

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 92673

(22) Заявено на 10.08.90

(24) Начало на действие
на патента от: 09.02.89

Приоритетни данни

(31)154206 (32)10.02.88 (33)US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 25.07.94

(46) Публикувано в бюлетин № 5
на 24.05.94

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73), (72) Патентоприетжател и
Изобретател(и)::
Gerard M. Housey
New York, NY (US)(74) Представител по индустриална
собственост:(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US89/00462, 09.02.89(87) № и дата на РСТ публикация:
WO89/07654, 24.08.89

(54) МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА ИНХИБИТОРИ И АКТИВАТОРИ НА ПРОТЕИН

(57) Методът намира приложение в областта на медицината. Идентифицират се инхибитори и активатори на протеин, чиято експресия влияе върху фенотипната характеристика на клетката и по-специално върху културалната или морфологичната характеристика. Използва се по-силно изразеното им влияние върху клетките да продуцират протеин в сравнение с клетките, които продуцират малко или въобще не продуцират протеин. В предпочитания вариант на анализ ефектът се наблюдава с просто око. С метода се идентифицира тамоксифена като инхибитор на РКС - активността в клетъчната култура.

54 претенции, 7 фигури

(54) МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА ИНХИБИТОРИ И АКТИВАТОРИ НА ПРОТЕИН

Област на техниката

Изобретението се отнася до общ метод за откриване и идентифициране както на инхибитори, така и на активатори на ензими, рецептори и други протеини. По-специално, изобретението се отнася до метод за откриване на вещества, които специфично инхибират или активират даден протеин, като влияят върху културалните или морфологични характеристики на клетката, произвеждайки протеин и по-специално по начин, видим с просто око.

Предшестващо състояние на техниката

По настоящем се прилагат множество системи на анализ за откриване на нови модулатори на клетъчния растеж и по-специално в търсенето на нови антитуморни средства, които са изборително токсични за раковите клетки, но не и за нормалните клетки. Могат да се установят различни промени, но най-често срещаните са: реверсия на трансформирания фенотип, значителни изменения в клетъчната морфология или цитотоксичността.

Цитотоксичните анализи ин витро включват измерване на клетъчните параметри, които са показателни за инхибирането на клетъчния растеж или цитотоксичността. Те включват, например, измерване на инхибирането на дадени клетъчни метаболитни пътища в отговор на третиране с цитотоксични агенти. В източник /6/ се описват характерни методи, които използват тази техника. тези методи са донякъде сложни технически и изискват използването на радиоактивни индикатори в някои случаи. Освен това, резултатите не са точни, тъй като всеки агент, който изменя растежа на клетките, дава положителен резултат при тези системи за анализ.

Агентите се изследват и за способността им да инхибират трансформирания (раковите) клетки, култивирани в мек агар. Този метод се основава на факта, че образуването на колонии от клетки в мек агар е опитът ин витро, който показва най-голямата степен на корелация с предсказването дали клетките ще бъдат туморообразуващи в опитното животно /12/. Този метод е относително прост за осъществяване, тъй като нарастването на колонията след две или повече седмици ще бъде достатъчно голямо, за да се установи с просто око.

Отчитането на крайните резултати, следователно, може да се извърши или от техник без продължителен опит в тъканните култури, или както е описано съгласно изобретението, с помощта на автоматизирана абсорбционна система. В настоящата си форма, обаче, този метод е също неточен (неспецифичен), поради посочените причини. С други думи, всеки агент, който инхибира клетъчния растеж, по какъвто и да е начин ще дава положителен резултат при тази система за анализ, така както се прилага тя изобщо, независимо от това дали агентът инхибира протеина.

Антимикробните анализи ин витро включват използването на бактериални или дрождеви щамове, които се прилагат като опитни организми за откриване на агенти с по-обща свойства по отношение на инхибиране на растежа на клетките /6/. При този метод бактериалният или дрождев щам се култивира върху Петриевы блюда със стандартна хранителна среда и потенциалните агенти се прилагат в различни места на блюдата. Ако агентът има растежоинхибиращи свойства, в мястото на прилагането му върху блюдото се получава светла зона, което се дължи на неспособността на тест-микроорганизма да се развива на това място. Този метод е бърз и може да се изпълнява от техник без продължителен опит в областта на тъканните култури, но резултатите са обикновено неточни, тъй като агентите, които са ефективни по отношение на бактериалните или дрождеви щамове, често са по-малко ефективни (или напълно неефективни) при модулиране растежа на клетки на бозайници /6/.

Други системи за проучване се основават на морфологичното изменение на опитните клетки при въздействие на възможните агенти, за да се определи ефективността на даден агент. Този метод е обикновено най-ефективният за откриване на специфични агенти, които взаимодействат с дадени протеин или изменят характерно клетъчно свойство /47/. Независимо от всичко тези системи за анализ са най-трудните за прилагане в практиката, тъй като морфологичният ефект на всеки отделен агент върху опитните клетки може да се изследва под микроскоп. Следователно, този метод изисква продължително наблюдение на клетките от опитен учен.

Техническа същност на изобретението
Методът съгласно изобретението съче-

тава бързината и лекотата на изпълнение на анализа с мек агар и точността (специфичността) на определяне на активния агент, про-изтичаща от морфологичния анализ. Същността на метода се състои в това, че се включва образуване на целенасочено получена клетъчна линия, за да се открият както стимулатори, така и инхибитори, свършено специфични за всеки отделен протеин, който влияе върху културалните или морфологични характеристики на клетката.

В основата на изобретението лежи наблюдението, че ако протеин (протеинът, или POI), който е включен по някакъв начин в контрола на клетъчния растеж, се възпроизведе в клетките, тогава фармакологични агенти, които могат да активират или да инхибират протеина /POI/, могат да доведат до изменение в растежа на клетките.

Чувствителността на клетките зависи от производството им на протеин /POI/, явление, което се споменава като "степенуван клетъчен отговор" на фармакологичноактивния агент.

Методът съгласно изобретението осигурява бърза и сигурна система за анализ, с която се откриват и идентифицират както инхибитори, така и активатори на протеини. Методът е приложим към всеки тип протеини, включително към ензими, рецептори, ДНК- или РНК-свързани протеини, или към други, които са пряко или косвено включени в регулирането на клетъчния растеж.

Методът се състои във включване на ДНК (или кДНК) кодираща последователност на протеина (POI) в съответен вектор и култивиране на клетъчни линии, които съдържат или само вектор на експресия ("контролни" клетъчни линии), или вектор на експресия, съдържащ включената ДНК) или кДНК) кодираща последователност на протеина ("опитни" клетъчни линии). Като се използва подходяща векторна система, рецепиентни клетъчни линии и подходящи условия за растеж, опитните клетъчни линии могат така да се култивират, че стабилно да се възпроизвежда съответният протеин (POI). При подходящи условия на растеж тези клетъчни линии показват "степенуван клетъчен отговор" към активаторите или инхибиторите на POI. Системата за анализ може така да бъде въведена, че контролните и опитните клетъчни линии да се размножават в определени условия за растеж

в блюдата с тъканна култура (или дори в експериментални животни) и голям брой съединения (или суровини, които могат да съдържат активни съединения) могат да бъдат проучени за влиянието им върху POI.

Вещества, които инхибират или активират POI могат да влияят върху характеристики, като скорост (степен) на растеж, туморообразуващ потенциал, антитуморообразуващ потенциал, антиметастазен потенциал, клетъчна морфология, антигенна експресия и/или независимо свързваща нарастваща способност. Веществата, които специфично инхибират или инактивират POI, могат да се разграничат от веществата, които влияят върху клетъчната морфология или растежа чрез други механизми, с които те ще окажат по-силен ефект върху опитните линии, отколкото върху контролните линии.

Системата е изпробвана, като се използват няколко кДНК-последователности и няколко рецепентни клетъчни линии и може да се автоматизира лесно.

Настоящият метод е предназначен за използване при идентифициране на потенциални инхибитори или активатори на ензими, рецептори или други протеини, които оказват влияние върху клетъчния фенотип. Този метод изисква две клетъчни линии, за предпочитане еднакви с изключение на тях като производителност на протеин, в различни съдържания (и всички други разлики, налагащи тази разлика в изразяване). Инхибитори и активатори се идентифицира по техния по-голям ефект върху фенотипа на по-силно продуциращата клетъчна линия.

Може да бъде изследвана всяка фенотипна характеристика на клетката, която е повлияна от отразяването на представляващия интерес протеин (POI), разбира се различно от съдържанието на самия протеин. Фенотипната характеристика е за предпочитане културална или морфологична характеристика на клетката. За целите на приложените претенции, тези термини се определят както следва.

Културалните характеристики включват, без да са ограничени до, хранителни вещества за растежа, хранителни вещества, които въпреки че не се изискват за растежа го поощряват изразено, физически условия (температура, pH, газова околна среда, осмотично състояние и зависимост или независимост от закрепва-

нето) на културата, която оказва влияние върху растежа или веществата, които инхибират растежа или дори убиват клетките.

Морфологичните характеристики не са ограничени да включват големината и формата на клетките, тяхното подреждане, клетъчна диференциация и субклетъчни структури.

Когато представляващият интерес протеин (POI) е свързан с туморогенеза или със сходни явления, наблюдаваните белези са свързани предимно с контрол на клетъчния растеж, диференциация, дедиференциация, ракогенна трансформация, метастаза, туморогенеза или ангиогенеза.

Фенотипните промени, които могат да се наблюдават с невъоръжено око, представляват специален интерес. Промени в способността на клетките да растат по начин без закрепване, да растат в мек агар, да образуват огнища в клетъчна култура и да поемат селектирани щамове са специално подходящи фенотипи за наблюдение и сравняване.

Високопроизводителната клетъчна линия се получава предимно чрез въвеждане на ген, кодиращ представляващ интерес протеин (POI) в гостоприемниковата клетка. Генът може да е изолиран от генома на микроорганизма cDNA, получена от mRNA транскрипт, изолиран от микроорганизма или синтетичен дубликат на естествено явяващ се ген. Той може също да има последователност, която не се явява точно в природата, а по-скоро отговаря на мутация (единична или множествена) на естествено явяваща се последователност. Не се предвиждат никакви ограничения за начина, по който се получава тази мутирана последователност. Генът е работно свързан към промотор за изразяване на ген, който е функционален в гостоприемника, така че представляващият интерес протеин (POI) е стабилно "свърхпроиздуциран" в приемащите клетки в различна степен. Промоторът може да е конструктивен или индуциран. "Свърхпродукция" означава, че POI се продуцира до по-високо равнище в генетично манипулираната клетъчна линия, отколкото в оригиналната клетъчна линия. Това позволява да се създават клетъчни линии, които съдържат (или секретират) малко по-малко от няколко пъти до повече от 100 пъти по-високо количество на POI в сравнение с контролните клетки.

Може да бъде използван всеки метод за

въвеждане на ген в гостоприемниковата клетка, включително трансфекция с ретровирусен вектор, директна трансфекция (например посредствана от калциев фосфат или DEAE-декстран) и електропорация. За предпочитане се използва ретровирусен вектор.

Гостоприемниковите клетки трябва да проявяват наблюдаема фенотипна промяна като резултат от повишена продукция на POI. За предпочитане, този отговор трябва да е пропорционален на равнището на продукция на POI. Най-после, клетките трябва да манифестират спонтанно желаната фенотипна промяна. Например 3T3 клетки образуват огнища спонтанно. Между предпочитаните клетъчни линии плъх-6 фибробласти, C3H10T/12 фибробласти и HL60. (HL60 е клетъчна линия от човек, която се диференцира в отговор на РКС-активиране). Клетките 3T3 могат да бъдат използвани, но при посочената по-горе резервация.

Казано общо, за предпочитане е да се максимализира отношението на продукта чрез "свърхпроиздуцираща" клетъчна линия, за предпочитане "нативна" линия. Това се улеснява чрез селектиране на гостоприемникова клетъчна линия, която продуцира малко или никак POI и въвеждане на мултиплиени генни копия и/или използване на промотори с висок сигнал.

Плъх-6 ембрионална фибробластна клетъчна линия е вариант на плъша ембрионална фибробластна клетъчна линия, определена от (11), и изолирана от (12). Тази клетъчна линия има необичайно плоска морфология, дори когато се поддържа в култура при предсливане на продължителни периоди от време, позволява зависещ от закрепването растеж и освен това не е подложена на спонтанна трансформация. Тя също е идеална за тези проучвания, тъй като има твърде малко съдържание на ендогенна РКС-активност и ниско съдържание на високо афинитетни рецептори за фолболни естери.

Въпреки че най-предпочитаната гостоприемникова клетъчна линия е плъх-6 фибробластна клетъчна линия, този метод е изпитван с други клетъчни типове, включително мишата NIH-3T3 клетъчна линия, както и C3H10T 1/2 клетъчната линия. Таблица 1 (а) и (в) по-долу посочват представителните специфични активности на седем NIH-353 4 шест

СЗН-10Н-Т 1/2 клетъчни линии, стабилно свръхпродуциращи РКС. Извършени са експерименти с човешки HeLa клетъчна линия. Във всички случаи резултиращите клетъчни линии проявяват растежни свойства, количествено идентични с тези, описани за РКС-изразяващите плъх-6 фибробластни клетъчни линии. Поради това резултатите демонстрират явно, че при този метод могат да се използват голям брой различни типове клетки. Използваните експериментални процедури за генериране на тези клетъчни линии са също идентични с използваните във връзка с плъх-6 клетъчни линии.

