

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

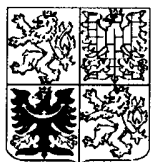
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3390-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 04. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.04.95,**
28.06.95, 31.07.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/431048, 95/496841,**
95/509359

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/CA96/00263**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/34099**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 07 K	14/47
C 12 G	1/68
A 61 K	38/18
A 01 K	67/027

(71) Přihlášovatel:

HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT
LIMITED PARTNERSHIP, Toronto, CA;
THE GOVERNING COUNCIL OF THE
UNIVERSITY OF TORONTO, Toronto, CA;

(72) Původce:

St. George-Hyslop Peter H., Toronto, CA;
Fraser Paul E., Toronto, CA;
Rommens Johanna M., Toronto, CA;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Genetické sekvence a proteiny týkající se
Alzheimerovy choroby a jejich použití

(57) Anotace:

Předkládaný vynález popisuje identifikaci, izolaci, sekvencování a charakterizaci mutací dvou lidských genů pro presenilin, PS-1 a PS-2, které vedou k Familiární Alzheimerově chorobě. Také jsou identifikovány homology genu pro presenilin u myši, *C. elegans* a *D. melanogaster*. Nukleové kyseliny a proteiny obsahující nebo odvozené od presenilinů jsou užitečné ve vyšetřování a diagnostice Alzheimerovy choroby, při identifikaci a vývoji terapeutik pro léčbu Alzheimerovy choroby a při produkci buněčných linií a transgeních zvířat užitečných jako modely Alzheimerovy choroby.

CZ 3390-97 A3

Genetické sekvence a proteiny týkající se Alzheimerovi choroby a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká oblasti neurologických a fyziologických dysfunkcí asociovaných s Alzheimerovou chorobou. Přesněji, vynález se týká identifikace, izolace a klonování genů, které jsou asociovány s Alzheimerovou chorobou, stejně jako jejich transkriptů, genových produktů, asociovaných informací o sekvenci, a příbuzných genů. Předkládaný vynález se také týká metod pro detekci a diagnostiku nosičů normálních a mutovaných alel těchto genů, metod pro detekci a diagnostiku Alzheimerovy choroby, metod pro identifikaci genů a proteinů týkajících se nebo interagujících s Alzheimerovými geny a proteiny, metod pro vyšetřování potenciálních léčiv pro léčbu Alzheimerovy choroby a buněčných linií a zvířecích modelů použitelných pro hodnocení potenciálně použitelných terapií Alzheimerovy choroby.

Dosavadní stav techniky

Pro usnadnění odkazů na různé časopisové články je seznam článků uveden na konci této přihlášky.

Alzheimerova choroba (AD) je degenerativní onemocnění lidského centrálního nervového systému charakterizované progresivním narušením paměti a snížením kognitivních a intelektuálních funkcí ve středním až pozdním věku (Katzman, 1986). Choroba je doprovázena souborem neuropatologických charakteristik, kde hlavními jsou přítomnost extracelulárního

amyloidu nebo senilních plaků a neurofibrilární degenerace neuronů. Etiologie onemocnění je komplexní, ačkoliv u některých rodin se zdá být dědičná autosomálně dominantním způsobem. Nicméně, i mezi těmito dědičnými formami AD existují alespoň tři různé geny, které udělují dědičnou náchylnost k tomuto onemocnění (St. George-Hyslop et al., 1990). $\epsilon 4$ (C112R) alelový polymorfismus genu pro Apolipoprotein E (ApoE) byl asociován s AD v signifikantním počtu případů s nástupem v pozdním věku (Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Podobně, velmi malá část familiárních případů s nástupem před 65 rokem věku byla asociována s mutacemi genu pro β -amyloid prekursorový protein (APP) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; Murrell et al., 1991; Karlinsky et al., 1992; Mullan et al., 1992). Třetí lokus (AD) asociovaný s velkou částí případů s časným nástupem AD byl nedávno mapován na chromosomu 14q24.3 (Schellenberg et al., 1992; St. George-Hyslop et al., 1992; Van Broeckhoven et al., 1992).

Ačkoliv 14q region chromosomu nese několik genů, které mohou být považovány za kandidáty genů pro umístění mutací asociovaných s AD3 (např. cFOS, alfa-1-chymotrypsin akathepsin G), většina z těchto kandidátů genů byla vyloučena na základě jejich fyzického umístění mimo AD3 region a/nebo absence mutací v jejich příslušných otevřených čtecích rámečcích (Schellenberg et al., 1992; Van Broeckhoven et al., 1992; Rogaeve et al., 1993; Wong et al., 1993).

Existuje několik směrů vývoje a komerčních zaměření nebo strategií s ohledem na léčbu Alzheimerovy choroby a její diagnostiky. Publikovaná PCT přihláška W094 23049 popisuje transfekci DNA o vysoké molekulové hmotnosti do specifických

myších buněk. Tato metoda může být použita pro analýzu velkých genových komplexů. Například, transgení myš může mít zvýšenou dávku APP genu, což napodobuje trisomický stav, který převládá u Downova syndromu, a umožňuje generování zvířecích modelů s β -amyloidosou podobnou té, která převažuje u jedinců s Alzheimerovou chorobou. Publikovaná mezinárodní přihláška WO 94 00569 popisuje transgení non-lidská zvířata nesoucí velké transgeny jako je transgen obsahující lidský APP gen. Takové zvířecí modely mohou poskytnout užitečné modely lidských genetických onemocnění, jako je Alzheimerova choroba.

