Tak např. může chybět první aminokyselina methionin, aniž by se funkce tohoto polypeptidu podstatně změnila. Kromě toho se sem zařazují i fusní proteiny, které obsahují výše uvedené polypeptidy podle tohoto vynálezu, přičemž tyto fusní proteiny jako takové již obsahují funkci humánní DAN nebo tuto specifickou funkci získají až po odštěpení fusního podílu. Především se sem zařazují fusní proteiny s podílem zejména nehumánních sekvencí tvořených cca 1 až 200, raději cca 1 až 150, zejména cca 1 až 100 a především cca 1 až 50 aminokyselinami. Jako příklady nehumánních peptidových sekvencí je možno uvést prokaryotické peptidové sekvence, např. z galaktosidasy z E.coli nebo tzv. Histidin-Tag, např. Met-Ala-His₆-Tag. Fusní protein obsahující tzv. Histidin-Tag je obzvláště vhodný pro čištění exprimovaného proteinu přes sloupce obsahující kovové ionty, např. přes sloupec obsahující Ni²⁺-NTA. "NTA" představuje komplexotvorné činidlo, kterým je "nitrilotrioctová kyselina" (Qiagen GmbH, Hilden).

Části polypeptidu podle tohoto vynálezu představují např. epitopy, které je možno specificky rozpoznat pomocí protilátek.

Při porovnání se známými nukleasami bylo zjištěno, že polypeptid podle tohoto vynálezu patří do skupiny tzv. RNaseD-Familie. V obr. 4 jsou zachyceny aminokyseliny vázané (konservierte) v EXO I, Exo II a EXO III motivech, které jsou pro tuto třídu exonukleas charakteristické. Ostatní vázané aminokyseliny jsou znázorněny na šedém podkladu. Tři kyselé aminokyselinové postranní řetězce, dva v exo I-doméně a jeden v exo III-doméně vážou přímo dva Mg²⁺

ionty, které se podílejí na enzymatické hydrolýze. Třetí kyselý postranní aminokyselinový řetězec lokalizovaný v exo II-doméně váže jeden z těchto kovových iontů prostřednictvím molekuly vodného můstku (Wasserbrückenmoleküle). Všechny tyto aminokyselinové zbytky jsou v rámci této skupiny látek (Familie) vysoce konzervovány a byly nalezeny i v humánní DAN podle tohoto vynálezu. Polypeptid podle tohoto vynálezu je možno proto nazvat poly(A)-specifická 3'-exoribonukleasa ze skupiny RNase D-Familie.

Polypeptid podle tohoto vynálezu byl připraven např. expresí nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu ve vhodném expresním systému jak bylo popsáno dříve pomocí metod, které jsou odborníkům všeobecně známy. Jako hostitelské buňky byly vhodné např. buňky E.coli kmeny DH5, HB101 nebo BL21, kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, linie hmyzích buněk Lepidopteran, např. ze *Spodoptera Frugiperda* nebo živočišné buňky jako jsou COS, Vero, 293 a HeLa, které je možno běžně získat.

Uvedené části polypeptidu je možno získat zejména také pomocí klasické syntézy peptidů (Merrifield-technika). Jsou vhodné zejména pro získávání antisér, jejichž pomocí je možno prozkoumávat vhodné genově-expresní banky pro získávání dalších funkčních variant polypeptidu podle tohoto vynálezu.

Další předmět tohoto vynálezu se vztahuje na postup přípravy polypeptidu podle tohoto vynálezu, přičemž nukleová kyselina podle tohoto vynálezu je exprimována ve vhodné hostitelské buňce a případně izolována.

Další předmět tohoto vynálezu se vztahuje i na proti-

látky, které s polypeptidem podle tohoto vynálezu specificky reagují, přičemž výše uvedené části polypeptidu jsou buď samy imunogenní nebo je lze imunogenizovat navázáním na vhodný nosič, jako je např. hovězí sérový albumin resp. je možno jejich imunogenitu zvýšit.

Protilátky jsou buď polyklonální nebo monoklonální. Jejich příprava, která je rovněž předmětem tohoto vynálezu, se provádí např. podle všeobecně známých metod imunizací savců, např. králíků, polypeptidem podle tohoto vynálezu nebo jeho uvedenými částmi, případně za přítomnosti např. Freundova adjuvantu a/nebo aluminiumhydroxidových gelů (viz např. Diamond, B.A. a spol. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Polyklonální protilátky vzniklé ve zvířatech imunologickou reakcí je možno nakonec pomocí všeobecně známých metod snadno z krve izolovat a vyčistit např. pomocí sloupcové chromatografie. Preferováno je afinitní čištění protilátek, při němž se např. C-terminální DAN-fragment naváže na NHS-aktivovaný HiTrap sloupec.

Monoklonální protilátky je možno připravit např. pomocí známých metod, které publikovali Winter a Milstein (Winter, G. a Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293).

Dalším předmětem tohoto vynálezu je rovněž léčivo, které obsahuje nukleovou kyselinu podle tohoto vynálezu nebo polypeptid podle tohoto vynálezu a případně vhodné přísady nebo pomocné látky, a rovněž postup přípravy takového léčiva pro léčení rakoviny, autoimunitních onemocnění, zejména pro léčení roztroušené sklerozy nebo rheumatoidní arthritidy, Alzheimerovy nemoci, alergií, zejména neurodermitidy, alergií typ I nebo typ IV, arthrosy, atherosklerozy, osteoporosy, akutních a chronických

infekčních onemocnění a/nebo diabetu a/nebo pro ovlivnění buněčného metabolismu, zejména při imunosupresi, obzvláště při transplantacích, přičemž se nukleová kyselina podle tohoto vynálezu, např. tzv. antisense-nukleová kyselina nebo polypeptid podle tohoto vynálezu kombinuje s farmaceuticky vhodnými přísadami nebo pomocnými látkami.

Pro genově-terapeutické použití u člověka je vhodné zejména léčivo, které obsahuje nukleovou kyselinu podle tohoto vynálezu jako takovou (v "holé - nakte" formě) nebo ve formě jednoho z výše uvedených genově-terapeuticky účinných vektorů nebo ve formě komplexů s liposomy.

Jako vhodná přísada nebo pomocná látka se hodí např. fyziologický roztok kuchyňské soli, stabilizátory, proteinasové inhibitory, nukleasové inhibitory atd.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je i diagnostický prostředek obsahující nukleovou kyselinu podle tohoto vynálezu, polypeptid podle tohoto vynálezu nebo protilátky podle tohoto vynálezu a případně vhodné přísady a pomocné látky a rovněž postup přípravy tohoto diagnostického prostředku pro diagnosu rakoviny, autoimunitních onemocnění, zejména roztroušené sklerozy nebo rheumatoidní artritidy, Alzheimerovy nemoci, alergií, zejména neurodermitidy, alergií typ I nebo typ IV, arthrosy, atherosklerosy, osteoporosy, akutních a chronických infekčních onemocnění a/nebo diabetu a/nebo pro analýzu buněčného metabolismu, zejména stavu imunity, obzvláště při transplantacích, přičemž se k nukleové kyselině podle tohoto vynálezu, polypeptidu podle tohoto vynálezu nebo k protilátkám podle tohoto vynálezu přidají vhodné přísady a/nebo pomocné látky.