Ако една клетъчна линия, в друго отношение подходяща за използване като контролна клетъчна линия, продуцира излишен РОІ, то е възможно да се инхибира тази продукция чрез инкорпориране на известен инхибитор в средата за култура както за контролната, така и за опитната клетъчна линия, като с това се постига по-благоприятно отношение на продукцията. Обратно, ако е твърде ниско, може да бъде инкорпориран известен активатор в средата за култура.

Желателно е, но не и наложително, един предполагаем инхибитор или активатор да бъде изпитан както при контролна, така и при свръхпродуцираща линия успоредно.

Стремежът е повишаване на фенотипната промяна при клетката, която става по-голяма с повишаващото се изразяване на РОІ. Това се нарича "степенуван клетъчен отговор" и чрез този специализиран отговор се различават инхибитори или активатори на РОІ от агенти, които действат чрез други клетъчни метаболити за причиняване на фенотипна промяна.

Така, при едно предпочитано приложение клетъчните линии се преценяват за техните относителни съдържания на РОІ и тяхната пригодност да растат в независима от закрепването система (например матрици от мек агар или метоцел), за образуване на малки "огнища" (зони от плътни групи клетки, сбити заедно и растящи една върху друга) в бюда с тъканни култури за получаване на селектирани щамове или за свързване на подходящо белязано антитяло или друг рецептор за клетъчен повърхностен епитоп. Допълнително за проявяване на тези растежни контролни ненормалности такива клетъчни линии ще бъдат

също чувствителни в техните растежни свойства към химически агенти, които са пригодни за свързване към или модифициращи биологичните ефекти, на РОІ.

Методът е специално уникален по това, че той може да бъде използван за бързо търсене или на активатори, или на инхибитори на даден РОІ, в зависимост от нуждата. Терминът "активатори", както се използва в описанието, включва както вещества, необходими за РОІ, да стане активен в първото място, така и вещества, които просто акцентират неговата активност. Терминът "инхибитори" включва както вещества, които понижават активността на РОІ така и тези, които го изключват напълно. Когато един РОІ има повече от една възможна активност, инхибиторът или активаторът може да променя някоя или всичките му активности.

Използването на този метод на разделяне за идентифициране на инхибитори или активатори на ензими представлява специален интерес. Интерес представлява използването му за идентифициране на инхибитори или активатори на ензими, включени в туморогенезата и в сродни феномени, например протеинкиназа С, орнитин декарбоксилаза, циклична АМР-зависеща протеинова киназа, протеиновата киназа, доминираща в инсулина и ECF-рецептори, и ензимните продукти на различни клетъчни онкологични гени като c-Src (PP60^{src}) или c-gas (P₂₀^{cas}) гени.

Протеинкиназа С (РКС) е Ca²⁺ - и фосфолипидно зависеща серинтреонин протеинкиназа е от основно значение при контрола на клетъчния растеж. РКС се активира ендогенно чрез различни растежни фактори, хормони и невротрансмитери и е посочено, че той е високо афинитетен рецептор за форбол естествен туморен промотер както и други агенти, които имат подтикваща тумор активност /36,1/. Посочено е, че РКС фосфорилира няколко интрацелуларни протеинови субстрата, включително епидермалния растежен фактор (EGF) /19/, pp60src /14/, инсулиновия рецептор /2/, p21 /22/ и много други /36/. Няколко лаборатории са изолирали напоследък с DNA клонове, кодиращи определени форми на РКС, като демонстрират с това, че РКС е кодиран от мултигенна фамилия /40, 28, 43, 7, 33, 41 и 16/. Мултипленните форми на РКС проявяват значителна тъканна специфичност /28,5,

42 и 16/, което подсказва, че може да има подходящи разлики във функциите на всяка от определените форми. Обаче, всичките клонове на cDNA, които са изолирани така досега, кодират определени форми на РКС със споделена най-малко 65% обща изведена хомоложност на аминокиселинно равнище и преходни експерименти за изразяване с някои от тези cDNA клонове показват, че те кодират серин/треонинова протеазно киназна активност, която се свързва към или се активира от форбол естерните туморни промотери /28,42/.

Използва се РКСбетал cDNA клон за настоящите проучвания поради следните причини. С изключение на мозъка, където неговото потискане е твърде високо, РКСетал се изразява в твърде ниско равнище в повечето тъкани, и неговото изразяване е фактически неоткриваемо в плъх-б фибробласти (виж по-долу). Така се приема, че тази форма максимализира фенотипните разлики между контролни клетки и клетки, свръхизразяващи въведената форма на РКС. РКСбеталната форма представлява също специален интерес, защото РКС-генната фамилия и нейният карбокситерминал проявяват най-висока обща хомоложност на каталитичната субединица на цикличния зависеща от АМР-протеинова киназа (РКАс) и цикличната зависеща от GMP протеинова киназа (РКГ) /16/. Последното наблюдение подсказва, че РКГс РКГ и беталната форма на РКС могат да имат общ прародителски серин/треонин протеинов киназен прогенатор и че допълнителните РКС гени могат да произхождат от еволюционно раздалечаване от беталната форма.

Агенти, които взаимодействат с някои структурни протеини като актин и миозин, представляват също интерес. Мутации в гените, изразяващи тези протеини, могат да се включени в туморогенезата и в метастазирането. Такива взаимодействия може да водят до промени в клетъчния фенотип, а това може да бъде преценявано по този метод.

Както е посочено в по-големи подробности по-долу, произведени са клетъчни линии, които свръхпродуцират киназа С (РКС). Тези клетъчни линии, обратно на контролните клетки, растат в мек агар дори и при липса на улесняващ тумор форбол естерен 12-0-тетрадеканойл-форбол-13-ацетат (ТРА). Посочено е, че ТРА е възможен активатор на РКС. Когато се добави ТРА към растежната среда, свръхп-

родуциращите РКС клетъчни линии растат дори по-добре и образуват значително по-големи колонии в мек агар. Освен това, изпитани са също известни инхибитори на РКС активността, които, както е предвидено, причиняват свръхпродуциращите РКС клетки да растат по-малко (или изобщо да не растат) в мек агар. Така, директното използване на този метод за идентифициране както на активатори, така и на инхибитори на генен продукт, в този случай РКС, е ясно демонстрирано.

При допълнително проучване с други гени, най-съществено С-Н-гас онкоген, каталитичната поединица на цикли г на зависеща от АМР протеинкиназа, с-DNAонкоген, и някои стус клонове, кодиращи форболестер индуциращи протеин, са получени подобни резултати. Така става ясно, че методът може да бъде генерализиран до широко разнообразие на гени, кодиращи протеин, които са включени в контрола на клетъчния растеж при голям брой клетъчни типове.

Първо, изпитана е способността на базираните на рMv7 вектори (рMv7 е предпочитан пренасящ вектор) за продуциране на няколко различни типа протеини в различни клетъчни линии. Използва се cDNA -последователността, кодираща следните протеини: хипоксантин/ гванидин фосфорибозил трансфераза (HGPRT), човешкият Т4 лимфоцитно клетъчен повърхностен антиген, човешкият Т8 лимфоцитен клетъчен повърхностен антиген и орнитин декарбоксилаза (ODC). В този случай векторът рMv7 е в състояние да продуцира високо съдържание на изразяване на подходящия ген, като с това резултира свръхпродукция на съответния протеинов продукт.

След като стана ясно, че произхождащият от рMv7 изразяващ вектор би могъл репродуцируемо да създава клетъчни линии, стабилно свръхпродуциращи протеини, тогава се изпитват допълнителни гени, които кодират протеини, различни от РКС, които са също включени в контрола на клетъчния растеж.

В първия случай се използва cDNA клон, който в сътрудничество с други е предварително изолиран и характеризиран. Този с DNA клон, означен ТРА-S1, кодира един протеин с още непозната функция. Така се изолира този клон за посочената цел на изпитване на метода при условия, когато се използва един ген, който кодира протеин с непозната функ-

ция. Тъй като е демонстрирана по-рано, че транскрипцията на TPA-S1 гена се индуцира бързо и силно след третиране на клетки с промотери на тумор като TPA /23/, изглежда че продуктът TPA-S1 играе известна роля при контрола върху клетъчния растеж, но няма допълнителни данни относно неговата функция. Така, за изследване на метода по-нататък, TPA-S1 е клониран в рMv7 изразяващ вектор, резултиращо в плазмидна конструкция, означена като рMv7-S1, и клетъчни линии са генерирани, които стабилно свръхизразяват TPA-S1 cDNA клон. Тези клетъчни линии се генерират точно, както е описано за Р6 -RKCx серии клетъчни линии посочени по-долу.

В този случай резултатите са също качествено идентични, тъй като NIH/3T3-tpaS1 клетъчните линии, които са генерирани, свръхпродуцират стабилно tpa-s1 кодиращия протеин, също проявяват независим от закрепването растеж в мек агар. Освен това този растеж е зависим от съдържанието на TPA-S1 mRNA и TPA-S1 протеин, който е синтезиран във всяка клетъчна линия. Така тези клетъчни линии могат да бъдат използвани по точно аналогичен начин при R6-RKCx серии клетъчни линии за образуване или на инхибитор, или на активатор на TPA-S1 протеин, използвайки описания метод. Трябва да бъде отбелязано освен това, че при тези експерименти е възможно да се получават клетъчни линии, свръхпродуциращи TPA-1, които проявяват ефективност при нанасяне в мек агар и то в повече от 80%, въпреки че TPA-1 генът не се явява като онкоген по стандартното определяне на последния израз.

При следващи опити се изпитва метода, като използва активирания с-H-ras онкоген (T24), отново по аналогичен начин на методиката описана тук, и отново с аналогични резултати с тези, описани както за RKC cDNA клон, така и за TPA-S1 клон. Така, методът може също да бъде използван за получаване на р21ras инхибитор. Резултатите, описани в това приложение, демонстрират директно, че методът е ясно приложим за всеки ген, който се включва по някакъв начин в контрола на клетъчния растеж.

Предпочитаният метод за избиране на протеинов инхибитор/активаторно средство според настоящото изобретение съдържа следващите ходове.

1. Конструкция на изразяващ вектор, който е в състояние да изразява представляващия интерес протеин в избран гостоприемник чрез вкарване на ген, кодиращ за този протеин в трансферен вектор. Генът може да бъде вкаран 3' или промотор вече получен чрез трансферния вектор или промотор може да бъде вкаран последователно или едновременно.

2. Въвеждането на изразяващ вектор (а) в клетки, които продуцират рекомбинантни ретровирусни частици, или директно в гостоприемникови клетки, които ще бъдат използвани за последващо избиране на средство за изпитване (резултиращите клетки се наричат тук "опитни" клетки).

Също така трансферният вектор (например векторът с липса на използвания ген и може би свързан промотор, на иначе идентичен с изразяващия вектор) се въвежда за предпочитане в гостоприемниковите клетки. Клетъчни линии, произхождащи от този последен случай, ще бъдат използвани като отрицателни контроли в последващите опити за избиране на средство. Алтернативно, немодифицираните гостоприемникови клетки може да бъдат използвани като контроли.

Ако беше използван 2а, след подходящо време (обикновено 24 ч), среди, съдържащи рекомбинантни вирусни частици, се пренасят върху гостоприемникови клетки, така че да се получат опитни или контролни клетки.

3. Опитните и контролните клетки се пренасят в селективна растежна среда, съдържаща подходящото средство, което само позволява, тези клетки, носещи изразяващия вектор и подаващ се на селектиране маркерен ген (както и генът или cDNA от експериментален интерес) да растат. След подходящо селекционно време (обикновено 7-10 дни), отделни клонове клетки (дериватни клетъчни линии) се изолират и се размножават отделно.

4. Всяка независима клетъчна линия се изпитва за равнище на продукция на POI. По този метод се създава обхват от клетъчни линии, които свръхпродуцират от няколко пъти до повече от 100 пъти съдържание на POI. Успоредно, контролните клетъчни линии, които съдържат само трансферния вектор (с избираемия маркерен ген) също се изпитват за тяхното ендогенно равнище на POI.

5. Всяка независима линия се изпитва тогава за нейната способност на растеж в мек

агар (или метоцел или всеки друг подобен матрикс) за различни проценти и съдържания на различните типове растежна среда, докато бъдат идентифицирани клетъчни линии, които имат желаните растежни характеристики в сравнение с контролните клетъчни линии.

6. Всяка клетъчна линия се изпитва също за нейната пригодност да образува "огнища" или зони на плътен клетъчен растеж в блюда с тъканна култура при използване на среди, съдържащи различни проценти и типове серум (20%, 10%, 5% серум, фетален телешки серум, телешки серум, конски серум и т.н.) и при различни условия на растеж (например добавяне на други хормони, растежни фактори или други растежни добавки към средата, промени в температурата, влажността и т.н.). При тези опити клетките се поддържат след сливането за продължителни периоди от време (от две до осем седмици), като средите се сменят всеки три дни или когато се изисква). такива растежни параметри се променят, докато се идентифицират клетъчни линии, които имат желаната способност за образуване на огнища в сравнение с контролните линии при идентични условия.

7. След като се определи една клетъчна линия, имаща изискваните растежни характеристики, клетките се поставят за растеж при условията, определени в точка 5 с растежна среда, допълнена или със сурови или с пречистени вещества, които могат да съдържат биологически активни агенти, специфични за POI. Така сурови или пречистени вещества, имащи последните свойства, могат да бъдат идентифицирани бързо по тяхната способност за диференциално променяне на растежните свойства на експерименталните клетки (които свръх-продуцират POI) в сравнение с контролните клетки. Това може да бъде извършено бързо чрез просто наблюдение с невъоръжено око, тъй като, колоните, които растат в мек агар, след две седмици се виждат лесно без боядисване, въпреки че могат да бъдат боядисани за по-лесно откриване.