Kanadská patentová přihláška č. 2096911 popisuje nukleovou kyselinu kodující APP-štěpící proteasu, která je asociována s Alzheimerovou chorobou a Downovým syndromem. Genetická informace, která byla izolována z chromosomu 19, může být použita pro diagnosu Alzheimerovy choroby. Kanadská patentová přihláška č. 2071105 popisuje detekci a léčbu dědičné nebo získané Alzheimerovy choroby za použití YAC nukleotidových sekvencí. YAC jsou identifikovány čísla 23CB10, 28CA12 a 26FF3.

U.S. patent 5297562 popisuje detekci Alzheimerovy choroby asociované s trisomií chromosomu 21. Léčba zahrnuje metody pro redukci proliferace trisomie chromosomu 21. Kanadská patentová přihláška č. 2054302 popisuje monoklonální protilátky, které rozpoznávají jaderný protein lidských mozkových buněk kodovaný na chromosomu 21 a které jsou použity pro detekci změn exprese během Alzheimerovy choroby nebo Downova syndromu. Monoklonální protilátka je specifická pro protein kodovaný lidských chromosomem 21 a je nacházena ve velkých pyramidálních buňkách lidské mozkové tkáně.

Oblast vynálezu

Předkládaný vynález je částečně založen na identifikaci, izolaci, klonování a sekvencování dvou savčích genů, které byly označeny presenilin-1 (PS1) a presenilin-2 (PS-2). Tyto dva geny, a jejich korespondující proteinové produkty, jsou členy vysoce konzervované rodiny genů, presenilinů, s homology nebo orthology u jiných savčích druhů (např. myši, krys) stejně jako orthology u bezobratlých (např., *C. elegans*, *D. melanogaster*). Mutace v těchto genech jsou spojeny u lidí s vývojem forem familiární Alzheimerovy choroby a mohou být příčinnou i jiných onemocnění (např. jiných kognitivních, intelektuálních, neurologických nebo psychologických onemocnění jako je mozkové krvácení, schizofrenie, deprese, mentální retardace a epilepsie). Předkládaný vynález poskytuje genomovou a cDNA nukleotidovou sekvenci pro lidský PS1 (hPS1) a lidský PS2 (hPS2) gen, myši PS1 homolog (mPS1) a příbuzné geny od *C. elegans* (sel-12, Spe-4) a *D. melanogaster* (DmPS). Vynález také poskytuje předpokládané aminokyselinové sekvence presenilin proteinů kodovaných těmito geny a strukturální charakterizaci presenilinů, včetně putativních funkčních domén a antigeních determinant. Množství mutací presenilinů, které jsou příčinou Alzheimerovy choroby (AD) u lidí je také popsáno a uvedeno do vztahu k funkčním doménám proteinu.

Tak v jedné serii provedení předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny včetně sekvencí nukleotidů obsahující nebo odvozené od genu pro presenilin a/nebo kodující polypeptidy obsahující nebo odvozené od presenilin proteinů. Presenilin sekvence podle předkládaného vynálezu obsahují specificky popsané sekvence, sestřižené varianty těchto sekvencí,

alelické varianty těchto sekvencí, synonymní sekvence a homologní nebo orthologní varianty těchto sekvencí. Tak například vynález poskytuje genomové a cDNA sekvence hPS1 genu, hPS2 genu, mPS1 genu a DmPS genu. Předkládaný vynález také poskytuje alelické varianty a homologní nebo orthologní sekvence poskytnutím metod, kterými mohou být takové varianty rutinně získány. Předkládaný vynález také specificky poskytuje mutantní nebo onemocnění způsobující varianty presenilinů popsáním mnoha specifických mutantních sekvencí a poskytnutím metod, kterými mohou být takové varianty rutinně získány. Protože nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro různé diagnostické, terapeutické a rekombinantní aplikace, jsou také poskytnuty různé podsady sekvencí pro preseniliny a kombinace sekvencí pro preseniliny s heterologními sekvencemi. Například, pro použití alelicky specifickým hybridizačním vyšetření nebo technikách PCR amplifikace, podsada podsady sekvencí pro preseniliny, včetně sense a antisense sekvencí a včetně normálních a mutovaných sekvencí, stejně jako intronových, exonových a netranslatovaných sekvencí, jsou také poskytnuty. Takové sekvence mohou obsahovat malý počet sousedních nukleotidů ze sekvencí, které jsou popsány nebo jinak zde podány, ale preferovaně obsahují alespoň 8 - 10, lépe 9 - 25 sousedících nukleotidů ze sekvence pro presenilin. Jiné preferované podsady sekvencí pro presenilin zahrnují ty, které kodují jednu nebo více funkčních domén nebo antigeních determinant presenilinových proteinů, zejména mohou obsahovat buď normální (divokého typu) nebo mutantní sekvence. Vynález také poskytuje různé konstrukty nukleových kyselin ve kterých jsou sekvence pro presenilin, buď kompletní nebo podsady, operativně připojeny na exogení sekvence za tvorby klonovacích vektorů, fúsních vektorů, transgeních konstruktů, a podobně. Tak, podle jiného aspektu vynález je

poskytnut rekombinantní vektor pro transformaci buněk tkáně savců nebo bezobratlých pro expresi normální nebo mutované sekvence pro presenilin.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález hostitelské buňky, které byly transfektovány nukleovými kyselinami podle předkládaného vynálezu. Buňky mohou být transformovány prostě za účelem propagace konstruktů nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu, nebo mohou být transformovány tak, aby exprivovaly sekvence pro presenilin. Transformované buňky podle předkládaného vynálezu mohou být použity v testech pro identifikaci proteinů a/nebo jiných sloučenin, které ovlivňují normální nebo mutantní expresi presenilinu, které interagují s normálními nebo mutantními presenilinovými proteiny a/nebo které modulují funkci nebo účinek normálních nebo mutantních proteinů, nebo pro produkci presenilinových proteinů, fúsních proteinů, funkčních domén, antigeních determinant a/nebo protilátek podle předkládaného vynálezu. Transformované buňky mohou také být implantovány do hostitele, včetně člověka, pro terapeutické nebo jiné účely. Preferované hostitelské buňky zahrnují savčí buňky z neuronálních, fibroblastových, splenických, organotypických, smíšených kultur, nebo z kultur kostní dřeně, stejně jako bakteriální, kvasinkové, nematodní, hmyzí a jiné buňky bezobratlých. Pro použití popsané dále preferované buňky také zahrnují ebyronální kmenové buňky, zygoty, gamety, a buňky zárodečné linie.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález modely transgeních zvířat pro AD a jiné choroby nebo onemocnění asociované s mutacemi v genech pro presenilin. Zvířata mohou