Tak např. je možno podle tohoto vynálezu s použitím nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu připravit diagnostikum na bázi polymerasové řetězové reakce (PCR-diagnostika, např. podle EP-0200362) nebo na bázi Northern Blot-analýzy, jak je blíže popsáno v Příkladu 5. Tyto testy jsou založeny na specifické hybridizaci nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu s komplementárním vláknem odpovídajícím příslušné mRNA. Nukleová kyselina podle tohoto vynálezu může být přitom modifikována např. postupem podle EP 0 063 879. Přednostně se DNA-fragment podle tohoto vynálezu označí pomocí vhodných činidel, např. pomocí radioaktivních látek např. α -P³²-dATP nebo neradioaktivních látek jako je např. biotin, podle všeobecně známých metod a inkubuje se s izolovanou RNA, vázanou přednostně na vhodných membránách např. z celulózy nebo nylonu. Přitom je výhodné izolovanou RNA před hybridizací a navázáním na membránu rozdělit podle velikosti, např. pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Při stejném množství sledované RNA z každého vzorku tkáně je tak možno stanovit množství mRNA, specificky označené sondou.

Další diagnostikum obsahuje polypeptid podle tohoto vynálezu resp. jeho výšeuvedené imunogenní části. Tento polypeptid resp. jeho části, navázané přednostně na tuhé fázi, např. na nitrocelulose nebo na nylonu, je možno uvést do styku in vitro se sledovanou tělní tekutinou, např. krví, aby mohlo např. dojít k reakci s autoimunitními protilátkami. Tento komplex protilátka - peptid je potom možno prokázat např. pomocí značkových antihuman-IgG- nebo antihuman-IgM-protilátek. Při tomto značkování se jedná např. o enzym jako je peroxidasa, který katalyzuje barevnou reakci. Přítomnost autoimunitních protilátek a jejich množství je tak možno snadno a rychle prokázat pomocí

barevné reakce.

Další diagnostikum obsahuje protilátky podle tohoto vynálezu jako takové. Pomocí těchto protilátek je možno např. u vzorku lidské tkáně rychle a snadno zjistit, zda obsahuje příslušný polypeptid. V tomto případě jsou protilátky podle tohoto vynálezu značeny např. pomocí enzymu, jak bylo popsáno dříve. Specifický komplex protilátka-peptid je tak možno snadno a rychle prokázat pomocí enzymatické barevné reakce.

Další předmět tohoto vynálezu se týká i testu pro identifikaci funkčních interaktorů, jako jsou např. inhibitory nebo stimulatory obsahující nukleovou kyselinu podle tohoto vynálezu, polypeptid podle tohoto vynálezu nebo protilátky podle tohoto vynálezu a případně vhodné přísady a/nebo pomocné látky.

Vhodným testem pro zjišťování funkčních identifikátorů je např. tzv. "Two-Hybrid System" (Fields, S. a Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Při tomto testu se buňka, např. buňka kvasinek, transformuje (transformiert o. transfiziert) s jedním nebo více expresními vektory exprimujícími fusní protein, který obsahuje protein podle tohoto vynálezu a DNA-vaznou doménu známého proteinu, např. Gal4 nebo LexA z E.coli a/nebo exprimujícími fusní protein obsahující neznámý polypeptid a transkripčně-aktivační doménu obsahující např. Gal4, herpesvirus VP16 nebo B42. Kromě toho obsahuje tato buňka reportergen, např. LacZ-gen z E.coli, "Green fluorescence protein" nebo gen pro aminokyselinovou biosyntézu (Aminosäure-Biosynthesegen) z kvasinek His3 nebo Leu2, který kvasinky reguluje prostřednictvím regulačních sekvencí, jako jsou např.

lexA-promotor/operátor nebo tzv. "Upstream Activation Sequence" (UAS). Tento neznámý polypeptid je kódován např. DNA-fragmentem pocházejícím z genové banky, např. z humánní genové banky. Zpravidla se zároveň připravuje cDNA-genová banka pomocí popsaných expresních vektorů v kvasinkách, takže je možno tento test provést ihned.

Tak na příklad se v kvasinkovém expresním vektoru klonuje nukleová kyselina podle tohoto vynálezu ve funkční jednotce na nukleovou kyselinu kódující lexA-DNA-vaznou doménu, takže se exprimuje fusní protein z polypeptidu podle tohoto vynálezu a LexA-DNA-vazné domény v transformovaných kvasinkách. V jiném kvasinkovém expresním vektoru byly cDNA-fragmenty klonovány z cDNA-genové banky ve funkční jednotce na nukleovou kyselinu kódující Gal4-transkripčně-aktivační doménu, takže byl exprimován fusní protein z neznámého polypeptidu a Gal4 transkripčně-aktivační domény v transformovaných kvasinkách. Kvasinky, které jsou např. Leu2, transformované oběma expresními vektory, obsahují nadto nukleovou kyselinu, která kóduje Leu2 a která je řízena LexA-promotor/operátorem. V případě funkční interakce mezi polypeptidem podle tohoto vynálezu a neznámým polypeptidem se váže Gal4-transkripčně-aktivační doména přes LexA-DNA-vaznou doménu na LexA-promotor/operátor, který se aktivuje a exprimuje Leu2-gen. To má za následek, že Leu2-kvasinky mohou růst na minimálním mediu, které neobsahuje žádný leucin.

Při použití LacZ- resp. "Green Fluorescence Protein"-reportergenu namísto genu pro biosyntézu aminokyselin je možno aktivaci transkripce prokázat tím, že se tvoří modře resp. zeleně fluoreskující kolonie. Modré resp. fluorescenční zabarvení je možno snadno prokázat spektrometricky

např. v případě modré barvy při 585 nm.

Tímto způsobem je možno snadno a rychle prozkoumat expresní genové banky na přítomnost polypeptidů, které s polypeptidem podle tohoto vynálezu reagují. Nakonec je možno nalezené nové polypeptidy izolovat a dále charakterizovat.

Další možností použití systému "Two-Hybrid-System" je ovlivnění interakce mezi polypeptidem podle tohoto vynálezu a známým nebo neznámým polypeptidem působením dalších látek, např. chemických sloučenin. Tímto způsobem je možno i snadno zjistit nové cenné chemicky syntetizovatelné účinné látky, které je možno použít jako terapeutické prostředky. Tento vynález se proto nevztahuje pouze na postup pro vyhledávání polypeptidických interaktorů, nýbrž zahrnuje i postup pro vyhledávání látek, které mohou s výše uvedeným protein-protein-komplexem reagovat. Takovéto peptidické a rovněž chemické interaktory jsou proto ve smyslu tohoto vynálezu označovány jako funkční interaktory, které mohou mít inhibující nebo stimulující účinek.

Další možností použití polypeptidu podle tohoto vynálezu je poly(A)-specifické odbourávání nukleových kyselin, zejména mRNA. Poly(A)-specifické odbourávání nukleových kyselin se může uplatnit zejména ve výzkumných laboratořích.

Následující obrázky a příklady blíže ilustrují tento vynález, aniž by jej jakkoli omezovaly.

Přehled obrázků na výkresech

- SEQ 11 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci humánní DAN s doménami pro Exo I (ADFFAIDGEFSGIS), Exo II (LVIGHNMLLDVMHTVH) a Exo III (SEQLHEAGYDAYITGLC).
- SEQ 12 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci humánní DAN včetně start- (Pos.58) a stopkodonu (Pos. 1977) s navazujícím 3'UTR.
- Obr. 1 znázorňuje eluční profil humánní DAN na MonoQ (obr. 3A) a na SDS-PAGE (obr. 1B a 1C).
- Obr. 2 znázorňuje Western-Blot-analýzu rekombinantní humánní DAN a nativní bovinní DAN
- Obr. 3 zachycuje deadenylaci mRNA, akumulaci deadenylované RNA a vliv PABI
- Obr. 4 zachycuje porovnání známých nukleas s humánní DAN podle tohoto vynálezu

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Identifikace humánních DAN cDNA-klonů

Čištění bovinní DAN bylo provedeno postupem který popsali Körner, G. a Wahle E. (1997), supra, následovně:

Všechny čisticí operace byly prováděny při 4 °C. Mezi jednotlivými čisticími operacemi byly vzorky namrazeny v kapalném dusíku a zmrazeny na - 80 °C. Byl použit následující základní pufr: 50 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, 10 % (obj.) glycerin, 1 mM dithiothreitol, 0,4 µg/ml leupeptin hemisulfát, 0,7 µg/ml pepstatin, 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 0,02 % (obj.) Nonidet P-40, pH 7,9. Při různých čisticích operacích byly k tomuto základnímu pufru přidávány různé koncentrace KCl, jak je popsáno dále.