Също, ако се избере изследването за образуване на огнища след сливането, огнищата, които се получават след приблизително две седмици могат да бъдат лесно видяни с невъоръжено око, или тези огнища могат да бъдат боядисани. За откриване на твърде голям брой от съединения (десетки хиляди или повече),

цялата процедура може да бъде извършена върху плочки за тъканна култура с 96 гнезда. Това се прилага еднакво добре или за изследване на растеж върху мек агар, или за изследване на образуване на огнища върху тъканни култури. Резултатите от изследването могат да бъдат бързо определени чрез измерване на относителното абсорбиране на опитните клетки в сравнение с контролните клетки (при 500 нанометра или друга подходяща дължина на вълната). Отчитанията за абсорбиране могат да бъдат бързо извършени при отчитане на абсорбцията в плочка с 96 гнезда, като например отчитаща плочка "Титер-тек", или върху всеки сега достъпен аналогичен апарат. По този начин могат да бъдат преценявани хиляди съединения на месец, а тяхната биологична активност при твърде малък разход за труд и материали.

Освен това, ако антигенното изразяване варира при опитните клетки, продуциращи високо равнище на POI в сравнение с контролните клетки, може да бъде извършено свързаното с ензим имуноадсорбционно изследване (ELISA) и да се определи анти тяло специфично за антигена.

Въпреки че преценяването може да бъде извършено с една контролна линия и една опитна линия, възможно е да се използват допълнителни линии, опитни линии с различно съдържание на POI. Може да бъдат изпитвани също комплекти от контролни/опитни линии, произхождащи от други гостоприемници.

Специфичните примери, обхващащи серията от ходовете по-горе, са следните.

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. При интерес за откриване на протеиново киназаен (PKC) инхибитор клетъчни линии могат да бъдат генерирани и селектирани, които да растат в мек агар (като резултат от тяхната свръхпродукция на някоя форма на PKC) и сега показват повишаване на техния растеж при сравняване на съединенията, които е известно да стимулират, когато PKC се добави към растежната среда. Подходящи контролни клетки, разбира се, не проявяват никоя от тези характеристики. Търсенето на potentен инхибитор може да бъде чрез търсене на тези вещества, които биха могли селективно да инхибират растеж върху

мек агар (независими от закрепването) на свръхпродуциращи РКС клетъчни линии. Алтернативно, тъй като свръхпродуциращи РКС клетки оформят също малки, плътни огнища в тъканна култура, може да се търсят вещества, които инхибират образуването на огнища.

Описани са подробните страни на подходящи методики и методи, използвани за прилагане на принципите на изобретението при проблема на разработване на система, използвана за търсене на potentен инхибитор на протеинова киназа С (РКС), един високоафинитетен интрацелуларен рецептор за подтичане на туморагенти. Клетъчните линии, които се получават в резултат от прилагането на този метод, са силно чувствителни и отговарят както на агенти, които активират РКС, така и на тези, които инхибират РКС.

Конструкция на плазмид рМv7.

Конструирането на рМv7 започва с плазмид рPуогі, който съдържа полиома вирус на репликация, клонирана в уникалното BamHI място на рML-1 /31/. Този плазмид реплицира в клетки от мишка, които съдържат полиом Т антиген /8/. Плазмид рМv /44/ е разцепен с Hinc II uBg II. Фрагментът 2.29 кв, който съдържа вирус на левкемията Малоней дълги терминални повторки (LTR), опаковъчното място на разцепеното донорно място и пролинното свързващо място tRNA е изолиран.

По време на оригиналното конструиране на рМv /44/ 3.95 кв е отстранен от MSv генома чрез разцепване с PstI. Това оставя едно PstI място, съставно от 380 квS 3' от tRNA свързващо място и 380 квS от 5' края на 3' LTR (източник Reddy и сътр., 1981). Добавят се Xho I свързвачи, след като се разцепва с EcoRI и Hind III. Двата фрагмента се лигират, след активиране на свързвачите и се изолира плазмид, означен като рМv-3, който съдържа контролните елементи на вирус Малоней.

Уникалното място EcoRI е отстранено от това място на вектора чрез смятане на плазмид с EcoRI и третиране на линейните молекули с T4 полимераза. Тези молекули се рециркулирализират и се изолира плазмид, рМv-4, с липса на EcoRI място. EcoRI свързвач се вкарва в този плазмид на PstI мястото между LTPs на Молней. Разултиращият плазмид е означен рМv-5. Доминантният избираем маркер (нео) се добавя към рМv-5. Първият ход се изолира на 1.9 кв Bam HI-SalI фрагмент от

pIPBI. Този фрагмент съдържа промоторна зона на вирус Херпес симплекс тимидин киназа (tk) и кодиращата последователност за бактериален нео ген (неомицин фосфотрансфераза). Този фрагмент се свързва тъпо в края с T4 полимераза, ClaI свързвачи се добавят и фрагментът се клонира с Cla I мястото 165 квS 3' към EcoRI мястото в рМv-5, между LTPs. Този плазмид е означен рМv5-tk нео, tk промоторът има EcoRI място 70 врS 5' към началото на транскрипцията. Това EcoRI място се отстранява чрез парциално смятане на рМv5-tk нео с EcoRI, изолирайки линейната пълна дължина на нарязаната проба, запълвайки краищата с T4 полимераза и рециркулирайки молекулата. Избира се плазмид, в който EcoRI мястото, налично преди това в tk промотора се отстранява, обаче EcoRI мястото 537 врS към началото на транскрипцията на 5' LTR се оставя. Този плазмид е означен рМv7 и карта на този плазмид е посочена на фигура 1B.

Този вектор се състои от 5' и 3' мишия левкемичен вирус на Малоней (MoMuLv) LTR, от MoMuLv RNA опаковашо място 3' към 5' LTR, Eco RI клониращо място, промотор на модифицирана тимидин киназа на Херпес симплекс (с липса на Eco RI място на -79 вр) и избираем маркелен ген нео. cDNA клонове, вкарани в EcoRI клониращото място, са под транскрипционния контрол на 5' LTR, докато нео генът е независимо транскрибиран чрез tk промотора. Тази структура благоприятства поддържането на функционално интегриране на избираемия маркер без взаимодействие с изразяването на 5' (неселектирана) cDNA последователност /32,9/. Известно е, че когато различни cDNA последователности се вкарват в EcoRI мястото на рМv7, те могат лесно да бъдат пренесени в приемащи клетки чрез посредстван с вирус пасаж и продуцират стабилно, като дават висока продукция на съответния протеин.

Нуклеотидна последователност и конструкция на изразяващ вектор

Нуклеотидна последователност на РКС cDNA клон RP58, цяла дължина клон, изолиран от мозък на плъх, който отговаря на порано описания клон RP41, се постига както е описано /16/. Цялата дължина cDNA последователност на RP58, която кодира РКСбетал (фиг.1A), се субклонира в EcoRI мястото на плазмид рМv7, като се използва стандартна

методология /34/. Общата структура на рMv7 е посочена на фиг.1В. Конструкцията, резултираща от вкарването на РКСбетал ген, е означена като рMv7-РКСбетал.

Изолиране на клетъчни линии, стабилно 5
свърхпроиздуциращи РКС 20 µg свързан с CSC1 рMv7 или рMv7-РКСбетал плазмид се трансфектират (източник 13 модифициран от 51) върху подслати "PSi-2" клетки /35/. След 48 ч културалната среда се събира, филтрира се през 10
48 µm филтър и се съхранява при -70°C. Приемащи подконфлуентни плъх-6 фибробласти (5 x 10⁵ на 10 см плочка) се инфектират със съдържаща вирус среда в 2 µg /мл полиорен за 48 ч. Клетките, израсли до сливане, се 15
трипсинизират и нанесени отново Дулбеко-модифицирана среда на Eagle (DMEM), допълнена с 10% телешки серум (CS), с 200 µg /мл неомицинов дериват G418 (генетин). Резистентните колонии се клонират чрез пръстенно 20
изолиране след 1 седмица на G418 селекция.

След около десет дни на растеж в селективна среда се изолират десет отделни G418-резистентни клона и поддържат независимо в съдържаща G418 среда. Тези линии се означават като R6-РКСбетал до R6-РКСбетал10 (съкратено като R6-РКС1 до R6-РКС10). Успоредно, се получават комплект от плъх-6 линии чрез трансфекция на плазмид рMv7 (с липса на вложка РКС cDNA) върху W-2 клетки, 30
инфектиране на реципиентни плъх-6 клетки и селектиране за G418 резистентност, както е описано за плазмид рMv7-РКСбетал. Подобно, след десет дни на растеж в съдържаща G-418 среда се изолират пет отделни, добре изо- 35
лирани резистентни на G418 клона и се поддържат отделно. Тези контролни линии се означават R6-C1 до R6-C5.

Изолиране на RNA и аналитично хибридиране

Извършват се поли A + RNA изолирания, гелна електрофореза и хибридационен анализ чрез нанасяне, както е описано по-рано /17/. Маркери с молекулно тегло RNA се получават от Бетесда изследователски лаборатории. 45
Вложката 2.7 kb cDNA на RP58 (вж.по-горе) се субклонира в плазмид рKS (+) (система клониране Стратаген) за получаване на плазмид, означен като рS2-RP58. Белязана c³²P проба се получава от рS2-RP58 и използва при сил- 50
но строги условия на хибридиране, както е описано по-рано от 18).

Пречистване и изследване на РКС активност от клетки от тъканна култура

Общата РКС активност (мембранно свързана плюс цитозолна), налична в клетките от култура, се определя след парциално пречистване на клетъчни екстракти, както следва.

Три блюда 10 см със слети клетки се промиват два пъти с 10 мл ледено студен буферирани с фосфат физиологичен разтвор (PBS) и тогава се добавят 10 мл хомогенизационен буфер (20 ммол Трис, pH 7.5, 5 мола EGTA, 5-мола EDTA, 15 ммол 2-меркаптоетанол, 10µg/мл соев трипсинов инхибитор, 10 µg/мл леупептин, 40 µg/мл фенилметил сулфонил флуорид), съдържащ 0,1 процент Тритон X-100. Тогава клетките се остргват от всяко от 5
блюдата, събират се на едно място и се разрушават чрез 25 хода в хомогенизатор на Дънкан. Хомогенатът се прехвърля в 15 мл полистиренова епруветка, центрофугира се при 2000 x g за 5 мин при 4°C и надстоящата течност се поставя в 1 мл DEAE сефаделова колона, предва-
рително еквилизирана с 10 мл хомогенизационен буфер при 4°C. Колоната се промива с 10 мл хомогенизационен буфер и тогава свър- 25
заният ензим се елюира с 3 мл от хомогенизационния буфер, съдържащ 0,5 мола натриев хлорид. Общата концентрация на протеин се определя по метода на източник 4.

Наличната активност в описаните клетъчни екстракти се преценява непосредствено след изолирането. Синтетичният пептид R-K-P-T-L-R-R-L, отговарящ на аминокиселина 651-658 от рецептора на епидермалния расте- 35
жен фактор /48/, се синтезира върху модел приложни биосистеми 430А пептиден синтезатор, пречистен чрез високопроизводителна течна хроматография, лиофилизиран и съхранен при -20°C. Треонин в позиция 654 е ин- 40
виво субстрат за РКС /19,10/. Този синтетичен пептид е силно специфичен субстрат за РКС-активност ин витро /49,52/.

Пречистеният материал след това се разтваря повторно в стерилна вода до крайна концентрация от 100 мкмола и се използва като фосфоакцепторен субстрат в при РКС-преценката. Общият метод на преценяване се публикува в подробности на друго място /O'Brian и сътр., 1985/. В повечето случаи 100 мк мола синтетичен пептид се субституира с 2 мг/мл хистон III-S като фосфоакцепторния субстрат.

Клетъчни екстракти се приготвят 48 ч

след като клетките достигат сливане. Както е посочено в таблица 1 (а), осем от десетте клетъчни линии, получени чрез инфектиране с рМv7-РКСбетал (линии R6-РКС1, R6РКС3 и R6-РКС5 до R6-РКС10), съдържат изразено повишена РКС-активност в сравнение с контролните линии (R6-С1, -С2 и -С3). Заслужава да се отбележи, че клетъчна линия R6-РКС3 съдържа 53 пъти по-високо съдържание на РКС-активност отколкото има в контролните клетки. Две от линиите (R6-РКС2 и R6-РКС4) обаче не проявяват значимо повишаване на РКС-активност, дори те вероятно интегрират рМv7-РКС конструкцията както се вижда от тяхната продължаваща G418 резистентност. Последващи проучвания потвърждават, че тези две клетъчни линии съдържат премахване на cDNA клона, кодиращ РКСбетал.

При допълнителни проучвания се установи, че твърде високата РКС-активност в екстракти от R6-РКС3, наблюдавана при наличност на 1 ммол Ca^{2+} и фосфатидилсерин, е също налична в присъствие на 1 ммол EGTA, 100 нг/мл ТРА и фосфатидилсерин. Тази твърде висока активност се наблюдава също, когато се използва хистон III-S. Освен това, дори след 24 седмици на непрекъснат растеж и серийно пасиране, клетъчните линии R6-РКС1 до R6-РКС10 проявяват по същество същото равнище на РКС-активност, посочено в таблица 1.