být savci, včetně krys, myší, křečků, morčat, králíků, psů, koček, ovcí, prasat, a non-lidských primátů. Kromě toho, modely bezobratlých, včetně hlístů a hmyzu, mohou být použity pro určité aplikace. Zvířecí modely jsou produkovány standartními transgeními metodami včetně mikroinjekce, transfekce, nebo jiných forem transformace embryonálních kmenových buněk, zygot, gamet a buněk zárodečné linie vektory obsahujícími genomové nebo cDNA fragmenty, minigeny, homologní rekombinantní vektory, virové inserční vektory a podobně. Vhodné vektory zahrnují virus vakcinie, adenovirus, adeno asociovaný virus, retrovirus, liposomový transport, neuraltropní virus a Herpes simplex virus. Zvířecí modely mohou obsahovat transgení sekvenční obsahující nebo odvozené od presenilinů, včetně normálních a mutantních sekvencí, intronových, exonových a netranslatovaných sekvencí, a sekvencí kodujících podsady presenilinů jako jsou funkční domény. Hlavní typy poskytovaných zvířecích modelů jsou:

- 1) Zvířata, u kterých byl normální gen pro lidský presenilin rekombinantně zaveden do genomu zvířete jako další gen, pod regulací buď exogeního, nebo endogeního promotorového elementu a a buď jako minigen, nebo jako velký genomový fragment; kde normální gen pro lidský presenilin byl rekombinantně substituován za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu; a/nebo kde jedna nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin byly rekombinantně "humanizovány" částečnou substitucí sekvencí kodujících lidský homolog homologní rekombinací nebo zaměřením genu.

- 2) Zvířata, u kterých byl mutantní gen pro lidský presenilin

rekombinantně zaveden do genomu zvířete jako další gen, pod regulací buď exogeního, nebo endogeního promotorového elementu a buď jako minigen, nebo jako velký genomový fragment; kde mutantní gen pro lidský presenilin byl rekombinantně substituován za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu; a/nebo kde jedna nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin byly rekombinantně "humanizovány" částečnou substitucí sekvencí kodujících lidský homolog homologní rekombinací nebo zaměřením genu.

3) Zvířata, u kterých byla mutantní verze jedno ze zvířecích genů pro presenilin rekombinantně zavedena do genomu zvířete jako další gen, pod regulací buď exogeního, nebo endogeního promotorového elementu a buď jako minigen, nebo jako velký genomový fragment; a/nebo kde byla mutantní verze jedno ze zvířecích genů pro presenilin rekombinantně substituována za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu;

4) "Knock-out" zvířata, u kterých byla jedna nebo obě kopie genu pro zvířecí presenilin parciálně nebo kompletně deletována homologní rekombinací nebo zaměřením genu, nebo byla inaktivována insercí nebo substitucí exogení sekvence homologní rekombinací nebo zaměřením genu. V preferovaných provedeních má transgení myší model pro AD transgen kodující normální lidský PS1 nebo PS2 protein, mutantní lidský nebo myší PS1 nebo PS2 protein, nebo humanizovaný normální nebo mutantní myší PS1 nebo PS2 protein.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález v

podstatě čisté proteinové přípravky včetně polypeptidů obsahujících nebo odvozených od presenilinových proteinů. Proteinové sekvence presenilinu podle předkládaného vynálezu zahrnují specificky popsané sekvence, varianty těchto sekvencí vzešlé z alternativního sestřihu mRNA, alelické varianty těchto sekvencí a homologní nebo orthologní varianty těchto sekvencí. Tak například, předkládaný vynález poskytuje aminokyselinové sekvence hPS1 proteinu, mPS1 proteinu a DmPS proteinu. Předkládaný vynález také poskytuje alelické varianty a homologních nebo orthologních proteinů poskytnutím metod, kterými mohou být takové varianty rutinně získány. Předkládaný vynález také specificky poskytuje mutantní nebo onemocnění způsobující varianty presenilinů popsáním mnoha specifických mutantních sekvencí a poskytnutím metod, kterými mohou být takové varianty rutinně získány. Protože proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro různé diagnostické, terapeutické a rekombinantní aplikace, jsou také poskytnuty různé podsady proteinových sekvencí pro preseniliny a kombinace proteinových sekvencí pro preseniliny s heterologními sekvencemi. Například, pro použití jako imunogen nebo v testech vazby, podsady proteinových sekvencí pro preseniliny, včetně včetně normálních a mutovaných sekvencí jsou také poskytnuty. Takové proteinové sekvence mohou obsahovat malý počet sousedních aminokyselinových zbytků ze sekvencí, které jsou popsány nebo jinak zde podány, ale preferovaně obsahují alespoň 4 - 8, lépe 9 - 15 sousedících aminokyselinových zbytků z presenilinové sekvence. Jiné preferované podsady proteinových sekvencí pro presenilin zahrnují ty, které kodují jednu nebo více funkčních domén nebo antigeních determinant presenilinových proteinů a zejména mohou obsahovat normální (divokého typu) nebo mutantní sekvence.