Čerstvý telecí brzlík byl odebírán z místních jatek, převážen na ledu a skladován při teplotě - 80 °C. 1 kg brzlíku byl nechán roztát ve 2 l základního pufru s 50 mM KCl a v homogenizátoru Waring Blendar byl homogenizován nejprve při nízké, později při střední a nakonec při nejvyšší rychlosti. Získaný homogenizát byl odstřeďován 1 hodinu při 16 000 x g a supernatant byl dekantován a přelit přes pánev s širokými oky. (Wahle, E., J. Biol. Chem., 266, 1991).

Tento extrakt z telecího brzlíku byl nanesen na sloupec DEAE Sepharosy FF (objem sloupce 4 l) a eluován při solném gradientu 50 až 600 mM KCl při 2,5-násobku objemu náplně kolony při průtoku 3 l/hod. Aktivní frakce byly vymývány z kolony při koncentraci soli mezi 75 a 200 mM KCl. Tyto frakce byly spojeny, přečištěny, zředěny síranem amonným na 30 % nasycený roztok a míchány 1,5 hod. na ledu. Po odstředění (30 min., 10 800 x g, tyto podmínky platí i pro dále uvedená odstřeďování) byl supernatant upraven pomocí síranu amonného na 50 %ní nasycení a znovu bylo provedeno míchání na ledu a odstředění. Sediment byl resuspendován ve 400 ml základního pufru s 50 mM KCl

a dialyzován po dobu 10 hodin proti 2 x 4,5 l základního pufru a znovu odstřeďován. Sloupec Sepharose-Blue (7 x 36 cm) o objemu 1,4 l byl ekvilibrován základním pufrem s 50 mM KCl a dialyzovaný extrakt byl nanesen na kolonu. Tato kolona byla promyta základním pufrem o objemu 1,5-násobku objemu sloupce s 250 mM KCl a eluována základním pufrem o objemu 1-násobku objemu sloupce s 1 M KCl (rychlost průtoku 2 l/h).

Aktivní frakce z těchto dvou preparací vždy z 1,2 kg telecího brzlíku byly spojeny a vysráženy síranem amonným (60 %ní nasycení). Po odstředění byl sediment vyjmut do 200 ml základního pufru s 50 mM KCl, 12 hodin dialyzován proti 3 x 4 l stejného pufru a ve dvou podílech nanesen na kolonu naplněnou Heparin-Sepharosou (2,5 x 37 cm). Tato kolona byla promyta základním pufrem o objemu 1,5-násobku objemu sloupce s 50 mM KCl a nakonec eluována desetinasobkem objemu sloupce při gradientu do 500 mM KCl (rychlost průtoku: 145 ml/h). Aktivní DAN byla eluována mezi 80 a 150 mM KCl. Aktivní frakce byly spojeny a dialyzovány proti základnímu pufru s 30 mM KCl po dobu 4 hodiny. Dialyzát byl odstředěn a ve dvou podílech byl chromatografován na koloně s MonoQ FPLC (objem náplně 8 ml). Tato kolona byla promyta základním pufrem o objemu 2-násobku objemu sloupce s 50 mM KCl a nakonec byla při gradientu se stoupající koncentrací soli (konečná koncentrace: 500 mM KCl, rychlost průtoku: 2,5 ml/h vymyta celkovým objemem 320 ml. Aktivní DAN byla eluována při cca 160 mM KCl. Aktivní frakce (40 ml) byly spojeny a 4 hodiny dialyzovány proti 2 l základního pufru s 30 mM KCl, odstředěny a naneseny na další kolonu naplněnou MonoQ (objem náplně 1 ml, rychlost průtoku 0,9 ml/h). Aktivní DAN vázaná ve sloupci byla eluována základním pufrem s 500 mM KCl a ve čtyřech podílech nanesena na kolonu naplněnou přípravkem Superdex HR 10/30 FPLC (ekvilibrace se

základním pufrům s 300 mM KCl, rychlost průtoku : 0,15 ml/h) (Körner, Ch.G. a Wahle, E. (1997), supra).

Různé frakce z kolony naplněné Superdexem, které vykazovaly DAN-aktivitu, byly shromážděny a rozděleny na koloně s přípravkem Phenyl-Superose (Körner, Ch.G. a Wahle, E. (1997), supra). Aktivní frakce byly shromážděny a dialyzovány proti pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 10 % (obj.) glycerin, 1 mM dithiothreitol, 0,4 µg/ml leupeptin-hemisulfát, 0,7 µg/ml pepstatin, 0,5 mM fenylmethylsulfonát (PMSF), 0,02 % (obj.) Nonidet p-40, 50 mM KCl). Po odstředění byl získaný dialyzát nanesen na kolonu se 100 µl Smart MonoQ (PC 1.6/5). Nakonec byla kolona promyta 200 µl pufru. Vázané proteiny byly při gradientu se stoupající solnou koncentrací (konečná koncentrace 500 mM KCl) vymyty celkovým objemem odpovídajícím 40-násobku objemu náplně kolony. Frakce s pozitivní DAN-aktivitou byly eluovány při koncentraci cca 200 mM KCl. Dvě frakce s nejvyšší DAN-aktivitou byly analyzovány pomocí elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu. Nakonec byla provedena hydrolýza pomocí enzymu Protease Lys-C, rozdělení pomocí HPLC a bylo provedeno sekvencování peptidu. Byly nalezeny následující sekvence:

1. KSFNFYVFPK,
2. KPFNRSSPD (V/K)K,
3. KYAESYWIQTYADYVG a rovněž
4. směs která se skládala z KEQEELNDA a KLFLMRVMD.

N-terminální sekvenci čištěné bovinní DAN nebylo možno

stanovit.

Nakonec byla provedena EST (expressed sequence tags)-rešerše databanky pomocí programu BLAST (NCBI). Byly tak identifikovány následující klony:

I.M.A.G.E.-Konsortium klon ID 645295 pomocí peptidu 1 a 2 a

I.M.A.G.E.-Konsortium klon ID 301901 pomocí peptidu 3.

Úplné stanovení sekvencí nalezených klonů bylo provedeno na přístroji ABI373A-Sequenziergerät s použitím sady ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Kit.

Přitom bylo zjištěno, že I.M.A.G.E.-Konsortium klon ID 301901 kóduje 176 C-terminálních aminokyselin z DAN a celý 3'-UTR, zatímco I.M.A.G.E.-Konsortium klon ID645295 kóduje celý ORF a 5'-UTR a část 3'-UTR, což odpovídá proteinu se 639 aminokyselinami o molekulové hmotnosti 73,5 kDa (SEQ11). 57 nukleotidů, které byly vázány vzestupně (stromaufwärts) od prvního AUG kodonu neobsahovalo žádný stop-kodon v rastru (Leseraster). Tyto sekvence (AGAAUGG) obklopující tento AUG-kodon odpovídají tzv. Kozakovým pravidlům (Kozak, 1991), která popisují startovní sekvence preferované pro start translace. 3'-UTR o velikosti 0,7 kB se nachází v cDNA-klonu 645295 a poly(A)-konec molekuly se nechází na konci klonu 301901. Poly(A)-konci molekuly předchází ve vzestupném směru (stromaufwärts) vzácný polyadenylační signál AUUAAA (SEQ 12).