Аутофосфорилиране и гелна електрофореза на РКС

Клетъчни екстракти, пречистени както е описано, се инкубират при условия, които благоприятстват аутофосфорилирането на РКС, както следва. 100 мкг от частично пречистен протеинов екстракт се инкубира в реакционна смес, съдържаща 80 мкг/мл фосфатидилсерин, 1 ммол CaCl_2 (или ммол EGTA и 100 нг/мл ТРА), 5 ммол MgCl_2 и 30 мк мола АТР, съдържащ 100 μCi (глава- ^{32}P) АТР (Ню Ингленд нуклеар, NEG035). Чистотата на радиоактивната АТР е съществена за получаване на репродуцируемо аутофосфорилиране на РКС.

При тези условия се посочва по-рано, че РКС претърпява реакция на аутофосфорилиране на няколко места върху интактния ензим /49,20/.

Реакциите са при инкубиране при стайна температура за 10 мин и тогава спирани чрез добавяне на SDS-PAGE натоварващ буфер,

съдържащ 2-меркаптоетанол. Този материал се подлага на непрекъснат SDS-PAGE чрез модифициране на метода /29/. Двадесет мкг от общия протеин се поставя върху всяка пътека.

5 След електрофореза геловите се фиксират в 50% оцетна киселина, 10% етанол, изсушени и ауторадиографираны върху Кодак XAR-5 филми.

Ауторадиограмите на тези гелове (фиг.2) 10 показват, че екстрактите, получени от четири клетъчни линии, които имат висока РКС-активност xP6-RKC1, -RKC3, RKC5 и -RKC6, виж таблица 1 (а), проявяват изразена фосфорилирана протеинова ивица, която е около 75 15 kd в големина, отговаряща на мястото на един аутофосфорилиран препарат на РКС, получен от плъши мозък /20,16/. Когато се изследва в имунонамазване, тази 75 kd ивица също реагира с антитяло на бетална форма на РКС /21/. Контролните клетъчни линии P6- 20 C1, -C2 и -C3 и клетъчните линии R6-РКС2 и РКС4, които нямат повишено съдържание на РКС (вж.таблица 1 (а), не показват тази 75 kd фосфорилирана ивица (фиг.2), нито пък те съдържат 25 някоя ивица, която да реагира с антитяло на беталната форма на РКС. Интересно е, че получените проби от четирите линии, които продуцират високо равнище на РКС също проявяват по-слаби, но изразени фосфорилирани протеинови ивици, които са около 73, 60 30 и 43 kd в големина, които не са наблюдавани (или само слабо откривани) в екстракти от клетки, които нямат повишени равнища на РКС (фиг.2). Тези ивици могат да представляват фрагменти на разрушаване на 75 kd РКС 35 молекули или специфични клетъчни протеини, които са фосфорилирани чрез РКС.

Описаните фосфорилирани протеинови ивици се наблюдават, когато се използва или 1 ммол 40 Ca^{2+} плюс фосфатидилсерин или 100 нг/мл ТРА плюс фосфатидилсерин като кофактори за РКС-активиране (сравни четни и нечетни номерирани пътеки във фиг.2). Когато обаче екстракти от клетъчни линии, продуциращи високи 45 равнища РКС, се инкубират при аутофосфорилираща реакция при липса на такива кофактори, 75 kd ивицата и допълнителни помалки ивици, описани по-горе, не се откриват. Тези резултати, взети заедно с отрицателните 50 резултати, получени с екстракти от контролни клетки (фиг.2), показват явно, че фосфорилираните ивици отразяват РКС-активност.

Свързващи форбол естер (^3H -PDBU) проучвания

Тъй като е посочено, че PKC е силно афинитетен рецептор за форбол естерни промотори за тумор (за обзор вж. /36/), изследва се също подкомплект от клетъчните линии за ^3H -PDBU свързване, използвайки описано по-рано изследване на интактна клетка /15/.

Клетките се нанасят в количество 1×10^5 за 4 см кладенче през първия ден, средата се сменя през втория ден и клетките тогава се изследват през третия ден. Еднослойт се промива с 4 мл DMEM (без серум), тогава се добавя 2 мл DMEM, съдържащ 60 нанола ^3H -PDBU (Ню Ингленд Нуклеар; 8,3 Ci /нано-мол) и блюдата се инкубират за 1 час при 37°C за определяне на общото свързване. Фракцията от общото свързване, което представлява специфичното свързване, се определя чрез добавяне на 1000 пъти излишък от набелязан PDBU към материала ^3H -PDBU /15/. Блюдата се промиват 3 пъти с по 4 мл ледено студен PBS. Клетките се разтварят в 1 мл 1%-ов SDS/10 ммола DTT за 2 ч при 37°C . Лизатите се пренасят в сцинтиляционна стъкленница и се изброяват. Използват се повторни блюда за определяне броя на клетките за блюдо и специфичните данни за свързване се изразяват като нмола ^3H -PDBU свързани/ 10^6 клетки. Извършват се анализи Скачард, както е описано по-рано /15/.

Установи се, че R6-PKC клетъчни линии 1,3,5 и 6, всичките от които с висока PKC ензимна активност, също имат изразено повишение на ^3H -PDBU свързване, докато клетъчните линии R6-PKC4, които не проявяват значимо повишаване на PKC-активност, не показват повишаване на ^3H -PDBU свързване при сравняване с двете контролни клетъчни линии R6-C1 и R6-C2 (таблица 1(a)). Анализите по Скачард на контролните клетъчни линии R6-C1 и на R6-PKC3 клетъчни линии, извършени както е описано /15/, показват, че броят на високо афинитетни рецептори в двете клетъчни линии е $1,6 \times 10^5$ и $1,4 \times 10^6$ съответно. Афинитетните константи са приблизително същите в двете клетъчни линии ($K_d = 16$ нмола). Така, при условията на изследване, които се използват R6-PKC3 клетките съдържат около 10 пъти равнището на афинитет на форболестерните свързващи места, отколкото контролните клетки. Явно е, че клетъчните линии, ко-

ито изразяват високи равнища на PKC, имат също значимо повишаване на свързващи форболестер места.

Изследване на PKC-сходни RNA транскрипти

С оглед на горните резултати, представя интерес да се анализира поли A+RNA фракцията на няколко от описаните клетъчни линии в таблица 1(a) за големината и изобилието на RNA транскрипти, съдържащи последователности, хомоложни на PKC бетал.

Поли A+RNA се сепарира върху 1% захароза, 6% формалдехиден гел, нанася се върху найлонови мембрани, хибридиизирана към белязана с ^{32}P DNA проба, получена от цяла дължина PKCбетал cDNA и ауторадиографирана, както е описано по-рано /16/. Както е посочено на фиг.3, линиите, които съдържат повишени равнища PKC-активност (Re-PKC1, -PKC3, -PKC5 и -PKC6, вж. таблица 1 (a) съдържат изразено 6.6 кв RNA видове, които отговарят на предвиденото място за mRNA транскрипт, който започва в 5' LTR и завършва в 3' LTR на pMv7-PKCбеталната конструкция. Този транскрипт е най-изобилен в R6-PKC3 клетъчната линия (фиг.3), която също изразява най-високо равнище на PKC-активност (таблица 1).

От друга страна, линиите R6-PKC2 и R6-PKC4, които показват незначително повишаване на PKC-активност таблица 1(a), продуцират разклонени mRNAs с приблизително съответно 5 кв и 4,8 кв. Изобилието на последните транскрипти е много по-малко от 6,6 кв, налични в клетъчните линии, които изразяват високи равнища на PKC. NeO^+ фенотип и липсата на PKC-активност в клетъчните линии R6-PKC2 и Re-PKC4 подсказва, че разклонените mRNAs отразяват премахването на PKC кодиращата последователност в инетгрираните конструкции, носени от тези клетъчни линии. Фактически, геномната DNA-хибридизация на клоновете R6-PKC2 и R6-PKC4 показва, че те съдържат премахвания в PKCбеталната cDNA последователност. Нито в родителската плъх 6 клетъчна линия, нито във всяка от експерименталните клетъчни линии, произхождащи от тези клетки, не е възможно да се открие наличност на ендогенен транскрипт хомоложен на PKCбетал пробата (фиг.3). В тези клетки има незначително изразяване на ендогенен ген, кодиращ за PKCбетал.

Преценяване за растеж в еднослойна култура и в мек агар

Клетките се посадят при гъстота от 10^4 /блюдо в серия от 60 блюда, в 5 мл ДМЕМ плюс 10% CS. 24 часа по-късно клетките в тройки блюда се трипсинизират и преброяват. Тази точка се означава като "ден 0". Останалите култури тогава се отглеждат в съответна среда (например плюс или минус 100 нг ТРА) със смяна на прясна среда два пъти седмично. Броят клетки за блюдо се определят тогава за тройки блюда по време на остатъка от растежната крива (фиг.3). Получените резултати се анализират за експоненциално дублирано време и за плътност на насищане (таблица 2). За преценяване на растежа в мек агар (независимост от закрепването) 2×10^4 клетки се суспендират в 2 мл 0,3%-ов Бакто агар (Дифко) в ДМЕМ, съдържащ 20% фетален телешки серум (FCS) и надслоени върху слой от 5 мл 0,5%-ов агар в същата среда, в 60 мм блюда Петри. Тогава клетките се надслояват с ДМЕМ плюс 20% фетален телешки серум всеки четири дни. В края на 30 дни, колонии се боядисват с витално багрило 2-(p-йодофенил)-3-(p-нитрофенил)-5-фенилтетразолинийов хлорид хидрат (INT) (Сигма кемакал Ко) за 48 ч при 37°C, в инкубатор с 5% въглероден двуокис /Shaeffer и Friend, 1976/ и броят на колонии се изброява при малка сила на инвертен фазов микроскоп. Данните се изразяват като "клонирателна ефективност", т.е. броят на колонии по-голям от 0,05 мм за блюдо $\times 100$, разделен на броя на клетките, оригинално засети в блюдо.

Откриване на известен активатор на РКС

Установи се, че клетъчни линии, които свръхпродуцират РКС проявяват засилен морфологичен отговор на 12-0-тетрадеканоил формил-13-ацетат (ТРА) и променят контрола на растежа.

Промяна в морфологията

За следващо характеризиране на фенотипните промени, които се явяват в клетъчните линии, които свръхпродуцират РКС бетал, линиите, R6-PKC3 и R6-PKC5, които съдържат 53- и 20-кратно повишаване на РКС-активността съответно, се изследват най-напред в подробности с оглед на тяхната морфология, в сравнение с контролната клетъчна линия R6-C1. Както е посочено на фиг.4, панела А, при липса на ТРА-третиране и трите клетъчни ли-

нии показват характерната фузиоформна морфология на еднослойна култура при нормална родителска плът 6 линия фибробластни клетки. 24 ч след третирането със 100 нг/мл ТРА (фиг.4, R6-C1: панела D). Контролната клетъчна линия проявява по-удължени и дендрични клетки и зигзаговидна картина, промени наблюдавани по-рано, скоро след като фибробласти от гризачи са третирани с ТРА /3/. Тези промени са много по-драматични, когато R6-PKC3 и R6-PKC5 клетки се третират с ТРА (R6-PKC3 и R6-PKC5, панела D). Това е специално изразено при R6-PKC3 клетките, което изразява най-високото равнище на РКС, тъй като те проявяват твърде дълго цитоплазмични процеси и голям брой трайни клетъчни тела.

На 48 ч след излагането на ТРА морфологията на контролната клетъчна линия R6-C1, тя се завръща на своя нормален изглед (фиг.4, панела E). От друга страна, R6-PKC3 клетките и до по-малка степен R6-PKC5 клетките продължават да проявяват променена морфология. Тогава всичките клетъчни линии се излагат на втора, прясна доза ТРА (100 нг/мл) и изследвани 24 ч по-късно (фиг.4, панела F), т.е. 72 ч след първата доза ТРА. Контролните клетки не дават отговор по отношение на морфологични промени след втората доза ТРА, докато R6-PKC3 клетките продължават да проявяват своята променена морфология, както и повишаване на клетъчната гъстота. R6-PKC5 клетките проявяват само слаби промени в морфологията като отговор на втората доза ТРА.

Както може да се предположи високото равнище на конструктивна продукция на РКС в R6-PKC3 клетъчната линия е отговорно за тяхната много засилена морфологична реакция спрямо ТРА, както и за невъзможността на тези клетки да проявяват обикновения задържащ отговор на ТРА след началното излагане. В нормални клетки, последният отговор изглежда се дължи на "понижаваща регулация" на ендогенната РКС-активност. Тъй като R6-PKC5 клетки имат междинно равнище на РКС, не е изненадващо, че техният морфологичен отговор спрямо ТРА е междинен между отговорите на контролни клетки и R6-PKC3 клетки.

Растежни криви

Представява интерес също да се определят растежните степени на тези клетки в

еднослойна култура. Подробни растежни криви се изработват за R6-C1, R6-РКС3 и R6-РКС5 клетки в 10% телешки серум и среда ДЕМ, при липса или наличност на 100 нг/мл ТРА. Получените данни са обобщени количествено в таблица 2.