Vynález také poskytuje různé proteinové konstrukty, buď kompletní nebo podsady, připojené na exogení sekvenční za tvorby fúsních proteinů a podobně. Tak, podle tohoto aspektu vynálezu je také poskytnuta metoda pro produkci všech výše popsaných proteinů, které obsahují, nebo jsou odvozeny od presenilinů.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález produkci a použití polyklonálních a monoklonálních protilátek, včetně fragmentů protilátek, včetně Fab fragmentů, $F(ab')_2$ a jednořetězcových fragmentů protilátek, které se selektivně vážou na preseniliny, nebo na specifické antigení determinanty presenilinů. Protilátky mohou být získány od myší, králíků, koz nebo jiných vhodných zvířat, nebo mohou být produkovány rekombinantně v kultivovaných buňkách jako jsou hybridomní buněčné linie. Preferovaně jsou protilátky namířeny proti sekvencím pro presenilin obsahujícím alespoň 4 - 8, lépe 9 - 15 sousedních aminokyselinových zbytků ze sekvence pro presenilin. Protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být použity v různých diagnostických, terapeutických a technických aplikacích, které jsou zde popsány.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro vyšetřování a identifikaci proteinů, malých molekul nebo jiných sloučenin, které jsou schopné indukce nebo inhibice exprese genů pro presenilin a jejich proteinů (např. PS1 nebo PS2). Testy mohou být provedeny in vitro za použití netransformovaných buněk, imortalizovaných buněčných linií nebo rekombinantních buněčných linií, nebo in vivo za použití transgeních zvířecích modelů zde popsaných. Jednotlivě, testy mohou detekovat přítomnost zvýšené nebo snížené exprese PS1, PS2 nebo jiných genů ve vztahu k presenilinu, zvýšené nebo

snížené hladiny proteinových produktů ve vztahu k presenilinu nebo zvýšené nebo snížené hladiny exprese markerových genů (např. β -galaktosidasy, zeleného fluorescentního proteinu, alkalické fosfatasy nebo luciferasy) operativně vázaných na presenilinový 5' regulační region v rekombinantním konstruktu. Buňky, o kterých je známo, že exprimují určitý presenilin, nebo transformované tak, aby exprimovaly určitý presenilin, jsou inkubovány a jedna nebo více testovaných sloučenin je přidána do media. Po dostatečné časové periodě (např. 0 - 72 hodin) umožňující indukci nebo inhibici exprese presenilinu sloučeninou, je jakákoliv změna v hladině exprese vzhledem k stanovené základní expresi detekována za použití jakékoliv techniky popsané výše. V zejména preferovaných provedeních jsou buňky z imortalizovaných buněčných linií jako je lidská neuroblastomová, glioblastomová nebo hybridomní buněčná linie, nebo to jsou transformované buňky podle předkládaného vynálezu.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro identifikaci proteinů a jiných sloučenin, které se váží na, nebo jinak přímo interagují s preseniliny. Proteiny a sloučeniny budou zahrnovat endogenní buněčné složky, které interagují s preseniliny in vivo a které proto poskytují nové cíle pro farmaceutické a terapeutické intervence, stejně jako rekombinantní, syntetické a jiné exogení sloučeniny, které mohou mít vazebnou kapacitu pro presenilin a proto mohou být kandidáty pro farmaceutická agens. Tak, v jedné serii provedení, buněčné lysáty nebo homogenizáty tkáně (např. homogenizáty mozkové tkáně, lymfocytární lysáty) mohou být vyšetřovány na proteiny a jiné sloučeniny, které se váží na normální nebo mutované preseniliny. Alternativně, mnoho různých exogeních sloučenin, jak přirozeně se vyskytujících, tak

syntetických (např. knihovny malých molekul nebo peptidů) mohou být vyšetřovány na vazebnou kapacitu pro presenilin. V každém z těchto provedení je test proveden na detekování vazby mezi "presenilinovou složkou" a nějakou jinou skupinou.

"presenilinová složka" v těchto testech může být jakýkoliv polypeptid obsahující nebo odvozený od normálního nebo mutovaného presenilinového proteinu, včetně funkčních domén nebo antigeních determinant presenilinů, nebo presenilinových fúsních proteinů. Vazba může být detekována nespecifickými měřeními (např. změnou intracelulárního Ca^{2+} , poměru GTP/GDP) nebo specifickými měřeními (např. změnami v A β produkci peptidů nebo změnou exprese jiných downstream genů, která může být detekována různými testy, 2D elektroforesou, různou hybridizací nebo SAGE metodou). Preferované metody obsahují variace následujících technik:

- 1) přímé extrakce afinitní chromatografií;
- 2) ko-izolace složek presenilinu a navázaných proteinů nebo jiných sloučenin imunoprecipitací;
- 3) Biomolecular Interaction Assay (BIAcore); a
- 4) kvasinkových dvou-hybridních systémů.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro identifikaci proteinů, malých molekul a jiných sloučenin, které jsou schopny modulace aktivity normálních nebo mutovaných presenilinů. Za použití normálních buněk nebo zvířat, transformovaných buněk a modelů transgeních zvířat podle předkládaného vynálezu, nebo buněk získaných od subjektů nesoucích normální nebo mutované geny pro presenilin poskytuje předkládaný vynález metody pro identifikaci takových sloučenin na základě jejich schopnosti ovlivňovat expresi presenilinů, intracelulární lokalizaci presenilinů, intracelulární hladiny