P ř í k l a d 2

Příprava expresních vektorů

Plasmid pGMMCS byl konstruován následujícím způsobem:

Expresní vektor pGM10 (Martin, 1996), který obsahuje PABII cDNA-sekvenci (Nemeth, 1996) s N-terminálním označením (Tag) Met-Ala-His₆-Tag byl vystaven působení Xho I a BamH I a získaný fragment, který obsahuje 3'-část PAB II byl nahrazen Xho I/BamH I-fragmentem z klonovacího místa Multiple Cloning Site z pBluescript KS (+/-) plasmidu. Získaný plasmid obsahuje sekvenci kontrolovanou T7-promotorem, která začíná Met-Ala-His₆ a za tím následuje 5'-část z PAB II a Multi Cloning Site. Štěpné místo Nde I leží mezi His₆-Tag a PAB II sekvencí a je možno je využít spolu s Multi Cloning Site k nahrazení zbývajících PAB II sekvence jakoukoli kódující sekvencí.

Plasmid pGMMCS 301901 byl připraven následujícím způsobem:

Část sekvence humánního DAN-klonu obsahujícího 176 C-terminálních aminokyselin byla amplifikována s použitím PCR z klonu 301901 za následujících podmínek:

15 cyklů: 45 sek. při 94 °C, 45 sek. při 54 °C a 3,5 min. při 72 °C.

Pfu-polymerasa a primery Nde I 301901:

CCATATCCATATGCTTTTCAGTGCCTTTCCTAAC a Xho I 301901:

AGTACTCGAGTTACAATGTGTCAGG. Po působení Nda I a Xho I byly vzniklé cDNA-fragменты čištěny s použitím sady Qia-Ex-Kit (Quiagen GmbH, Hilden) a integrovány do pGMMCS-vektoru

upraveného působením Nde I a Xho I. Tato sekvence byla potvrzena sekvencováním (Sequenzierung).

Plasmid pGMMCS645295 byl připraven následovně:

Kódující sekvence humánního DAN-klonu byla amplifikována s použitím PCR z klonu 645295 za následujících podmínek:

20 cyklů: 45 sek. při 94 °C, 45 sek. při 54 °C a 3,5 min. při 72 °C.

Pfu-polymerasa a primery Nde I 645295:

AGTGTTCGCATATGGAGATAATCAGGAGCA a Xho I 645295:

AGTACTCAGCGGTTTGCTGCCCTCA. Vzniklý produkt byl klonován ve vektoru PCR2.1 za pomoci sady TA-Klonierungs-Kit (InVitrogen^R). Po úpravě pomocí Nde I a Xho I byly vzniklé cDNA-fragменты čištěny s použitím sady Qia-Ex-Kit (Quiagen) a integrovány do pGMMCS-vektoru upraveného pomocí Nde I a Xho I. Nakonec byla velká část sekvence generované při PCR odstraněna úpravou (Verdau) s použitím Dra III a BstE II a nahrazena příslušným fragmentem původního klonu. Tato nová sekvence byla potvrzena sekvencováním.

P ř í k l a d 3

Příprava protilátek

Protilátky proti C-terminální části humánní DAN byly získány následujícím způsobem:

Plasmid pGMMCS 301901 byl transformován v BL21 (pLysC).

Buňky byly inkubovány při 37 °C v SOB-mediumu s 200 µg/ml

přípravku Carbenicellin až do OD600 od 1,9 (bis zu einer OD600 von 1,9). Nakonec bylo přidáno 200 μ M isopropyl- β -D-thiogalaktosidu a inkubace byla prováděna dalších 5 hodin. Buňky byly shromážděny a převedeny do pufru A (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 8 M močovina, pH 7,9). Lýza buněk byla provedena ultrazvukem, lyzát byl odstředěn a inkubován po dobu 2 h při laboratorní teplotě s 3 ml Ni-NTA-náplní kolony. Tato náplň byla potom vložena do kolony a promyta 70 ml pufru A, pH 6,3. Nakonec byl sloupec promyt 15 ml pufru B (300 mM NaCl, 10 % (obj.) glycerin, 50 mM Tris, 0,01 % (obj.) Nonidet-P40, 8 M močovina, pH 7,9). Protein zůstal na koloně zadržen, přičemž byl obsah močoviny snížen dvěma gradienty močoviny (45 ml/h, gradient 1: pufr B z 8 na 4 M močoviny při laboratorní teplotě, gradient 2: ze 4 na 0 M močoviny při 4 °C). Protein byl z kolony eluován pufr B, který obsahoval 500 mM imidazolu, dialyzován proti pufru B bez močoviny a použit pro imunizaci králíků.

Afinitní čištění anti-DAN-protilátky bylo provedeno následujícím způsobem:

C-terminální DAN-fragment byl navázán na NHS-aktivovaný HiTrap-sloupec (1 ml objem, Pharmacia, Freiburg) podle návodu výrobce. Na sloupec byly vloženy 3 ml séra a kolona byla promývána podle návodu výrobce. K získaným frakcím bylo přidáno 300 μ g/ml BSA a 0,02 % (hmot./obj.) NaN_3 a pufr byl vyměněn pomocí dialýzy.

P ř í k l a d 4

Exprese a čištění humánní DAN

Humánní DAN byla exprimována v *E.coli* jako fusní protein s N-terminálním His-Tagem (Met-Ala-His₆-Tag) následujícím způsobem:

Plasmid pGMMCS645295 byl transformován v BL21 (pLysC). Buňky byly vloženy do 50 ml LB-media se 100 µg/ml přípravku Carbenicillin a s 24 µg/ml chloramfenikolu při 37 °C a potom byly převedeny do 500 ml kultury bez chloramfenikolu a dále byly inkubovány při 33 °C. Po dosažení OD₆₀₀ od 1,3 bylo přidáno 100 µM isopropyl-β-D-thiogalaktosidu a inkubace byla prováděna další hodinu. Buňky byly shromážděny a převedeny do pufru A (50 mM Tris, 300 mM KCl, 0,1 mM MgAc, 1 mM β-merkaptioethanol, 0,4 µg/ml leupeptin, 0,7 mg/ml pepstatin, 0,5 mM PMSF, pH 7,9). Lýza buněk byla provedena ultrazvukem, lyzáty byly odstředěny a inkubovány po dobu 2 h při teplotě 4 °C se 2 ml náplně kolony Ni²⁺-NTA. Tato náplň byla potom vložena do kolony a promyta 25 ml pufru A a pak byl sloupec promyt 20 ml pufru B (pufr A a 10 % (obj.) glycerin, 0,02 % (obj.) Nonidet-P40, bez hořčíku, pH 6,3). Nakonec byl protein eluován 5 ml pufru C (pufr B s 500 mM imidazolu). Potom následovala dialýza proti pufru D (50 mM Tris, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 ml PMSF, 10 % (obj.) glycerin, 0,02 (obj.) Nonidet-P40, pH 7,9). Tento preparát byl odstředěn a nanesen na kolonu s MonoQ (objem náplně 1 ml). Nakonec byla tato kolona promyta pufrům s 50 mM KCl o objemu 5-násobku náplně kolony a eluována pufrům s gradientem s konečnou koncentrací 500 mM KCl o objemu 40-násobku náplně kolony. Aktivní DAN byla eluována a vytvořila ostré maximum při cca 190 mM KCl (obr. 1A).

Čištěním se získal téměř homogenní preparát proteinu s předpokládanou molekulovou hmotností (obr. 1B a 1C). Tento protein vykazoval poly(A)-specifickou 3'-exoribonukleasovou

aktivitu (viz Příklad 6). Z toho vyplývá, že nalezený cDNA-klon kóduje humánní DAN.