При липса на ТРА контролните клетки R6-C1 проявяват най-дългото време за удвояване (26,4 ч) и най-ниска гъстота на насищане ($3,4 \times 10^6$ клетки/блюдо); R6-5 клетъчна линия има по-кратко време за удвояване (24,9 ч) и по-висока гъстота на насищане ($4,8 \times 10^6$ клетки/блюдо) и R6-РКС3 клетъчната линия има най-кратко време за удвояване (24,2 ч) и най-висока гъстота на насищане ($5,7 \times 10^6$ клетки/блюдо). Наличността на ТРА понижава времената за удвояване и също повишава гъстотата на насищане и при трите линии, но повишаването чрез ТРА е специално изразено в случая с R6-РКС3 (табл.2).

Когато клетъчните линии се поддържат при наличност на ТРА за по-дълъг период от време, R6-РКС3 клетките, но не и R6-C1 клетките, показват понижаване в клетъчната гъстота. Последният ефект се дължи на факта, че когато R6-РКС3 клетките се поддържат при висока клетъчна гъстота при наличност на ТРА, те стават по-слабо адхезивни и имат тенденцията да се отделят от блюдото.

Така, дори и при липса на ТРА R6-РКС3, клетките (които имат най-високо съдържание на РКС) и в по-малка степен R6-РКС5 клетките (които имат междинно съдържание на РКС) проявяват повишаване на техните растежни свойства, което е дори по-голямо, отколкото се наблюдава, когато R6-C1 контролните клетки се отглеждат при наличност на ТРА. Освен това, при наличност на ТРА тези разлики в растежните свойства между контролните и R6-РКС3 клетките са дори по-очевидни.

Образуване на огнища

При допълнителни проучвания еднослойни култури се поддържат при следсливане за продължителен период от време (28 дни), при смяна средата на всеки три дни, при отсъствие на ТРА. Докато контролните R6-C2 клетъчни линии остават почти еднослойни еднообразни култури, след около 21 дни R6-РКС3 клетъчната линия развива голям брой плътни огнища, които са приблизително 0,1 - 0,3 мм в диаметър (фиг.5). Освен това, R6-РКС3 културите проявяват голям брой клетки със силно ваку-

олизирана цитоплазма, която се разпръсква по целия еднослой, но не се наблюдава в R6-C2 контролните култури. Когато плътните огнища, наблюдавани в R6-РКС3 културата, се изваждат с игла и пасират след това, те растат както родителските R6-РКС3 клетки и не проявяват морфология, типична за злокачествено трансформирани клетки. Може да се мисли, че тези плътни огнища и вакуолизирани клетки отразяват по-скоро физиологични, отколкото генетични промени, причинявани от високото равнище на РКС-активност.

Растеж в мек агар

Изследват се също тези клетъчни линии за тяхната пригодност да образуват колонии в мек агар, тъй като в клетките от гризачи наличността на зависим от закрепването растеж е често в корелация с туморигенност /12/. Както е посочено на фиг.6, когато 2×10^4 клетки се нанасят в 0,3%-ов мек агар, както R6-РКС3 така и R6-РКС5 клетките образуват голям брой малки колонии, докато контролните R6-C1 клетки (и родителски плъх 6 клетъчни линии) отказват да растат и презистират като единични клетки. Освен това, когато ТРА (100 нг/мл) се добавя към агарната среда, големината на колонията и ефективността за клониране на R6-РКС3 клетките се повишават (фиг.6 и табл.2), но R6-C1 клетките отказват да растат в агар.

Ефективността за клониране и големините на колонии на R6-РКС3 културите са винаги по-големи, отколкото тези на R6-РКС5 културите, както при наличност, така и при липса на ТРА (табл.2), вероятно отразявайки по-високото равнище на РКС-активност в първата клетъчна линия. Така, става ясно, че свръхпродукцията на РКС е свързана с придобиването на независим от закрепването растеж в плъх-6клетки. Големината на клетките, образувани в агар от РКС клетъчните линии е по-малка от тази, образувана в плъх-6 клетки, трансформирани чрез с-Н-gas онкоген, които имат диаметър около 0,5 до 1,0 мм.

Следващо разделяне на активатори и инхибитори на РКС

Следващи изпитвани съединения включват промоторите на тумор телеоцидин, аплизатоксин и мезереин, всичките от които са познати като активатори на РКС /39/. Освен това, един познат инхибитор на РКС, Н-7 /

15/ също модулира растежа на клетките по очаквания начин.

Освен това този метод се използва за установяване, че антиестрогенът тамоксифен /15/, който инхибира РКС ензимната активност при безклетъчно изследване, е в състояние за пълно инхибиране растежа в агар на всички клетъчни линии, свръхпродуциращи РКС. Инхибиране на растежа на Р6-РКС3 клетки в агара при наличност на тамоксифен дава важни указания, че тамоксифен би могъл да инхибира посредствено от РКС стимулиране на клетъчен растеж.

Освен това, концентрацията на инхибитор, необходима за цялостно инхибиране растежа на всяка клетъчна линия е грубо пропорционална на количеството РКС, което се свръхпродуцира в тази специална клетъчна линия. С други думи, има директно взаимоотношение между моларното количество на инхибитор, изисквано за предотвратяване на клетъчен растеж, и моларното количество на налично РКС във всяка клетъчна линия.

Допълнително се демонстрира аналогичното взаимоотношение между моларните количества на РКС-активатори и моларните количества на РКС, налични в клетките. С други думи, има директно взаимоотношение между моларното количество активатор, изискван за стимулиране на клетъчен растеж, и моларното количество РКС, наличен в клетките. Така, тази работа определя за пръв път факта, че стабилна свръхпродукция на протеин в клетки от бозайници може да резултира в нов клетъчен фенотип (в този случай независимост от закрепване), което може да бъде директно модулирано чрез химически агенти, които взаимодействат с протеина.

Пример 2. Ако съществува интерес за търсене на potentен инхибитор на с-Н-gas онкогенен продукт (p21 протеина), тогава би могло да се генерират клетки, които растат добре в мек агар с подходящи среди и условия, кога-

то p21 се свръхпродуцира стабилно до известно равнище, но изобщо не когато p21 е наличен в див тип равнище. Търсенето на potentен p21 инхибитор тогава може да бъде извършено както е описано в пример 1.

Пример 3. Същите основни методики се прилагат също при гени (или cDNA последователности), които са мутирани или в лабораторията (например насочена към място мутагенеза) или като резултат от естествено явяващи се явления. Така, всяка от познатите точкови мутации в gas онкоген, които резултират в по-голяма пригодност на мутирания ген да трансформира нормални клетки до канцерозни такива, би могла да бъде използвана в същите основни процедури, както е описано.

Следващи модификации

Използването на всеки изразяващ вектор, пригоден за стабилно свръхпродуциране на даден ген в реципиентна клетка, може да бъде успешно. Ретровирусният вектор, който се използва е специално добре пригоден за проблема, тъй като се проектира специфично за тези цели. Обаче, подобни други векторни системи биха действали също. Следователно, може да се извършва котрансфекция на експериментален ген, интересен в един плазмиден вектор заедно с втори плазмид, съдържащ избираем маркерен ген (отколкото, когато има както експериментален ген, така и избираем маркерен ген върху същия плазмиден вектор). Това е по-трудно и по-малко ефективно, отколкото използване на pMv7 вектор, но то би действало до известна степен.

Всяка растежна среда, допълнително към мек агар или метоцел, която има тенденция да поощрява растежа на нормални, нетрансформирани клетки, може също да бъде използвана.

Култура E.coli DN1 носеща плазмид, означен като pMv7-RP58 (pMv7-РКС бетал), е депозирана от Будапест Трети в Американската сбирка тип култури, ATCC № 67654.

Таблица 1 (а)

PKC-активност и форболестерно свързване в плъх 6 клетки, инфектирани с рMv7 или рMv7-PKCбетал конструкции

Клетъчна активност	PKC-активност, специфична активност (пико-мола/мин/мг протеин)	Кратно повишаване по отношение на контрола	3H-PDBU свързване (пикомола/10 ⁶ клетки)
R6-C1	100	-	1.6
R6-C2	85	-	1.3
R6-C3	150	-	1.5
Средно и ст.откл.	100+34	1	
R6-PKC1	2480	23	12.7
R6-PKC2	85	1	НИ
R6-PKC3	5840	53	9.9
R6-PKC4	190	2	0.7
R6-PKC5	2200	20	5.8
R6-PKC6	4600	42	7.1
R6-PKC7	2150	20	НИ
R6-PKC8	3280	30	НИ
R6-PKC9	4990	45	НИ
R6-PKC10	5050	46	НИ
НИ = неизследвано			

Таблица 1(в)

PKC-активност в NIH-3T3 клетъчни линии, инфектирани с рMv7 или рMv7-PKCбетал конструкции

NIH-3T3 клетъчни линии повишаване (контроли) Контрола	PKC специфична активност 1 (пикомола/мин/ мг порт)	Пъти в сравнение с
3T3-C1	110	-
3T3-C2	150	-
3T3-C3	90	-
Средно +/-станд.откл., контролни линии NIH-3T3	115+/-30	
Свърхпродуциращи PKC клетъчни линии		
3T3-PKC1	2750	22
3T3-PKC2	3640	32
3T3-PKC3	1960	17
3T3-PKC4	1240	11

3T3-PKC5	4190	36
3T3-PKC6	2110	18
3T3-PKC7	5050	44

Таблица 1 (с)

PKC-активност в C3H-10T1/2 клетъчни линии, инфектирани с рMv7 или рMv7-PKCбетал конструкции

С3Н-10Т1/2 клетъчни линии повишаване (контроли)	PKC специфична активност (пикомола/мин/ мг прот)	Пъти по отношение на
Контрола		
C3H-C1	115	-
C3H-C2	155	-
C3H-C3	230	-
C3H-C4	185	-
Средно + /- ст.откл.	145 +/-30	
C3H-10T1/2		
Свърхпродукция на PKC клетъчни линии		
C3H-PKC1	2340	16
C3H-PKC2	5010	35
C3H-PKC3	950	7
C3H-PKC4	1360	9
C3H-PKC5	4340	30
C3H-PKC6	7460	51

Легенда към таблица 1

Контролни клетъчни линии се получават чрез инфектиране на плъх-6-фибробласти, NIH-3T3 и C3H-10T1/2 клетъчни линии с рMv7 вектор (с липса на вложка PKC cDNA), при което PKC-свърхпродуциращи клетъчни линии се получават от плъх-6-фибробласти, NIH-3T3 и C3H-10T1/2 клетки, инфектирани с рMv7-PKCбета конструкция, както е описано по-горе. Общата PKC-активност се пречиства парциално от всяка клетъчна линия и преценява за наличност на 1 ммол Са 2+ и 80 мкг/мл фосфатидилсерин, при използване на синтетичния пептид R-K-R-T-L-R-R-L като субстрат. Специфичната активност се съобщава като количество на инкорпориране на ³²P в синтетичния пептиден субстрат на мг протеин за минута. Всичките изследвания се извършват с повторка и варират с по-малко от 10%.

Таблица 2

Растежни свойства на плъх-6-клетъчни линии, свръхпродуциращи РКС и техните отговори спрямо третиране с ТРА

Клетъчна линия	Добавка ТРА	Растеж в култура		:Агар	Големина на
		Еднослойна	Плътност		
		Време за удвояване	на насищ. (%) ($\times 10^6$)	Ефективност колония (мм)	
R6-C1	-	26,4	3,4	: 0	-
(контрола)	+	24,6	4,2	: 0	-
R6-PKC3	-	24,2	5,7	: 25,1	0,10-0,15
(опит)	+	21,5	10,0	: 29,7	0,15-0,35
R6-PKC5	-	24,9	4,8	: 17,3	0,05-0,10
(опит)	+	22,9	7,0	: 34,7	0,10-0,15

Таблица 2. Клетките се отглеждат както е описано. "Времената за удвояване" се отнасят до началната експоненциална фаза на клетъчен растеж и "плътност на насищане" представлява броя клетки за 6 см блюдо на ден 11. Данните са взети от експериментите, посочени на фиг.3.

Таблица 3

Инхибиране на растежа в агар на свръхпродуциращи РКС клетъчни линии при използване на различни инхибитори

Инхибитор	Клетъчна линия	Концентр. инхиб. (мкМ)	Ефективност на растеж в агар (%)
H-7	R6-PKC3	0	27
H-7	R6-PKC3	2	25
H-7	R6-PKC3	5	22
H-7	R6-PKC3	10	17
H-7	R6-PKC3	50	4
H-7	R6-PKC3	100	0
H-7	R6-PKC5	0	20
H-7	R6-PKC5	2	21
H-7	R6-PKC5	5	16
H-7	R6-PKC5	10	4
H-7	R6-PKC5	50	1
H-7	R6-PKC5	100	0
Тамоксифен	R6-PKC3	0	25
Тамоксифен	R6-PKC3	5	27
Тамоксифен	R6-PKC3	20	22
Тамоксифен	R6-PKC3	50	15
Тамоксифен	R6-PKC3	100	6
Тамоксифен	R6-PKC3	200	0

Тамоксифен	R6-PKC5	0	19
Тамоксифен	R6-PKC5	5	19
Тамоксифен	R6-PKC5	20	17
Тамоксифен	R6-PKC5	50	8
Тамоксифен	R6-PKC5	100	0
Тамоксифен	R6-PKC5	200	0
Стауроспорин	R6-PKC3	0	29
Стауроспорин	R6-PKC3	0,001	29
Стауроспорин	R6-PKC3	0,005	26
Стауроспорин	R6-PKC3	0,10	15
Стауроспорин	R6-PKC3	0,050	7
Стауроспорин	R6-PKC3	0,250	0
Стауроспорин	R6-PKC5	0	22
Стауроспорин	R6-PKC5	0,001	21
Стауроспорин	R6-PKC5	0,005	17
Стауроспорин	R6-PKC5	0,010	10
Стауроспорин	R6-PKC5	0,050	2
Стауроспорин	R6-PKC5	0,250	0

Изведената последователност на аминокиселини започва с първия метионинов кодон в позиция 91 и той кодира аминокисел протейин 671 с предсказано молекулно тегло 56,8 kd. Съгласуваният полиаденилазоцианен сигнал е подчертан.