Ca^{2+} , Na^+ , K^+ nebo jiných iontů nebo jejich metabolismus, výskyt nebo stupeň apoptosy nebo buněčné smrti, hladiny nebo stav A β produkce peptidů, přítomnost nebo hladiny fosforylace s mikrotubuly asociovaných proteinů nebo fyziologické markery, které odlišují buňky nesoucí normální a mutované sekvenční presenilin. Za použití transgenických zvířat podle předkládaného vynálezu je metoda pro identifikaci takových sloučenin poskytnuta na základě schopnosti sloučeniny ovlivňovat behaviorální, fyziologické nebo histologické fenotypy asociované s mutacemi presenilinů.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro vyšetření nosičů presenilinových alel asociovaných s AD. Pro diagnosu obětí AD, a pro vyšetření a diagnosu příbuzných presenilních a senilních demencí, psychiatrických onemocnění jako je schizofrenie a deprese a neurologických onemocnění jako je iktus a mozkové krvácení, které jsou asociovány s mutacemi v PS1 nebo PS2 genech. Vyšetření a/nebo diagnosa může být provedena metodami založenými na nukleových kyselinách (včetně genomové a mRNA/cDNA sekvencí), proteinech, a/nebo protilátkách zde popsáných a daných, včetně funkčních testů pro detekování selhání nebo zesílení normální aktivity presenilinu a/nebo přítomnosti specifických nových aktivit způsobených mutantními preseniliny. Tak jsou poskytnuta vyšetření a diagnostika založené na presenilinových proteinech, které detekují rozdíly mezi mutantními a normálními preseniliny v elektroforetické mobilitě, vzorcích proteolytického štěpení, molárních poměrech různých aminokyselinových zbytků, ve schopnosti vázat se na specifickou protilátku. Kromě toho jsou poskytnuta vyšetření a diagnostika založená na nukleových kyselinách (gDNA, cDNA nebo mRNA), která detekují rozdíly v

sekvenci nukleotidů přímým sekvencováním nukleotidů, hybridizací za použití alelově specifických nukleotidů, trávení restrikčními enzymy a mapování (např. RFLP, REF-SSCP), elektroforetické mobility (např. SSCP, DGGE), PCR mapování, RNAsové ochraně, chemickým chybným štěpením, ligasou zprostředkovanou detekcí a různými jinými metodami. Jsou poskytnuty také jiné metody, které detekují abnormální zpracování PS1, PS2, APP nebo proteinů reagujících s PS1, PS2 nebo APP (např. abnormální fosforylace, glykosylace, amidace nebo proteolytické štěpení), alterace v presenilinové transkripci, translaci a posttranslační modifikaci; alterace v intracelulárním nebo extracelulárním přepřevě presenilinového genového produktu; nebo abnormální intracelulární lokalizaci presenilinů. V souladu s těmito provedeními jsou také poskytnuty diagnostické kity, které budou obsahovat reagens nezbytná pro výše popsaná diagnostická vyšetření.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody a farmaceutické přípravky pro použití v léčbě s preseniliny asociovaných onemocnění jako je AD. Tyto metody a farmaceutické přípravky jsou založeny na:

- 1) podání normálních PS1 nebo PS2 proteinů,
- 2) genové terapii normálními PS1 nebo PS2 geny pro kompenzaci nebo náhradu za mutantní geny,
- 3) genové terapii založené na antisense sekvencích k mutantním PS1 nebo PS2 genům, které "vyřadí" mutantní geny,
- 4) genové terapii založené na genech, které kodují protein, který blokuje nebo koriguje poškozující účinek PS1 nebo PS2 mutantů,
- 5) imunoterapii založené na protilátkách k normálním a/nebo mutantním PS1 nebo PS2 proteinům, nebo

6) malých molekulách (léčivech), které pozměňují expresi PS1 nebo PS2, blokují abnormální interakce mezi mutantními formami PS1 nebo PS2 a jinými proteiny nebo ligandy, nebo které jinak blokují aberantní funkce mutantních PS1 nebo PS2 proteinů změnou struktury mutantních proteinů, zvýšením jejich metabolické clearance nebo inhibicí jejich funkce.

V souladu s jiným aspektem předkládaného vynálezu mohou být proteiny podle předkládaného vynálezu použity jako počáteční bod pro racionální vývoj léčiv pro poskytnutí ligandů, terapeutických léčiv, nebo jiných typů malých chemických molekul. Alternativně, malé molekuly nebo jiné sloučeniny identifikované výše popsanými vyšetřovacími testy mohou sloužit jako "vedoucí sloučeniny" v racionálním vývoji léčiv.

Jednotlivé popsané nukleotidové a aminokyselinové sekvence podle předkládaného vynálezu jsou označeny SEQ ID NO: 1 - 25. Kromě toho, ve smyslu Budapešťské smlouvy, biologické depozita jednotlivých sekvencí nukleových kyselin zde popsaných mohou být označena ATCC (Rockville, MD). Tato depozita zahrnují přírůstkové číslo 97124 (uloženo 28.5.1995), přírůstkové číslo 97214 (uloženo 28.6.1995), a přírůstkové číslo 97428 (uloženo 26.1.1996).

Popis obrázků na přiložených výkresech

Obrázek 1: Tento obrázek je reprezentací strukturální organizace hPS1 genomové DNA. Nekodující exony jsou znázorněny vytečkovanými rámečky. Kodující exony jsou znázorněny prázdnými rámečky nebo šrafovanými rámečky pro alternativně připojené

sekvence. Restrikční místa jsou: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; N = NotI; P = PstI; V = PvuII; X = XbaI. Přerušení v horizontální linii mezi restrikčními místy reprezentují nedefinované gnomové sekvence. Klonované genomové fragmenty obsahující každý exon jsou znázorněny oboustranými horizontálními šipkami. Velikost genomových subklonů a přírůstková čísla pro každou genomovou sekvenci jsou také dány.