P ř í k l a d 5

Northern-Blot-analýza

RNA byla izolována z HeLa-buněk metodou kterou publikovali Chomczynski, P. a Sacchi, N (1987) Anal.Biochem. 162, 156. Poly(A)mRNA byla čištěna pomocí oligo(dT)-celulosy podle metody uvedené v publikaci Sambrook, J. a spol., (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Získaná RNA byla rozdělena na 1% agaroso-formaldehydovém gelu, převedena pomocí Kapillar-Blot na Hybond N⁺ membránu od fy. Amersham Buchler, Braunschweig a na tuto membránu byla fixována při dvouhodinové inkubaci při teplotě 80 °C. Sekvence kódující humánní DAN byla amplifikována pomocí PCR, pomocí Random-Priming byla označena α -³²P-dATP a byla použita jako sonda. Hybridizace byla provedena popsáním způsobem a membrána byla promyta za velmi přísně definovaných (Stringenz) podmínek. Northern-Blot-analýza s poly(A)⁺RNA z HeLa-buněk prokázala jediný 3,1 kB fragment, který hybridizoval se sondou DAN. Tato velikost dobře odpovídá velikosti cDNA-klonu.

P ř í k l a d 6

Test DAN-aktivity

Stanovení DAN aktivity bylo provedeno popsáním způsobem (Körner, Chr. G. a Wahle, E. (1997), supra). Elektro-

foréza na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byla provedena podle Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680.

Stejně jako bovinní enzym je i rekombinantní DAN aktivní v závislosti na neutralizaci náboje fosfátu za dvou rozdílných reakčních podmínek. Za nepřítomnosti soli je aktivita zcela závislá na přítomnosti spermidinu s koncentračním optimem 1 mM. Za těchto podmínek není specifická aktivita rekombinantní DAN (79 000 jedn./mg) výrazně odlišná od aktivity čištěné bovinní DAN (110 000 jedn./mg). Za přítomnosti spermidinu je aktivita DAN potlačována solí. Za nepřítomnosti spermidinu je aktivita enzymu závislá na koncentraci soli s koncentračním optimem 150 mM octanu draselného. Bovinní DAN se za těchto podmínek chová podobně. Za těchto podmínek je však specifická aktivita rekombinantního proteinu (960 jedn./mg) nižší než aktivita čištěného enzymu získaného z telecího brzlíku (8070 jedn./mg). Tento rozdíl je možno vysvětlit posttranslační modifikací nebo přítomností kontaminujících proteinů v tomto preparátu.

Jestliže byla polyadenylovaná RNA s připojeným Cap inkubována s DAN-preparáty za nepřítomnosti soli, došlo k degradaci poly(A)-konce molekuly a byla získána zcela deadenylovaná RNA (obr. 3). Jestliže byla provedena tato analýza (Assay) za přítomnosti PABI, byla aktivita částečně inhibována a bylo pozorováno postupné odbourávání poly(A)-konce molekuly. Převládající produkty odbourávání se ve své délce lišily o cca 30 nukleotidů, což bylo způsobeno zřejmě vázáním PABI. Tyto výsledky souhlasí s pracemi zabývajícími se celkovým výzkumem hovězího proteinu (Körner, Chr. a Wahle, E. (1997), supra). Ze shrnutých výsledků vyplývá, že rekombinantní protein je poly(A)-specifická 3'-exoribonukleasa.

P ř í k l a d 7

Western-Blot-analýzy

Western-Blot-analýzy byly provedeny následujícím způsobem:

Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulosoovou membránu pomocí Semidry-metody (Kyse-Andersen, 1984). Jednotlivé Bloty byly inkubovány s TNT-pufrem (20 % mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (obj.) Tween 20, pH 7,5) s 5 % (hmotn./obj.) odtučněného sušeného mléka. Stejný pufr byl použit pro inkubaci s antisérem a pro promývání. Jednotlivé Bloty byly inkubovány s protilátkami po dobu 2 až 3 hodin při laboratorní teplotě a nakonec byly promyty. Vázané protilátky byly prokazovány pomocí peroxidase-konjugovaných vepřových-proti-králičích-protilátek (Peroxidase-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper) (DAKO, Glostrup, Dánsko) a chemiluminiscenčním zabarvením (SuperSignal-Kit, Pierce).

Tyto analýzy prokázaly, že králičí protilátky vznikající proti C-terminálnímu fragmentu DAN se mohou srážet z částečně čištěných frakcí DAN. Tyto protilátky je možno pozorovat při Western-Blot-analýze jak bovinní, tak i humánní DAN (obr. 4). Při tomto pokusu se rekombinantní DAN jeví o něco větší než enzym v SDS-lyzátech z HeLa-buněk, což je možno vysvětlit zavedením Tagu (1004 Da) do této sekvence. Kdyby první AUG v cDNA-sekvenci nebyl použitý Start-kodon, musela by být přírodní DAN z HeLa-buněk minimálně o 1260 Da větší než rekombinantní protein s Tagem. I tyto výsledky potvrzují použití první AUG-sekvence v cDNA-klonu jako startovního kodonu v podmínkách in vivo.

15.01.01

7/11/01-4126

3797

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Nukleová kyselina kódující humánní deadenylační nukleasu (DAN) s aminokyselinovou sekvencí podle SEQ 11 nebo její funkční varianta nebo její části obsahující nejméně 8 nukleotidů, přičemž SEQ 11 je součástí tohoto nároku.
2. Nukleová kyselina podle nároku 1 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto nukleovou kyselinou je DNA nebo RNA, výhodně dvouvláknová DNA.
3. Nukleová kyselina podle nároku 1 nebo 2 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto nukleovou kyselinou je DNA se sekvencí nukleových kyselin podle SEQ 12 od pozice 58 do 1977, přičemž SEQ 12 je součástí tohoto nároku.
4. Nukleová kyselina podle nároku 3 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že tato nukleová kyselina obsahuje jednu nebo více nekódujících sekvencí a/nebo jednu poly(A)-sekvenci.
5. Nukleová kyselina podle některého z nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že tato nukleová kyselina je zahrnuta ve vektoru, přednostně v expresním vektoru nebo v genově-terapeuticky účinném vektoru.
6. Způsob přípravy nukleové kyseliny podle některého z nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se tato nukleová kyselina syntetizuje chemickým způsobem nebo izoluje

z genové banky pomocí sondy.

7. Polypeptid s aminokyselinovou sekvencí podle SEQ 11 nebo jeho funkční varianta a jeho části minimálně se 6 aminokyselinami.

8. Způsob přípravy polypeptidu podle nároku 7 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se nukleová
kyselina podle některého z nároků 1 ž 5 exprimuje ve vhodné
hostitelské buňce.

9. Protilátky proti polypeptidu podle nároku 7.

10. Způsob přípravy protilátky podle nároku 9 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se savec imunizuje
polypeptidem podle patentového nároku 7 a případně vzniklé
protilátky se izolují.

11. Léčivo obsahující nukleovou kyselinu podle některého
z nároků 1 až 5 nebo polypeptid podle nároku 7 a případně
farmaceuticky vhodné přísady nebo pomocné látky.

12. Způsob přípravy léčiva pro léčbu rakoviny, autoimunit-
ních onemocnění, zejména roztroušené sklerozy nebo rheuma-
toidní arthritidy, Alzheimerovy nemoci, alergií, zejména
neurodermitidy, alergií typ I nebo typ IV, arthrosy, athe-
rosklerozy, osteoporosy, akutních a chronických infekčních
onemocnění a/nebo diabetu a/nebo pro ovlivnění buněčného
metabolismu, zejména při imunosupresi, obzvláště při
transplantacích,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se nukleová kyseli-
na podle některého z nároků 1 až 5 nebo polypeptid podle
nároku 7 nebo protilátka podle nároku 9 formuluje

s farmaceuticky vhodnými přísadami nebo pomocnými látkami.