Описание на приложените фигури

Фигура 1 В показва получения в ретровирус cDNK (= вкарана DNK) изразяващ вектор, получен в лабораторията, който се използва при настоящите проучвания. KP58 cDNK-бетал (посочен в 1 А) се получава в EcoRI мястото на плазмиди pMv7. Засенчената зона представлява кодиращата последователност. "Е" и "Р" означават съответно EcoRI и PStI рестрикционните места. Посочените места между рестрикционните места в RP58 cDNK са посочени в килобази. "LTP" означава 5' (ляво) и 3' (дясно) дългата терминална повторка на вируса на мишата левкемия Maloney, а "ТК-нео" означава промоторната зона на HSV тинамидния киназен ген, свързан към 5' края на бактериалния неомицинов фосфотрансферазен (нео) ген.

Фигура 1-С посочва в схематична форма общата стратегия, използвана за получа-

ване на клетъчна линия свръхпролиферираща РКС.

Фигура 2. Пречистване и аутофосфорилиране на РКС. РКС-активността на всяка клетъчна линия се пречиства и подлага на реакционни условия, благоприятни за аутофосфорилиране на РКС. След реакцията на аутофосфорилиране, пробите протеин се сепарират чрез непрекъсната електрофореза върху полиакриламиден гел. В пътеките тек номера на реакционните смеси, съдържащи 1 ммол Ca²⁺ и фосфатидилсерин за активиране на РКС и в пътеките, носещи четни номера, реакционните смеси съдържат 1 ммол EGTA, 100 нг/мл ТРА и фосфатидилсерин. Номерата в левия край посочват местата на маркерите за молекулно тегло в kd. Стрелките посочват положението на 75 kd аутофосфорилиран РКС.

Фигура 3. Хибридизационен анализ Northern Blot. Поли А + RNA се изолира от посочените клетъчни линии и се сепарира върху 6% формалдехид/ 1% агарозни гелове. Нанесени върху найлонова мембрана и хибридизирани с белязан с ³²P пълна дължина проба RP cDNA, както е описано по-рано [16]. Бройките в десния край посочват местата в кв

на RNA-маркера. R6-PKC4 пробата проявява твърде слаба, 4,8 кв лента върху оригинална ауторадиограма.

Фигура 4. Морфологични отговори на клетъчните линии, третирани с форбол, източно третирани. Почти слети култури на трите посочени линии се излагат на 100 нг/мл TPA в 0,1% диметилсулфоксиден (DMSO) разтворител ("++TPA") или в 1% DMSO сам ("--TPA") плюс 10% CS. Правят се фотоснимки 24 ч по-късно (панели А и D) и 48 ч по-късно (панели В и Е). Прясна среда плюс или минус TPA се добавя тогава и се правят фотоснимки след допълнителни 24 часа (панели С и F). Увеличение 100 х.

Фигура 5. Растежни криви на контролни и продуциращи РКС клетъчни линии. Посочените клетъчни линии се посаждат в 1×10^4 на 6-сантиметрово блюдо в DMEM плюс 10% CS, при наличност на ("++TPA") и липса на ("--TPA") на 100 нг/мл TPA. Определя се броят клетки в повторки блюда през проследявания 11-дневен растежен период. Посочените стойности показват средните стойности от трикратни определения, които варират с по-малко от 10%.

Фигура 6. Образуване на огнища след сливане. Контролните R6-C2 клетки (панела А) и R6-PKC3 клетки (панели В и С) се култивират до сливане и след това се поддържат за допълнителни 28 дни в DMEM плюс 10% CS (без TPA), при добавяне на прясна среда всеки три дни. Правят се фотоснимки в края на 28-дневния период, увеличение 40 х.

Фигура 7. Растеж в мек агар. Клетъчни линии R6-C1, R6-PKC3 и R6-PKC5 се посаждат в блюда Петри 60 мм в 0,3%-ов агар, съдържащ DMEM + 20% FBS и 50 нг/мл G418 плюс или минус 100 нг/мл TPA. Правят се фотоснимки след 21 дни на растеж (А) R6-C1 + TPA (поле със слаба сила) (В) R6-C1 + TPA (поле със средна сила) (С) R6-PKC3, (D) R6-PKC3 + TPA, (Е) R6-PKC5, (F) R6-PKC5 + TPA. За допълнителни подробности вж. в експериментална процедура, увеличения 100 х в панел, В; 40 х във всички други панели).

Патентни претенции

1. Метод за откриване на инхибитори активатори на протеин, чието продуциране от клетката предизвиква съответно изменение във фенотипната характеристика, различно по сте-

пен от това, което предизвиква самият протеин в клетката, характеризиращ се с това, че: а/ се получава първична клетъчна линия, която продуцира протеина и дава фенотипния отговор към протеина; б/ след което се получава вторична клетъчна линия, която продуцира протеина в по-малка степен от първичната клетъчна линия или избягва продуцирането на протеина и която дава (показва) по-слаб отговор към протеина или избягва отговор; в/ инкубира се вещество с първични и вторични клетъчни линии; и г/ сравнява се фенотипният отговор на първичната клетъчна линия към веществото с фенотипния отговор на вторичната клетъчна линия към същото.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът се наблюдава с просто око.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в културалната или морфологична характеристика на клетката.

4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в способността на клетъчната линия да нараства по модела на независимо свързване.

5. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в способността на клетъчната линия да нараства в мек агар.

6. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в образуването на фокуси в клетъчната култура.

7. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в способността на клетките да обхванат определено (избрано) петно.

8. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че протеинът е ензим.

9. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че нарастването на активността на ензима е в съответствие с нарастването на туморообразуването.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че ензимът е протеинкиназа С или фрагмент, домен, или субединица на рецептор в протеинкиназова С активност.

11. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че ензимът е орнитин

декарбоксилаза.

12. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че протеинът е продукт на експресия на онкоген.

13. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че веществото е предпологаем инхибитор на биологичната активност на протеина.

14. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че веществото е предпологаем активатор на биологичната активност на протеина.

15. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че първичната клетъчна линия се получава чрез въвеждане на ген, кодиращ протеина, който е обект на изследване, в клетката гостоприемник, като генът е под контрола на функционален промотор в клетката гостоприемник, чрез който се получава експресия на гена.

16. Метод съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че генът се въвежда в първичната клетка гостоприемник посредством първичен генетичен вектор, в който е вмъкнат генът, и вторичната клетъчна линия се получава чрез въвеждане в подобна клетка гостоприемник на вторичен генетичен вектор, по същество идентичен на първичния генетичен вектор, освен че е лишен от способността да носи вмъкнатия ген.

17. Метод съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че генът е въведен в клетката гостоприемник посредством ретровирусен вектор.

18. Метод съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че клетъчната линия гостоприемник е лишена от възможността да продуцира протеин.

19. Метод съгласно претенция 15, характеризиращ се с това, че клетъчната линия гостоприемник е клетъчна линия на фибробласт на плъх-6.

20. Метод съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в деленето на клетката.

21. Комбиниран метод за определяне на дадено вещество като инхибитор или активатор на протеин, чието продуциране предизвиква съответно изменение във фенотипната характеристика, различно по степен от това, което предизвиква самият протеин в клетката,

характеризиращ се с това, че: а/ получава се първична клетъчна линия, която продуцира протеина и дава фенотипния отговор към него; и б/ след това се получава вторична клетъчна линия, която продуцира протеина в по-малка степен от първичната клетъчна линия или избягва продуциране на протеина и която показва по-слаб фенотипен отговор към протеина или избягва отговор.

22. Комбиниран метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че продуцираният протеин в първичната клетъчна линия е поне петкратно повече от този, продуциран във вторичната клетъчна линия.

23. Комбиниран метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че фенотипният отговор към експресията на протеина е избран от групата, включваща: изменение в степента на нарастване, плътност на насищане, ефективност на плаката в мек агар, размер на колонията в мек агар и комбинация от тях.

24. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че отговорът е изменение в антигенната характеристика на клетката.

25. Комбиниран метод съгласно претенция 21, при който отговорът се изразява в промяна в морфологията на клетката или културалните характеристики.

26. Комбиниран метод съгласно претенция 21, включващ познат инхибитор или активатор на протеини като сравнение.

Приложение: 7 фигури

Литература

1. Ashendel, C. The Phorbol Ester Receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 822,219-242.
2. Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., Koshland, D.E.Jr. (1986) Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, pp 5822-4.
3. Boreiko, C., Mondal, S., Narayan, S., and Heidelberger, C. (1980) Effect of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate on the Morphology and Growth of C3H/10T1/2 Mouse Embryo Cells. *Cancer Res.* 40, 4709-4716.
4. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of pro-

tein-dye binding.

5. Brandt, S.J., Nidel, J.E., Bell, R.M., Young, W.S. (1987) Distinct patterns of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell* 49, pp 57-63.
6. Catino, J.J., Francher, D.M., Edinger, K.J., and Stringfellow, D.A., (1985), A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 15, 240-243.
7. Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., & Ullrich, A. (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science* 233, 859-866.
8. Dailey, L., and Basilico, C. (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.* 54, 739-749.
9. Daley, G. Q., McLaughlin, J., Witte, O. N., Baltimore, D. The CML-Specific P210 bcr/abl Protein, Unlike v-abl, Does Not Transform NIH/3T3 Fibroblasts *Science* 237, pp 532-535.
10. Davis, R. J., and Czech, M.P. (1985) Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine 654. *Proc Natl. Acad. Sci.* 82, 4080-4084.
11. Freeman, A. E., Price, P.J., Igel, H.J., Young, J. C., Maryak, J.M. Huebner, R.J. (1970) Morphological transformation of rat embryo cells induced by diethylnitrosamine and murine leukemia viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, pp 65-78.
12. Freedman, V.H. and Shin, S. (1974) Cellular Tumorigenicity in nude Mice: Correlation with Cell Growth in Semi-Solid Medium. *Cell* 3, 355-359.
13. Graham, F.L., and van der Ed, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology* 52, 456-467.
14. Gould, K., L., Woodgett, J.R., Cooper, J. A., Buss, J.E., Shalloway, D., Hunter, J. (1985) Protein Kinase C Phosphorylates pp60src at a novel site. *Cell* 42, pp 849-857.
15. Horowitz, A. D., Greenebaum, E. and Weinstein, I. B. (1981) Identification of receptors for phorbol ester tumor promoters in intact mammalian cells and of an inhibitor of receptor binding in biologic fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, pp 2315-2319.
16. Housey, G. M., O'Brian, C. A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: Evidence for a protein kinase C-related gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp 1065-1069.
17. Housey, G. M., Kirschmeier, P., Garte, S. J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I. B. (1985) Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 391-398.
18. Hsiao, W.-L.W., T.Wu, Weinstein, I. B., (1986) Oncogene-Induced Transformation of a Rat Embryo Fibroblast Cell Line is Enhanced by Tumor Promoters. *Mol. Cell. Biol.* 6, pp 1943-1950.
19. Hunter, T., Ling, N., Cooper, J.A. (1984) Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* 311, 480-3.
20. Huang, K. P., Nakabayashi, H., Huang, F. L. (1986) Isozymic forms of rat brain Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8535-8539.
21. Jaken, S. and Kiley, S. (1987) Purification and characterization of three types of protein kinase C from rabbit brain cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp 4418-4422.
22. Jeng, A. Y., Srivastava, S. K., Lacal, J.C., Blumberg, P.M. (1987) Phosphorylation of ras oncogene product by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, pp 782-8.
23. Johnson, M.D., Housey, G.M., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) Molecular Cloning of Gene Sequences Regulated by Tumor Promoters Through Protein Kinase C. *Mol. Cell Biol.* 7, 2821-2829.
24. Kajikawa, N., Kishimoto, A., Shiota, M., & Nishizuka, Y. (1983) Ca²⁺-dependent neutral protease and proteolytic activation of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *Methods. Enzymol.* 102, 279-290.
25. Kawamoto, S. and Hidaka, H. (1984) 1-(5-Isoquinolinesulfonyl) -2-methyl-piperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125-258.
26. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., and Nishizuka, Y. (1982), Cal-