Obrázek 2: Tento obrázek reprezentuje hydropatický graf putativního PS1 proteinu. Graf byl kalkulován podle metody Kyte a Doolittle (1982).

Obrázek 3: Tento obrázek prezentuje seřazení sekvence proteinových sekvencí hPS1 a mPS1 proteinu. Vertikální čárky ukazují identické aminokyseliny.

Obrázek 4: Tento obrázek prezentuje seřazení sekvence proteinových sekvencí hPS1 a hPS2 proteinu. Vertikální čárky ukazují identické aminokyseliny.

Obrázek 5: Tento obrázek je schematické znázornění předpokládané struktury PS1 proteinu. Římské číslice ukazují transmembránové domény. Putativní glykosylační místa jsou ukázána hvězdičkou a většina fosforylačních míst je umístěna na stejné straně membrány jako dvě acidické hydrofilní smyčky. MAP kinasa místo je přítomno na zbytku 115 a PKC místo je na zbytku 114. FAD mutační místa jsou ukázána horizontálními šipkami.

Obrázek 6: Tento obrázek je schematické znázornění předpokládané struktury PS2 proteinu. Římské číslice ukazují transmembránové domény. Putativní glykosylační místa jsou

ukázána hvězdičkou a většina fosforylačních míst je umístěna na stejné straně membrány jako dvě acidické hydrofilní smyčky. FAD mutační místa jsou ukázána horizontálními šipkami.

I. Definice

Pro usandnění přezkoumání různých provedení předkládaného vynálezu a pro pochopení různých elementů a složek použitých ve tvorbě a použití vynálezu jsou poskytnuty následující definice pro jednotlivé termíny použité v popisu a připojených nárocích.

Presenilin: Jak je zde použito bez další modifikace, znamená termín "presenilin" nebo "preseniliny" presenilin-1 (PS1) a/nebo presenilin-2 (PS2) geny/proteiny. Jednotlivě, nemodifikovaný termín "presenilin" nebo "preseniliny" označuje savčí PS1 a/nebo PS2 geny/proteiny a preferovaně lidské PS1 a/nebo PS2 geny/proteiny.

Presenilin-1 gen: Jak je zde použito, znamená termín "presenilin-1 gen" nebo "PS1 gen" savčí gen prvně objevený a popsáný v U.S. přihlášce seriové č. 08/431048 podané 28.5.1995 a později popsáný Sherringtonem et al (1995), včetně alelických variant a heterospecifických savčích homologů. Jedna lidská presenilin-1 (hPS1) cDNA sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 1. Jiná lidská cDNA sekvence, vzešlá z alternativního sestřižení hPS1 mRNA transkriptu, je zde popsána jako SEQ ID NO: 3. Kromě lidských sestřižených variant, jak je popsáno níže, bylo také nalezeno, ve kterém regionu kodujícím třicet tři zbytků může být sestřiženo v nějakém transkriptu. cDNA myšího homologu (mPS1) je popsána jako SEQ ID

NO: 16. Termín "presenilin-1 gen" nebo "PS1 gen" se primárně týká kodující sekvence, ale může také zahrnovat některé nebo všechny sousední regulační regiony a/nebo introny. Termín PS1 gen specificky zahrnuje arteficiální nebo rekombinantní geny vytvořené z cDNA nebo genomové DNA, včetně rekombinantních genů založených na sestřižených variantách. Presenilin - 1 gen byl také označován jako S182 gen (např. Sherrington et al., 1995) nebo jako Alzheimer Related Membrane Protein (ARMP) gen (např. U.S. přihláška seriové č. 08/431048 podaná 28.5.1995).

Presenilin-1 protein: Jak je zde použito, znamená termín "presenilin-1 protein" nebo "PS1 protein" protein kodovaný PS1 genem, včetně alelických variant a heterospecifických savčích homologů. Jedna lidská presenilin-1 (hPS1) proteinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 2. Jiná lidská proteinová sekvence, vzešlá z alternativního sestřižení hPS1 mRNA transkriptu, je zde popsána jako SEQ ID NO: 4. Kromě lidských sestřižených variant, jak je popsáno níže, bylo také nalezeno, který region obsahující třicet tři zbytků může být sestřižen v nějakém transkriptu. Tyto varianty také spadají do termínu presenilin - 1 protein jak je zde použit. Proteinová sekvence myšího homologu (mPS1) je popsána jako SEQ ID NO: 17. Protein může být produkován rekombinantními buňkami nebo organismy, může být podstatně purifikován z přirozených tkání nebo buněčných linií nebo může být syntetizován chemicky nebo enzymaticky. Proto termín "presenilin - 1 protein" nebo "PS1 protein" zahrnuje protein v glykosylované, částečně glykosylované nebo neglykosylované formě, stejně jako fosforylovanou, částečně fosforylovanou, nefosforylovanou, sulfatovanou, částečně sulfatovanou nebo nesulfatovanou formu. Termín také zahrnuje alelické varianty a jiné funkční ekvivalenty

PS1 aminokyselinové sekvence, včetně biologicky aktivních nebo jiných fragmentů. Tento protein byl také označován jako S182 protein (např. Sherrington et al., 1995) nebo jako Alzheimer Related Membrane Protein (ARMP) (např. U.S. přihláška pořadové č. 08/431048 podaná 28.5.1995.

hPS1 gen a/nebo protein. Jak je zde použito, znamená zkratka "hPS1" lidské homologní nebo alelické varianty PS1 genu a/nebo proteinu. Dvě cDNA sekvence lidského PS1 genu jsou zde uvedeny jako SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3. Korespondující hPS1 proteinové sekvence jsou zde popsány jako SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Mnoho alelických variant, včetně poškozujících mutantů, je popsáno a dáno v popisu, který následuje.

mPS1 gen a/nebo protein. Jak je zde použito, znamená zkratka "mPS1" myší homologní a myší alelické varianty PS1 genu a/nebo proteinu. cDNA sekvence jednoho myšího PS1 genu je zde uvedena jako SEQ ID NO: 16. Korespondující mPS1 proteinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 17. Alelické varianty, včetně poškozujících mutantů, jsou popsány a dány v popisu, který následuje.