13. Diagnostikum obsahující nukleovou kyselinu podle některého z nároků 1 až 5 nebo polypeptid podle nároku 7 nebo protilátku podle nároku 9 a případně farmaceuticky vhodné přísady nebo pomocné látky.

14. Způsob přípravy diagnostického prostředku pro diagnózu rakoviny, autoimunitních onemocnění, zejména roztroušené sklerozy nebo rheumatoidní arthritidy, Alzheimerovy nemoci, alergií, zejména neurodermitidy, alergií typ I nebo typ IV, arthrosy, aterosklerozy, osteoporosy, akutních a chronických infekčních onemocnění a/nebo diabetu a/nebo pro analýzu buněčného metabolismu, zejména stavu imunity, především při transplantacích,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se nukleová kyselina podle některého z nároků 1 až 5 nebo polypeptid podle nároku 7 nebo protilátka podle nároku 9 smísí s farmaceuticky vhodným nosičem.

15. Způsob identifikace funkčních interaktorů obsahujících nukleovou kyselinu podle některého z nároků 1 až 5 nebo polypeptid podle nároku 7 nebo protilátku podle nároku 9 a případně farmaceuticky vhodné přísady a/nebo pomocné látky.

16. Použití nukleové kyseliny podle některého z nároků 1 až 5 nebo polypeptidu podle nároku 7 pro identifikaci funkčních interaktorů.

17. Použití nukleové kyseliny podle některého z nároků 1 až 5 pro vyhledávání variant humánní DAN ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se genová banka

prozkoumává pomocí uvedené nukleové kyseliny a nalezená varianta se izoluje.

18. Použití polypeptidu podle nároku 7 pro poly(A)-specifické odbourávání nukleových kyselin, zejména mRNA.

SEKVENČNÍ PROTOKOLY

(1) Všeobecné údaje :

(i) Přihlašovatel :

(A) Jméno : Aventis Research & Technologies GmbH & Co
KG

(B) Ulice :

(C) Místo : 65926 Frankfurt

(D) Spolková země :

(E) Země : Německo

(F) PSČ : 65926

(ii) Název vynálezu : Humánní deadenylační nukleasa, její
výroba a použití

(iii) Počet sekvencí : 29

(iv) Strojně čitelná forma :

(A) Datový nosič : floppy disk

(B) Počítač : IBM PC kompatibilní

(C) Pracovní systém : PC-DOSMS-DOS

(D) Software : Windows 3.1

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 1

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 10

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 1

KSFNFYVFPK

10

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 2

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 11
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 2

KPFNRSSPDV K

11

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 3

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 11
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 3

KPFNRSSPDK K

11

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 4

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 16
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment
- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 4

KYAESYWIQT YADYVG

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 5

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 8
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment
- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 5

KEQEELNDA

8

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 6

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 9

- (B) Typ : aminokyselinová sekvence
- (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
- (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 6

KLFLMRVMD

9

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 7

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 34
 - (B) Typ : nukleotidová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : jiná nukleová kyselina: primer-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 7

CCATATCCAT ATGCTTTTCA GTGCCTTTCC TAAC

34

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 8

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 25
 - (B) Typ : nukleotidová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : jiná nukleová kyselina: primer-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 8

AGTACTCGAG TTACAATGTCAGG

25

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 9

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 29

(B) Typ : nukleotidová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : jiná nukleová kyselina: primer-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 9

AGTGTCGCAT ATGGAGATAA TCAGGAGCA

29

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 10

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 25

(B) Typ : nukleotidová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : jiná nukleová kyselina: primer-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 10

AGTACTCAGC GGTTTGCTGC CCTCA

25

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 10

- (i) Znaky sekvence :
- (A) Délka : 25
 - (B) Typ : nukleotidová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : jiná nukleová kyselina: primer-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 10

AGTACTCAGC GGTTTGCTGC CCTCA

25

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 11

- (i) Znaky sekvence :
- (A) Délka : 693
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : protein
- (v) Typ fragmentu : N-terminus

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 11

MEIIRS NFKS NLHKVYQAIE EADFFAIDGE FSGISDGPSV SALTNGFDTP EERYQKLKKH	60
SMDFLLFQFG LCTFKYDYTD SKYITKSFNF YVFPKPFNRS SPDVKFVCQS SSIDFLASQG	120
FDFNKFVRNG IPYLNQEEER QLREQYDEKR SQANGAGALS YVSPNTSKCP VTIPEDQKKF	180
IDQVVEKIED LLQSEENKNL DLEPCTGFQR KLIYQTLNWK YPKGIHVETL ETEKKERYIV	240
ISKVDEEERK RREQQKHAK EELNDVAVGF SRVTHAIANS GXLVIGHNML LDVMHTVHQF	300
YCPLPADLSE FKEMTTCVFP RLLDTKLMS TQPFKDIINN TSLAELEXRL KETPFNPPKV	360
ESAEGFPSYD TASEQLHEAG YDAYITGLCF ISMANYLGST LSPPKIHVSA RSKLIEPPFN	420
KLFLMRVMDI PYLNLEGPDL QPKRDHVLHV TFPKEWKTSD LYQLFSAFGN IQISWIDDT	480
AFVSLSQPEQ VKIAVNTSKY AESYRIQTYA EYMGRKQEEK QIKRKWTEDS WKEADSKRLN	540
PQCIPYTLQN HYYRNNSFTA PSTVGKRNLS PSQEEAGLED GVSGEISDTE LEQTDSCAEP	600
LSEGRKXAKK LKRMKXELSP AGSISKNSPA TLFEVPDTW	639

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 12

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 2941

(B) Typ : nukleotidová sekvence

(C) Forma řetězce : dvojitý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : c-DNA k m-DNA