- cium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 257, 13341-13348.
27. Kirschmeier, P.T., Housey, G.M., Johnson, M.D., Perkins, A.S., and Weinstein, I.B. (1988) Construction and Characterization of a Retroviral Vector Demonstrating Efficient Expression of Cloned cDNA Sequences. *DNA*, in press.
 28. Knopf, J.L., Lee, M-H. Sultzman, L.A., Kriz, R. W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. & Bell, R. (1986) Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491-502.
 29. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 30. Leach, K. L., James, M. L., & Blumberg, P.<M., (1983) Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4208-4212.
 31. Lusky, M., and Botchan, M. (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* 293, 74-81.
 32. Maddon, P.J., Dalglish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., Axel, R. (1986) The T4 Gene Encodes the AIDS Virus Receptor and Is Expressed in the Immune System and the Brain, *Cell* 47, pp 333-348.
 33. Makowske, M., Birnbaum, M. J., Ballester, R., Rosen, O. M. (1986) A cDNA encoding PKC identifies two species of mRNA in brain and GH3 cells. *J.Biol. Chem.* 261, pp 13389-13392.
 34. Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. eds. (1983) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.)
 35. Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to proeuce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, 153-159.
 36. Nishizuka, Y. (1986) Studies and Perspectives of Protein Kinase C. *Science* 233, 305-312. Nishizuka, Y. (1984) The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Transduction and Tumour Promotion. *Nature (London)* 308, 693-698.
 37. O'Brian, C. A., Lawrence, D. S., Kaiser, E.T., & Weinstein, I. B. (1984) Protein kinase C phosphorylates the synthetic peptide Arg-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val in the presence of phospholipid plus either Ca²⁺ or a phorbol ester tumor promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 296-302.
 38. O'Brian, C., Arcoleo, J., Housey, G. M., & Weinstein, I.B. (1985) in *Cancer Cells* 3, eds. Feramisco, J., Ozanne, B. & Stiles, C. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 359-363.
 39. O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H. and Weinstein, I.B. (1985) Inhibition of Protein Kinase C by Tamoxifen. *Cancer Res.* 45, 2462-2465.
 40. Ono, Y., Kurokawa, T., Fujii, T., Kawahara, K., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K., Nishizuka, Y. (1986) Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. *FFBS* 206, 347-52.
 41. Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Tomoko, F., Kurokawa, T., Asaoka, Y. Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., Nishizuka, Y. (1987) Expression and Properties of Two Types of Protein Kinase C: Alternative Splicing from a Single Gene. *Science* 236, pp 1116-1120.
 42. Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokohura, H., Sakoh, T., Hidaka, H. (1987) Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature (London)* 325, pp 161-6.
 43. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., & Ullrich, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C—the major phorbol ester receptor. *Science* 233, 853-858.
 44. Perkins, A.S., Kirschmeier, P.T., Gattoni-Celli, S., and Weinstein, I.B. (1983). Design of a retrovirus-derived vector for expression and transduction of exogenous genes in mammalian cells. *Mol. Cell. biOL.* 3, 1123-1132.
 45. Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., Sacco, O., and Horecker, B.L. (1987) Phosphorylation and proteolytic modification of specific cytoskeletal proteins in human neutrophils stimulated by phorbol-12-myristate 13-acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 3604-3608.
 46. Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation. *Cell* 48, 913-922.
 47. Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1985) Screening of Agents Which

Convert "Transformed Morphology", of Rous Sarcoma Virus-Infected Rat Kidney Cells to "Normal Morphology": Identification of an Active Agent as Herbimycin and its Inhibition of Intracellular src Kinase, *Jpn. J. Cancer Res.* 76, 672-675.

48. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D., and Seeburg, P.H. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.

49. Walton, G. M., Bertics, P.J., Hudson, L.G., Vedvick, T.S., Gill, G.N. (1987) A Three-Step Purification Procedure for Protein Kinase C: Characterization of the Purified Enzyme. *Anal. Biochem.* 161, 425-437.

50. Weinstein, I. B., (1987) Growth Factors, Oncogenes, and Multistage Carcinogenesis. 20

J. Cell. Biochem. 33, pp 213-224.

51. Wigler, M., Silverstien, S., Lee, L.-S., Pellicer, A., Cheng, Y.-C, and Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11, 223-232.

52. Woodgett, J. R., Gould, K. L., and Hunter, T. (1986) Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.* 161 177-184.

53. Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A., and Stabel, S. (1987) Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244, 775-779.

54. Von Hoff, D.D., Forseth, B., and Warfel, L.E. (1985) Use of a Radiometric System to Screen for Antineoplastic Agents: Correlation with a Human Tumor Cloning System. *Cancer Res.* 45, 4032-4036.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Др.Мирчанова

Редактор: Р.Николова

Пор. 37279

Тираж: 40 ЗС

FIG. 1.

10	20	30	40	50	60														
GAA	TTC	CGC	CTC	TCC	GGG	CTT	ACA	GCC	CGC	GGT	CCC	GCC	GCC	CCG	GGG	CCG	CCA	CCT	CTC
70	80	90	100	110	120														
GGG	GCT	CCC	CCC	AGT	CCC	CGC	GCG	CGC	AAG	ATG	GCT	GAC	CCG	GCT	GCG	GGG	CCG	CCG	CCG
Met Ala Asp Pro Ala Ala Gly Pro Pro Pro																			
130	140	150	160	170	180														
ACC	GAG	GGC	GAG	GAG	AGC	ACG	GTG	CGC	TTC	GCC	CGC	AAA	GGG	CCG	CTC	CGG	CAG	AAG	AAC
Ser	Glu	Gly	Glu	Glu	Ser	Thr	Val	Arg	Phe	Ala	Arg	Lys	Gly	Pro	Leu	Arg	Gln	Lys	Asn
190	200	210	220	230	240														
GTG	CAC	GAG	GTG	AAG	AAC	CAC	AAA	TTC	ACC	GCC	CGC	TTC	TTC	AAG	CAG	CCC	ACC	TTC	TGC
Val	His	Glu	Val	Lys	Asn	His	Lys	Phe	Thr	Ala	Arg	Phe	Phe	Lys	Gln	Pro	Thr	Phe	Cys
250	260	270	280	290	300														
AGC	CAC	TGC	ACC	GAC	TTC	ATT	TGG	GGC	TTC	GGG	AAG	CAG	GGA	TTC	CAG	TGT	CAA	GTC	TGC
Ser	His	Cys	Thr	Asp	Phe	Ile	Trp	Gly	Phe	Gly	Lys	Gln	Gly	Phe	Gln	Cys	Gln	Val	Cys
310	320	330	340	350	360														
TGC	TTT	GTT	GTA	CAC	AAG	CGC	TGC	CAT	GAA	TTC	GTC	ACG	TTC	TCC	TGC	CCT	GGT	GCA	GAC
Cys	Phe	Val	Val	His	Lys	Arg	Cys	His	Glu	Phe	Val	Thr	Phe	Ser	Cys	Pro	Gly	Ala	Asp
370	380	390	400	410	420														
AAG	GGC	CCG	GCC	TCT	GAT	GAC	CCA	CGG	AGC	AAA	CAC	AAG	TTT	AAG	ATC	CAC	ACC	TAC	TCC
Lys	Gly	Pro	Ala	Ser	Asp	Asp	Pro	Arg	Ser	Lys	His	Lys	Phe	Lys	Ile	His	Thr	Tyr	Ser
430	440	450	460	470	480														
AGC	CCT	ACC	TTC	TGT	GAC	CAC	TGT	GGA	TCA	CTG	CIG	TAT	GGG	CTC	ATC	CAC	CAG	GGG	ATC
Ser	Pro	Thr	Phe	Cys	Asp	His	Cys	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Leu	Ile	His	Gln	Gly	Met
490	500	510	520	530	540														
AAA	TGC	GAC	ACC	TGT	ATG	ATG	AAT	GTC	CAC	AAG	CGC	TGC	GTG	ATG	AAC	GTC	CCC	AGC	CTC
Lys	Cys	Asp	Thr	Cys	Met	Met	Asn	Val	His	Lys	Arg	Cys	Val	Met	Asn	Val	Pro	Ser	Leu
550	560	570	580	590	600														
TGT	GGC	ACC	GAC	CAC	ACA	GAA	CGC	CGT	GGC	CGC	ATC	TAC	ATC	CAG	GCC	CAC	ATC	GAC	AGG
Cys	Gly	Thr	Asp	His	Thr	Glu	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Gln	Ala	His	Ile	Asp	Arg

FIG. 1. CONT.

610	620	630	640	650	660
GAG GTC CTC ATC GTT GTT GTA AGA GAT GCT AAA AAT CTG GTA CCT ATG GAC CCC AAC GGC					
Glu Val Leu Ile Val Val Val Arg Asp Ala Lys Asn Leu Val Pro Met Asp Pro Asn Gly					
670	680	690	700	710	720
TTG TCA GAT CCC TAC GTA AAA CTG AAA CTG ATC CCT GAT CCC AAA AGT GAG AGC AAG CAG					
Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Leu Lys Leu Ile Pro Asp Pro Lys Ser Glu Ser Lys Gln					
730	740	750	760	770	780
G ACC AAG ACT ATC AAA TGC TCC CTC AAC CCG GAG TGG AAC GAA ACC TTC AGA TTT CAG					
Lys Thr Lys Thr Ile Lys Cys Ser Leu Asn Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe Arg Phe Gln					
790	800	810	820	830	840
CTG AAG GAA TCA GAC AAA GAC AGA AGA CTG TCC GTA GAG ATC TGG GAT TGG GAC CTG ACC					
Leu Lys Glu Ser Asp Lys Asp Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp Leu Thr					
850	860	870	880	890	900
AGC AGG AAT GAC TTC ATG GGA TCT CTG TCG TTT GGG ATT TCA GAA CTA CAG AAA GCC GGA					
Ser Arg Asn Asp Phe Met Gly Ser Leu Ser Phe Gly Ile Ser Glu Leu Gln Lys Ala Gly					
910	920	930	940	950	960
GTG GAT GGC TGG TTC AAG TTA CTA AGC CAG GAA GAA GGC GAG TAC TTT AAT GTG CCG GTG					
Val Asp Gly Trp Phe Lys Leu Leu Ser Gln Glu Glu Gly Glu Tyr Phe Asn Val Pro Val					
970	980	990	1000	1010	1020
T CCG GAA GAA AGC GAG GGC AAT GAA GAG CTG CCG CAG AAG TTT GAG AGA GCC AAG ATT					
Pro Pro Glu Glu Ser Glu Gly Asn Glu Glu Leu Arg Gln Lys Phe Glu Arg Ala Lys Ile					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GGC CAA CGT ACC AAG GCT CCA GAA GAA AAG ACA GCG AAC ACT ATA TCC AAA TTT GAC AAC					
Gly Gln Gly Thr Lys Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ala Asn Thr Ile Ser Lys Phe Asp Asn					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AAT GGC AAC AGG GAC CCG ATG AAA CTG ACC GAT TTT AAC TTC CTG ATG GTG CTG GGG AAA					
Asn Gly Asn Arg Asp Arg Met Lys Leu Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GGC AGC TTT GGC AAG GTC ATG CTC TCA GAG CCG AAG GGT ACA GAT GAA CTC TAT GCC GTG					

FIG. 1. CONT.

Gly	Ser	Phe	Gly	Lys	Val	Met	Leu	Ser	Glu	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val
1210						1220			1230				1240			1250			1260
* * * * *																			
AAG	ATC	CTG	AAG	AAA	GAT	GTG	GTG	ATC	CAA	GAT	GAC	GAT	GTG	GAG	TGC	ACA	ATG	GTG	GAG
Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Cys	Thr	Met	Val	Glu
1270						1280			1290				1300			1310			1320
* * * * *																			
AAG	AGG	GTG	CTG	GCC	CTG	CCT	GGG	AAG	CCC	CCA	TTC	CTG	ACT	CAG	CTC	CAT	TCC	TGC	TTC
Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	His	Ser	Cys	Phe
1330						1340			1350				1360			1370			1380
* * * * *																			
CAG	ACC	ATG	GAC	CGC	CTC	TAC	TTT	GTG	ATG	GAG	TAT	GTG	AAC	GGG	GGC	GAC	CTC	ATG	TAC
Gln	Thr	Met	Asp	Arg	Leu	Tyr	Phe	Val	Met	Glu	Tyr	Val	Asn	Gly	Gly	Asp	Leu	Met	Tyr
1390						1400			1410				1420			1430			1440
* * * * *																			
CAC	ATC	CAA	CAA	GTT	GGC	CGT	TTC	AAG	GAG	CCC	CAT	GCT	GTA	TTT	TAC	GCT	GCA	GAG	ATT
His	Ile	Gln	Gln	Val	Gly	Arg	Phe	Lys	Glu	Pro	His	Ala	Val	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Ile
1450						1460			1470				1480			1490			1500
* * * * *																			
GCC	ATC	GCT	CTT	TTC	TTC	TTG	CAG	AGC	AAG	GGC	ATC	ATT	TAC	CGT	GAC	CTG	AAA	CTT	GAC
Ala	Ile	Gly	Leu	Phe	Phe	Leu	Gln	Ser	Lys	Gly	Ile	Ile	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp
1510						1520			1530				1540			1550			1560
* * * * *																			
AAC	GTG	ATG	CTG	GAT	TCC	GAG	GGG	CAC	ATC	AAA	ATC	GCT	GAC	TTT	GGC	ATG	TGT	AAA	GAG
Asn	Val	Met	Leu	Asp	Ser	Glu	Gly	His	Ile	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Met	Cys	Lys	Glu
1570						1580			1590				1600			1610			1620
* * * * *																			
AAT	ATC	TGG	GAT	GGG	GTG	ACA	ACC	AAG	ACA	TTC	TGT	GGC	ACT	CCA	GAC	TAC	ATT	GCC	CCA
Asn	Ile	Trp	Asp	Gly	Val	Thr	Thr	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Asp	Tyr	Ile	Ala	Pro
1630						1640			1650				1660			1670			1680
* * * * *																			
CAG	ATC	ATT	GCT	TAT	CAG	CCC	TAC	GGA	AAG	TCT	GTG	GAC	TGG	TGG	GCG	TTT	GGA	GTC	CTG
Glu	Ile	Ile	Ala	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ser	Val	Asp	Trp	Trp	Ala	Phe	Gly	Val	Leu
1690						1700			1710				1720			1730			1740
* * * * *																			
CTG	TAT	GAA	ATG	TTG	GCT	GGC	CAG	GCA	CCT	TTT	GAA	GGG	GAG	GAT	GAG	GAT	GAA	CTC	TTC
Leu	Tyr	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Gln	Ala	Pro	Phe	Glu	Gly	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Leu	Phe
1750						1760			1770				1780			1790			1800

FIG. 1. CONT.