Presenilin-2 gen: Jak je zde použito, znamená termín "presenilin-2 gen" nebo "PS2 gen" savčí gen prvně objevený a popsáný v U.S. přihlášce seriové č. 08/496841 podané 28.6.1995 a později popsáný Rogaevem et al (1995) a Levy-Lahadem et al. (1995), včetně alelických variant a heterospecifických savčích homologů. Jedna lidská presenilin-2 (hPS2) cDNA sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 18. U dalších lidských sestřižených variant, jak jsou popsány níže, bylo také nalezeno, ve kterém jednom kodonu nebo

regionu kodujícím třicet tři zbytků může být sestřižena v nějakém transkriptu. Termín "presenilin-2 gen" nebo "PS2 gen" se primárně týká kodující sekvence, ale může také zahrnovat některé nebo všechny sousední regulační regiony a/nebo introny. Termín PS2 gen specificky zahrnuje arteficiální nebo rekombinantní geny vytvořené z cDNA nebo genomové DNA, včetně rekombinantních genů založených na sestřižených variantách. Presenilin - 2 gen byl také označován jako E5-1 gen (např. Rogaev et al., (1995); U.S. přihláška seriové č. 08/496841 podaná 28.6.1995) nebo STM2 gen (např. Levy-Lahad et al., (1995)).

Presenilin-2 protein: Jak je zde použito, znamená termín "presenilin-2 protein" nebo "PS2 protein" protein kodovaný PS2 genem, včetně alelických variant a heterospecifických savčích homologů. Jedna lidská presenilin-2 (hPS2) proteinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 19. U dalších lidských sestřižených variant, jak jsou popsány níže, bylo také nalezeno, ve kterém jednom zbytku nebo regionu obshujícím třicet tři zbytků může být sestřižena v nějakém transkriptu. Protein může být produkován rekombinantními buňkami nebo organismy, může být podstatně purifikován z přirozených tkání nebo buněčných linií nebo může být syntetizován chemicky nebo enzymaticky. Proto termín "presenilin - 2 protein" nebo "PS2 protein" zahrnuje protein v glykosylované, částečně glykosylované nebo neglykosylované formě, stejně jako fosforylovanou, částečně fosforylovanou, nefosforylovanou, sulfatovanou, částečně sulfatovanou nebo nesulfatovanou formu. Termín také zahrnuje alelické varianty a jiné funkční ekvivalenty PS1 aminokyselinové sekvence, včetně biologicky aktivních nebo jiných fragmentů. Tento protein byl také označován jako E5-1

protein (např. Sherrington et al., 1995; U.S. přihláška pořadové č. 08/496841 podaná 28.6.1995) nebo STM2 protein (např. Levy-Lahad et al., (1995)).

hPS2 gen a/nebo protein. Jak je zde použito, znamená zkratka "mPS1" lidské homologní a lidské alelické varianty PS2 genu a/nebo proteinu. cDNA sekvence jednoho lidského PS2 genu je zde uvedena jako SEQ ID NO: 18. Korespondující hPS2 proteinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 19. Mnoho alelických variant, včetně poškozujících mutantů, je popsáno a dáno v popisu, který následuje.

DmPS gen a/nebo protein. Jak je zde použito, znamená zkratka "mPS1" Drosophila homologní a alelické varianty PS1 a PS2 genu a/nebo proteinu. Tato definice je chápána tak, že zahrnuje polymorfismus sekvencí nukleových kyselin a aminokyselin, kde substituce, inserce nebo delece genu nebo proteiné sekvence neovlivňují základní funkce genového produktu. Nukleotidová sekvence nebo jedna cDNA sekvence DmPS genu je zde uvedena jako SEQ ID NO: 20 a korespondující aminokyselinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 21. Termín "DmPS gen" se primárně týká kodující sekvence, ale může také zahrnovat některé nebo všechny sousední regulační regiony a/nebo introny.

Normální: Jak je zde použito s ohledem na geny znamená termín "normální" gen, který koduje normální protein. Jak je zde použito s ohledem na proteiny znamená termín "normální" protein, který provádí svou běžnou nebo normální fyziologickou roli a který není asociován s, nebo není příčinou patogeních stavů. Proto, jak je zde použito, termín "normální" je v podstatě synonymní s obvyklým významem fráze "divokého typu".

Pro jakýkoliv daný gen nebo korespondující protein může existovat mnoho normálních alelických variant, kde žádná z nich není asociována s vývojem patogeních stavů. takové normální alelické varianty zahrnují, ale nejsou omezeny na, varianty, ve kterých jedna nebo více substitucí nukleotidů nevede ke změně kodované sekvence aminokyselin.