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 12

GAACCGCTGA	GGCGGGCGCG	GGCCCGGGTG	GGGCCAAGGT	TCCGGCCACT	CTGCAGAATG	60
GAGATAATCA	GGAGCAATTT	TAAGAGTAAT	CTTCACAAAG	TGTACCAGGC	CATAGAGGAG	120
GCCGACTTCT	TCGCCATCGA	TGGGGAGTTT	TCAGGAATCA	GTGATGGACC	TTCAGTCTCT	180
GCATTAACAA	ATGGTTTTGA	CACTCCAGAA	GAGAGGTATC	AGAAGCTTAA	AAAGCATTCC	240
ATGGACTTTT	TGCTATTTCA	GTTTGGCCTT	TGCACTTTTA	AGTATGACTA	CACAGATTCA	300
AAGTATATAA	CGAAGTCATT	TAACTTCTAT	GTTTTCCCGA	AACCTTCAA	TAGATCCTCA	360
CCAGATGTCA	AATTTGTTTG	TCAGAGCTCC	AGCATTGACT	TTCTAGCAAG	CCAGGGATTT	420
GATTTTAATA	AAGTTTTTCG	AAATGGAATT	CCATATTTAA	ATCAGGAAGA	AGAAAGACAG	480
TTAAGAGAGC	AGTATGATGA	AAAACGTTCA	CAGGCGAATG	GTGCAGGAGC	TCTGTCCTAT	540
GTATCTCCTA	ACACTTCAAA	ATGTCCTGTC	ACGATTCCTG	AGGATCAAAA	GAAGTTTATT	600
GACCAAGTGG	TAGAGAAAAT	AGAGGATTTA	TTACAAAGTG	AAGAAAACAA	GAAGTTGGAT	660
TTAGAGCCAT	GTACCGGGTT	CCAAAGAAAA	CTAATTTATC	AGACTTTGAG	CTGGAAGTAT	720
CCGAAAGGCA	TTCATGTTGA	GACTTTAGAA	ACTGAAAAGA	AGGAGCGATA	TATAGTTATC	780
AGCAAAGTAG	ATGAAGAAGA	ACGCCAAAAG	AGAGAGCAGC	AGAAACATGC	CAAAGAACAG	840
GAGGAGCTGA	ATGATGCTGT	GGGATTTTCT	AGAGTCATTG	ACGCCATTGC	TAATTCGGGA	900
AAACTTGTTA	TTGGACACAA	TATGCTCTTG	GACGTCATGC	ACACAGTTCA	TCAGTTCTAC	960
TGCCCTCTGC	CTGCGGACTT	AAGTGAGTTT	AAAGAGATGA	CAACATGTGT	TTTCCCCAGA	1020
CTCTTGATA	CTAAATTGAT	GGCCAGCACA	CAACCTTTTA	AGGATATCAT	TAACAACACA	1080
TCCCTTGCGG	AATTGGAAAA	GCGGTTAAAA	GAGACACCTT	TCAACCCTCC	TAAAGTTGAA	1140
AGTGCCGAAG	GTTTTCCAAG	TTATGACACA	GCCTCTGAAC	AACTCCACGA	GGCAGGCTAC	1200
GATGCCTACA	TCACAGGGCT	GTGCTTCATC	TCCATGGCCA	ATTACCTAGG	TTCTTTTCTC	1260
AGCCCTCCAA	AAATTCATGT	GTCTGCCAGA	TCAAAACTCA	TTGAACCTTT	TTTTAACAAG	1320
TTATTTCTTA	TGAGGGTCAT	GGATATCCCC	TATCTAAACT	TGGAAGGACC	AGACTTGCAG	1380
CCTAAACGTG	ATCATGTTCT	CCATGTGACA	TTCCCCAAAG	AATGGAAAAC	CAGCGACCTT	1440
TACCAGCTTT	TCAGTGCTTT	TGGTAACATT	CAGATATCCT	GGATTGATGA	CACATCAGCA	1500
TTTGTTCCTC	TTAGCCAGCC	CGAGCAAGTA	AAGATTGCTG	TCAATACCAG	CAAATATGCA	1560
GAAAGCTATC	GGATCCAAAC	CTATGCTGAA	TATATGGGGA	GAAAACAGGA	AGAGAAGCAG	1620
ATCAAAAGAA	AGTGGACTGA	AGATAGCTGG	AAGGAGGCTG	ACAGCAAACG	GTTAAACCCC	1680
CAGTGCATAC	CCTACACCCT	GCAGAATCAC	TATTACCGCA	ACAATAGTTT	TACAGCTCCC	1740
AGCACAGTAG	GAAAGAGAAA	TTTGAGTCCT	AGTCAAGAGG	AAGCTGGCCT	GGAGGACGGA	1800
GTGTCAGGGG	AGATTTCCGA	CACTGAGCTT	GAGCAGACCG	ATTCTGTGTC	AGAGCCCCCTC	1860
TCAGAGGGAA	GGAAAAAGGC	CAAGAAATTA	AAAAGAATGA	AGAAGGAGCT	TTCTCCAGCA	1920
GGAAGCATCT	CGAAGAACAG	CCCTGCCACA	CTCTTTGAAG	TTCTTGACAC	ATGGTAACCA	1980
AGACCTGAGG	GCAGCAAACC	GCTGGTGTCT	TCGCTGTGAG	CAAGAGCCGG	CTGGCACATT	2040
TGGAAGCCGC	ACTGTATTTA	ACTTAATCAA	ATGTGGTATG	GGAGGGGTTG	GAAACCAAGT	2100

TGTCTCCTGG	GGGGGAGAAA	ACAGGTTTTA	TTTTTGTGGC	TGTGGTTTTT	TCCCCTTTTT	2160
AATCTAACTG	CCTGTTGACA	TTGACACTCA	TCACGGTTGT	AGGCTGTCAT	GAATGTGTAC	2220
GTGCTTAACC	AGTGAATTCC	GTGTTGCTCT	TGTGAGGCCT	TTCCTGTCAT	GACCCAGTGT	2280
GCTTAAGAAC	CTGCCTGATG	GGGAGTGTCT	GCTGTGAAAT	CTGCAAAAAG	AGCTGACATT	2340
CCAGCTGCTG	TGATCATGAA	TTTGGGGGTG	TACTGTCCTG	CCTGTGCATC	TTCTCGCACT	2400
GAGATTTTGA	GGCAGTTGCA	GCCCTCGGTT	AGTCTCCAG	TGGAAAAATC	GGTTGTGCCT	2460
CCCTGCTTCC	CACCATAGCT	GCCTGAAAAC	ATGACGCTCT	CAAGCTTGTC	CTTCCTTCAG	2520
GAAGATGTCC	ACTCATGCCC	ACCCATGAGA	GGGCTTGCCG	TATGCCCTGG	CCTTTGGGCA	2580
TATTTATGTA	GAGTTCCTTT	CTCCTAAGAC	GTGAGTTTCT	CATGGGGGAT	GTACGAGTAA	2640
AAAGGTTAAC	TTCTGTTCTT	ATGCGTGGCG	CTGTGTTTAC	TTTCCAGAGT	CTCTGTTTCGT	2700
TTGTTTGGAT	GGCGGTCTCG	GGGTACGGCA	GCGTGTGTGC	GTACGTGTCT	GTGTGTGTGT	2760
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGA	AATCGTGCAA	ATCTACAACA	TGTCCAGGCC	2820
CATTCTCCGT	TGAAACAGAT	CACAGCAACG	ACAAACGCTC	ATGGCGCTGC	TTTGCTCCAC	2880
CCGCTTCAGA	TAGATCATTG	TTAGATATTT	CACATTTTTG	TATGGTGGAA	ATAAAAATGA	2940
AAAATGTATT	TCCAAAAGAT	GAAAATTAAA	AACATTTTCA	TAGGAAAAAA	AAAAAAAAAA	3000
AA						2

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 13

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 12

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 13

ADFFAIGFSG IS

12

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 14

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 15

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 13

LVIGHNMLLV MHTVH

15

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 14

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 16

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 14

SEQOLHEAGYA YITGLC

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 15

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 12

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 15

CDFVAIFFLG LD

12

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 16

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 16

LVVGHNSLLA MYMYH

15

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 17

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 16
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 17

ENVYHNAGFS YVTGEV

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 18

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 12
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 17

ENVYHNAGFS YVTGEV

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 19

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 19

LIVGHNCFLI AHVYS

15

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 20

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 16

- (B) Typ : aminokyselinová sekvence
- (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
- (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 20

AGGKHEAGYA FMTGCI

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 21

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 12
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 21

GTLVAIAFVS LQ

12

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 22

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 22

VFVGHGLNNF KHINI

15

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 23

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 16

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 23

QEGNHDSIEA HTALIL

16

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 24

(i) Znaky sekvence :

(A) Délka : 12

(B) Typ : aminokyselinová sekvence

(C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec

(D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 24

FPAIALTFVR TR

12

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 25

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 25

TKFLHAGSEL EVFLN

15

(2) Údaje pro SEQ ID NO: 26

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 26

ERQEWAAAVW YLLPI

15

2) Údaje pro SEQ ID NO: 27

- (i) Znaky sekvence :

- (A) Délka : 12
- (B) Typ : aminokyselinová sekvence
- (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
- (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 27

APVAFTDS LD

12

2) Údaje pro SEQ ID NO: 28

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární
- (ii) Typ molekuly : peptid
- (v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