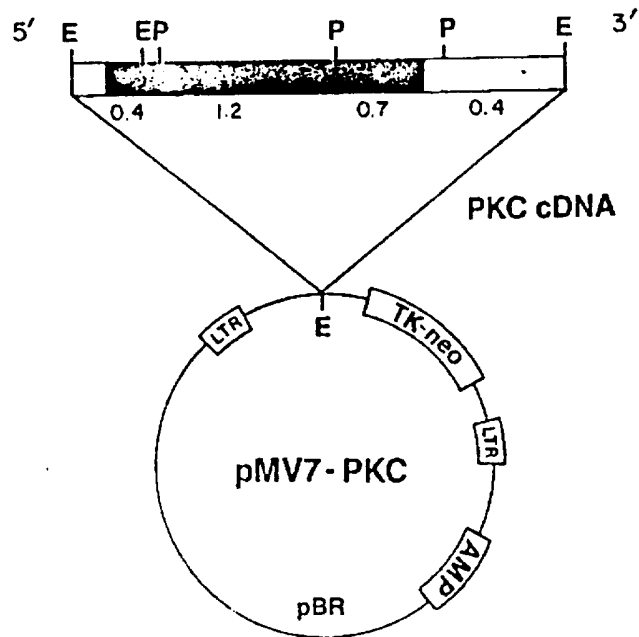
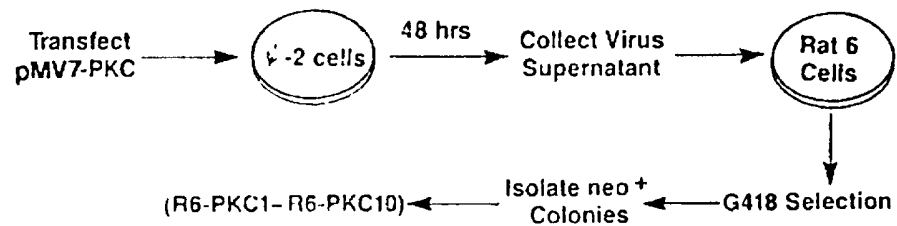
```

      *      *      *      *      *      *
CAG TCA ATC ATG GAG CAC AAC GTG GCG TAT CCC AAG TCC ATG TCT AAG GAA GCT GTG GCA
Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ala Tyr Pro Lys Ser Met Ser Lys Glu Ala Val Ala
      1810      1820      1830      1840      1850      1860
      *      *      *      *      *      *
ATC TGC AAA GGG CTA ATG ACC AAA CAC CCA GGC AAG CGC CTG GGT TGT GGG CCT GAA GGG
Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His Pro Gly Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly
      1870      1880      1890      1900      1910      1920
      *      *      *      *      *      *
GAA CGA GAC ATT AAG GAG CAT GCA TTT TTC CGG TAT ATC GAC TGG GAG AAA CTC GAA CGC
Glu Arg Asp Ile Lys Glu His Ala Phe Phe Arg Tyr Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Arg
      1930      1940      1950      1960      1970      1980
      *      *      *      *      *      *
AAG GAG ATT CAG CCA CCT TAT AAA CCA AAA GCT AGA GAC AAG CGA GAC ACC TCC AAC TTC
Lys Glu Ile Gln Pro Pro Tyr Lys Pro Lys Ala Arg Asp Lys Arg Asp Thr Ser Asn Phe
      1990      2000      2010      2020      2030      2040
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA GAG TTC ACC AGG CAG CCT GTG GAA CTG ACT CCC ACT GAC AAA CTC TTC ATC ATG
Asp Lys Glu Phe Thr Arg Gln Pro Val Glu Leu Thr Pro Thr Asp Lys Leu Phe Ile Met
      2050      2060      2070      2080      2090      2100
      *      *      *      *      *      *
AAC TTG GAC CAA AAT GAA TTT GCT GGC TTC TCG TAT ACT AAC CCA GAG TTT GTC ATT AAT
Asn Leu Asp Gln Asn Glu Phe Ala Gly Phe Ser Tyr Thr Asn Pro Glu Phe Val Ile Asn
      2110      2120      2130      2140      2150      2160
      *      *      *      *      *      *
GTG TAG GTG AAT GCA GAT TCC ATC GCT GAG CCT GTG TGT AAG GCT GCA GCG TGA ATG TCT
Val ---
      2170      2180      2190      2200      2210      2220
      *      *      *      *      *      *
ATT ATC AAT TCC AGT CTT CCA GGA TTC ATG GTG CCT CTG TTG GCA TCC GTC ATG TGG AGA
      2230      2240      2250      2260      2270      2280
      *      *      *      *      *      *
GCT TGT CTT AGA GGG CTT TTC TTT GTA TGT ATA GCT TGC TAG TTT GTT TTC TAC ATT TCA
      2290      2300      2310      2320      2330      2340
      *      *      *      *      *      *
AAA TGT TTA GTT TAG AAT AAG TGC ATT GCC CAC TGA TAG AGG TAC AAT TTT CCA GAC TTC

```

FIG. 1. CONT.

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CAG AAA CTC ATC CAA TGA ACC AAC AGT GTC AAA ACT TAA CTG TGT CCG ATA CCA AAA TGC
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 TTC AGT ATT TGT AAT TTT TAA AGT CAG ATG CTG ATG TTC CTG GTT AAA GTT TTT ACA GTT
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 ACT CTC GAA TAT CTC CTT TGA ATG CTA CCT AAG CAT GAC CCG TAT TTT TAA AAG TTG TGA
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 GTA AGC TTT GCA GTT ACT GTG AAC TCT TGT CTC TTG GAG GAA CTT TTT GTT TAA GAA TTG
 2590 2600
 GTA TGA TTA AAC TGA ATT CT

FIG. 1.
B.**FIG. 1.**
C.

R6-C1 | R6-C2 | R6-C3 | R6-PKC1 | R6-PKC2 | R6-PKC3 | R6-PKC4 | R6-PKC5 | R6-PKC6 |
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

FIG. 2

200—

97—

↑

68—

43—

FIG. 3

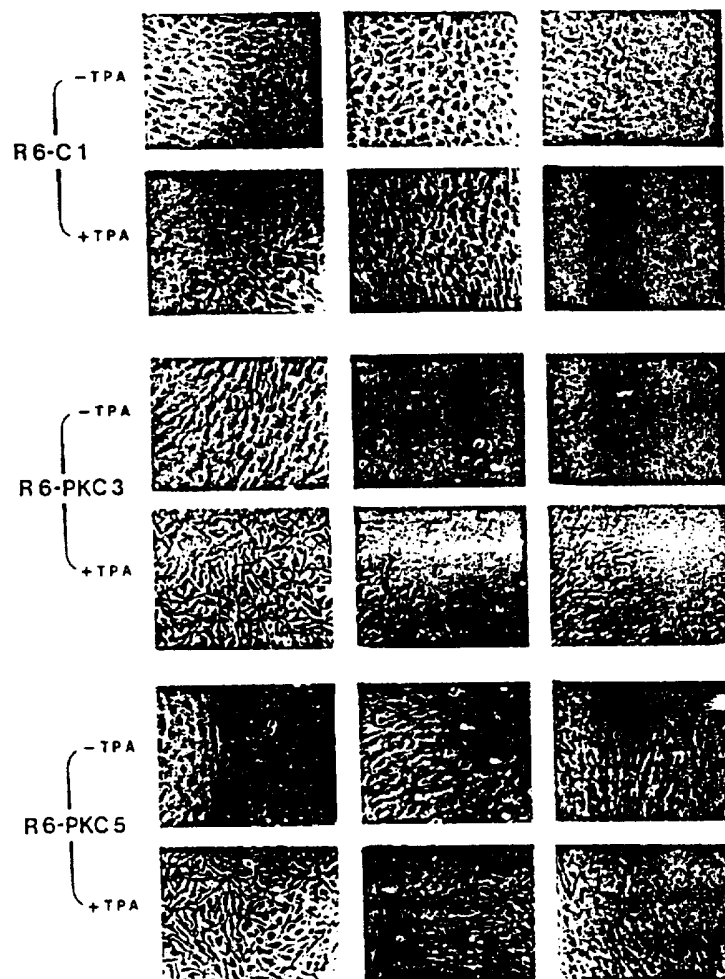
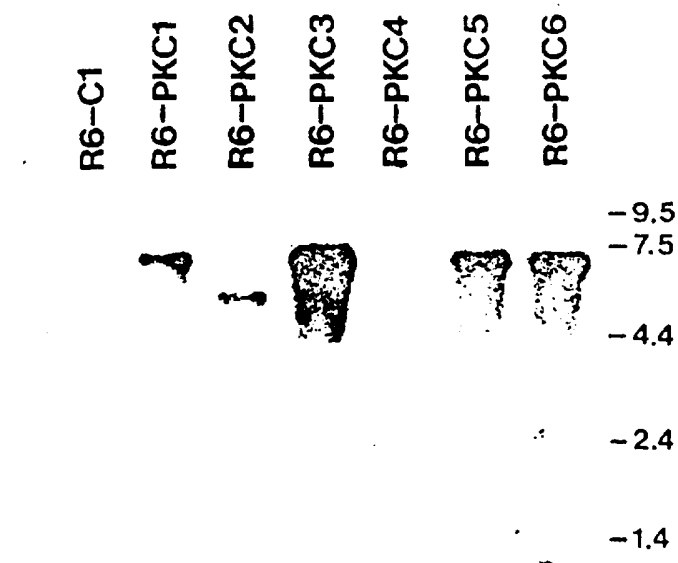


FIG. 4

FIG. 5.

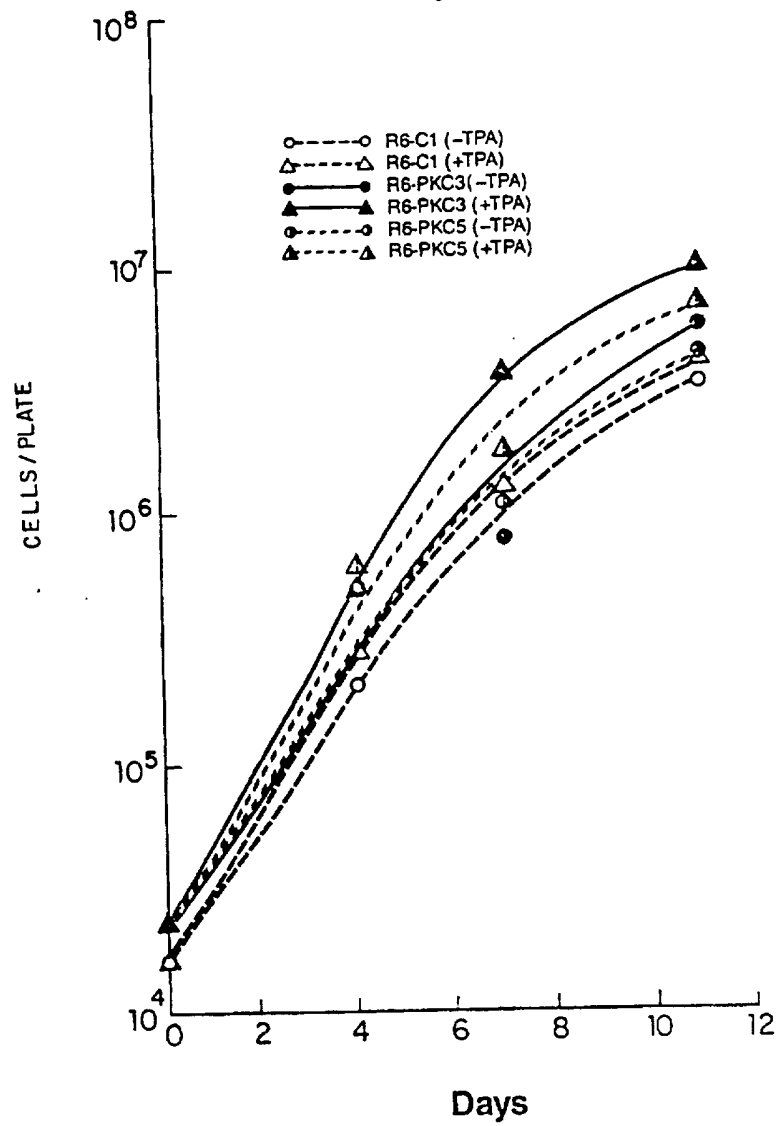


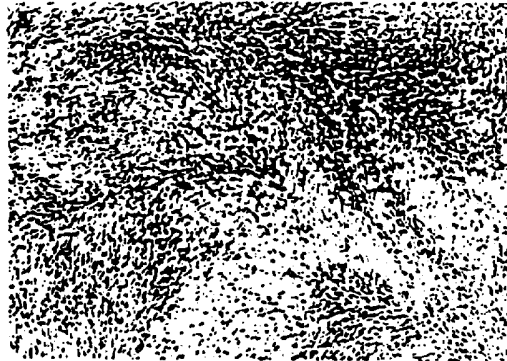
FIG. 6

FIG. 7