- (xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 28

LKVGQNLKYR GILAN

15

2) Údaje pro SEQ ID NO: 29

- (i) Znaky sekvence :
 - (A) Délka : 15
 - (B) Typ : aminokyselinová sekvence
 - (C) Forma řetězce : jednotlivý řetězec
 - (D) Topologie : lineární

(ii) Typ molekuly : peptid

(v) Typ fragmentu : vnitřní fragment

(xi) Popis sekvence : SEQ ID NO: 29

EEAGRAAEAD VTLQL

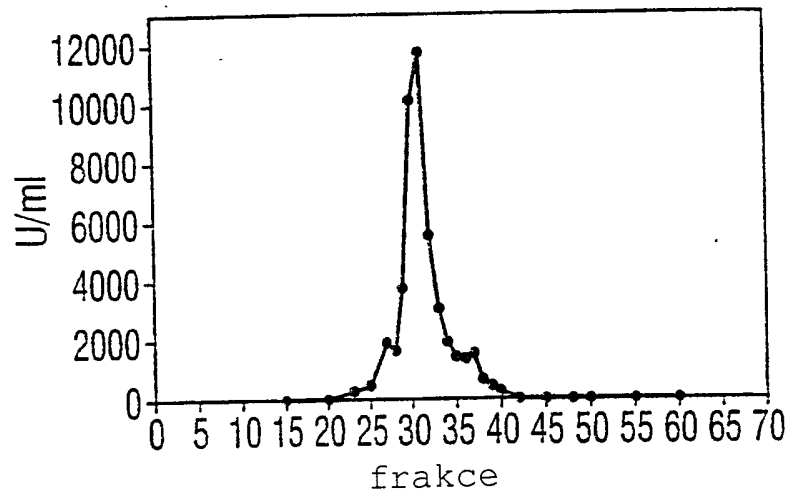
15.

15.01.01

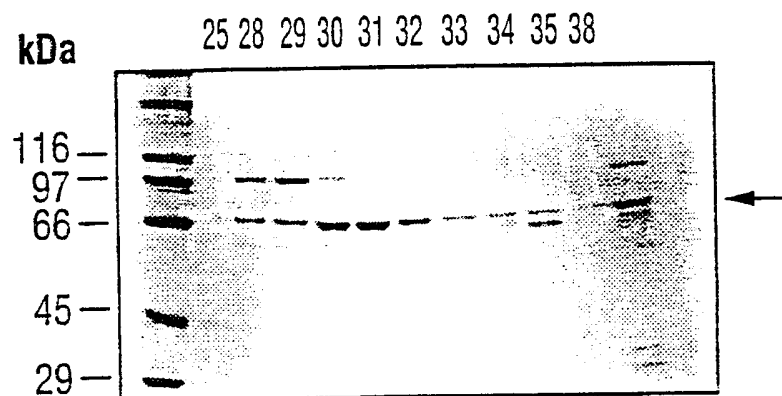
1 / 4

PV2000-4126
3797

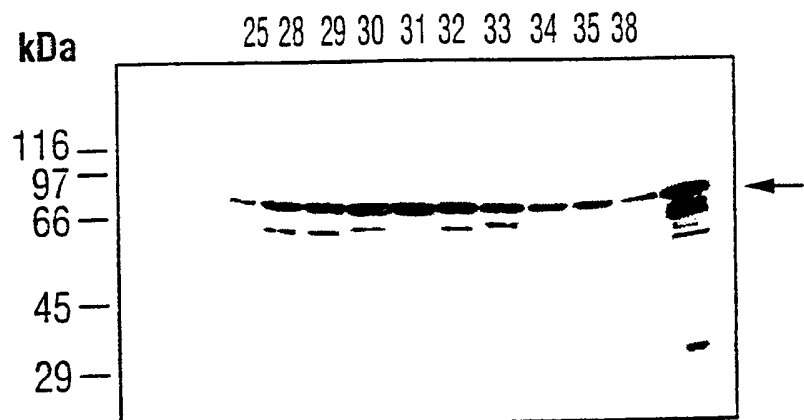
obr. 1a



obr. 1b

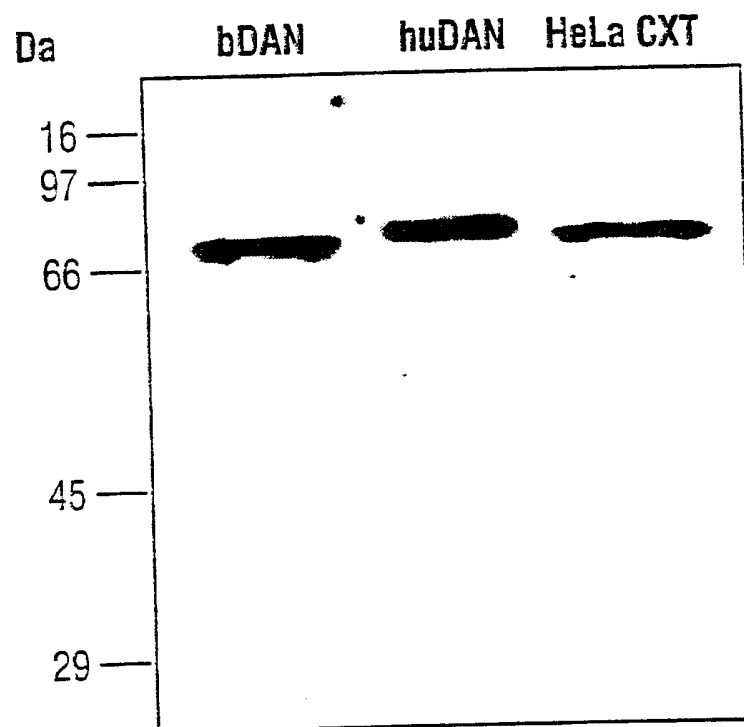


obr. 1c



obr. 1

obr. 2



obr. 4

huDAN	22	A	D	F	F	A	I	D	G	E	F	S	G	I	S	35
K10C81	23	C	D	F	V	A	I	D	F	E	F	L	G	L	D	36
A. thaliana		A	D	F	V	A	I	D	L	E	M	T	G	V	T	
PAN2	904	G	T	L	V	A	I	D	A	E	F	V	S	L	Q	917
RNaseD	22	F	P	A	I	A	L	D	T	E	F	V	R	T	R	35
EcoDNAPol1	349	A	P	V	F	A	F	D	T	E	T	D	S	L	D	362

↑ ↑
Exol

huDAN	283	L	V	I	G	H	N	M	L	L	D	V	M	H	T	V	H	298
K10C81	284	L	V	V	G	H	N	S	L	L	D	A	M	Y	M	Y	H	299
A. thaliana		L	I	V	G	H	N	C	F	L	D	I	A	H	V	Y	S	
PAN2	1011	V	F	V	G	H	G	L	N	N	D	F	K	H	I	N	I	1026
RNaseD	76	T	K	F	L	H	A	G	S	E	D	L	E	V	F	L	N	91
EcoDNAPol1	415	L	K	V	G	Q	N	L	K	Y	D	R	G	I	L	A	N	430

↑
ExolII

huDAN	373	S	E	Q	L	H	E	A	G	Y	D	A	Y	I	T	G	L	C	389
K10C81	370	E	N	V	Y	H	N	A	G	F	D	S	Y	V	T	G	E	V	376
A. thaliana		A	G	G	K	H	E	A	G	Y	D	A	F	M	T	G	C	I	
PAN2	1062	Q	E	G	N	H	D	S	I	E	D	A	H	T	A	L	I	L	1078
RNaseD	146	E	R	Q	E	W	Y	A	A	A	D	V	W	Y	L	L	P	I	162
EcoDNAPol1	493	E	E	A	G	R	Y	A	A	E	D	A	D	V	T	L	Q	L	507

↑ ↑
ExolIII