Mutantní: Jak je zde použito s ohledem na geny znamená termín "mutantní" gen, který koduje mutantní protein. Jak je zde použito s ohledem na proteiny znamená termín "mutantní" protein, který neprovádí svou běžnou nebo normální fyziologickou roli a který je asociován s, nebo je příčinou patogeních stavů. Proto, jak je zde použito, termín "mutantní" je v podstatě synonymní s termíny "dysfunkční", "patogenní", "onemocnění způsobující", a "poškozující". S ohledem na presenilinové geny a proteiny podle předkládaného vynálezu označuje termín "mutantní" presenilinové geny/proteiny nesoucí jednu nebo více nukleotidových/aminokyselinových substitucí, insercí a/nebo delecí, které typicky vedou k rozvoji příznaků Alzheimerovy choroby a/nebo jiných příbuzných dědičných fenotypů (např. mozkové hemoragie, mentální retardace, schizofrenie, psychosy a deprese), pokud jsou exprimovány u lidí. Tato definice je chápána tak, že zahrnuje různé mutace, které se přirozeně vyskytují, stejně jako syntetické nebo rekombinantní mutace vyvolané lidským zásahem. Termín "mutantní" jak je aplikován na presenilinové geny, není míněn tak, aby zahrnoval varianty sekvence které, díky degeneraci genetického kodu, kodují proteiny identické k normálním sekvencím zde popsaným nebo jinak uvedeným; ani není míněn tak, aby zahrnoval varianty sekvence které, ačkoliv kodují různé proteiny, kodují proteiny, které jsou funkčně ekvivalentní k

normálním presenilinovým proteinů.

Funkční ekvivalent: Jak je zde použito při popisování genových sekvencí a aminokyselinových sekvencí znamená termín "funkčně ekvivalentní" to, že uvedená sekvence nemusí být identická s jednotlivou popsanou sekvencí seznamu sekvencí, ale poskytuje pouze sekvenci, která účinkuje biologicky a/nebo chemicky jako ekvivalent popsané sekvence.

V podstatě čistý: Jak je zde použito s ohledem na proteiny (včetně protilátek) nebo jiné přípravky znamená termín "v podstatě čistý" přípravek, který je alespoň ze 60% hmotnosti (suché hmotnosti) složen z požadované sloučeniny. Preferovaně je přípravek alespoň ze 75%, lépe alespoň ze 90% a nejlépe alespoň z 99% hmotnosti složen z požadované sloučeniny. Čistota může být měřena jakoukoliv vhodnou metodou, např. chromatografií na koloně, gelovou elektroforesou nebo HPLC analýsou.

S ohledem na proteiny, včetně protilátek, pokud přípravek obsahuje dvě nebo více požadovaných sloučenin (např. dvě nebo více různých protilátek, imunogenů, funkčních domén nebo jiných peptidů podle předkládaného vynálezu) znamená "v podstatě čistý" přípravek, ve kterém je celková hmotnost (suchá hmotnost) všech požadovaných sloučenin alespoň 60% celkové suché hmotnosti. Obdobně, pro takové přípravky obsahující dvě nebo více požadovaných sloučenin je preferováno, aby celková hmotnost požadovaných sloučenin byla alespoň 75%, lépe alespoň 90% a nejlépe alespoň 99% hmotnosti celkové suché hmotnosti přípravku.

Izolovaná nukleová kyselina: Jak je zde použito, "izolovaná nukleová kyselina" je ribonukleová kyselina, deoxyribonukleová kyselina nebo analog nukleové kyseliny obsahující polynukleotidovou sekvenci, která byla izolována nebo separována ze sekvencí, které jsou bezprostředně sousedící (jedné na 5' konci a jedné na 3' konci) v přirozeně se vyskytujícím genomu organismu, ze kterého je odvozena. Termín proto zahrnuje, například, rekombinantní nukleovou kyselinu, která je inkorporována do vektoru, do autonomně se replikujícího plasmidu nebo viru nebo do genomové DNA prokaryotického nebo eukaryotického organismu; nebo která existuje jako separátní molekula (např. cDNA nebo genomový DNA fragment produkovaný PCR nebo ošetřením restriční endonukleasou) nezávislý na jiných sekvencích. Také zahrnuje rekombinantní DNA, která je částí hybridního genu kodujícího další peptidové sekvence a/nebo obsahujícího exogenní regulační elementy.

V podstatě identické sekvence: Jak je zde použito je "v podstatě identická" aminokyselinová sekvence aminokyselinová sekvence, která se liší pouze konzervativními substitucemi aminokyselin, například, substitucemi aminokyselin jedné za druhou stejné třídy (např. valin za prolin, arginin za lysin, atd.) nebo jednou nebo více nekonzervativními substitucemi, delecemi nebo insercemi umístěnými v takových pozicích aminokyselinové sekvence, kde neničí funkci proteinu (testované, např. jak je zde popsáno). Preferovaně, taková sekvence je alespoň z 85%, lépe z 90% a nejlépe z 95% identická na úrovni aminokyselin se sekvencí proteinu nebo peptidu, se kterým je srovnávána. Pro nukleové kyseliny, délka srovnání sekvencí bude alespoň 50 nukleotidů, lépe alespoň 60 nukleotidů,

ještě lépe alespoň 75 nukleotidů a nejlépe alespoň 110 nukleotidů. "V podstatě identická" sekvence nukleových kyselin koduje v podstatě identickou aminokyselinovou sekvenci jak byla definována výše.

Transformované buňky. Jak je zde použito, "transformovaná buňka" je buňka, do které (nebo do jejíhož předka) byla zavedena, prostředky rekombinantní DNA techniky, požadovaná molekula nukleové kyseliny. Požadovaná nukleová kyselina bude typicky kodovat peptid nebo protein. transformovaná buňka může exprimovat požadovanou sekvenci nebo může být použita pro propagaci sekvence. Termín "transformovaná" může zde být použit pro obsažení jakékoliv metody pro zavedení exogení nukleové kyseliny včetně, ale nejenom, transformace, transfekce, elektroporace, mikroinjekce, virem zprostředkované transfekce a podobně.

Operativně spojené. Jak je zde použito, o kodujících sekvencích a regulačních regionech je řečeno, že jsou "operativně spojené", pokud jsou kovalentně vázané takovým způsobem, že umísťují expresi nebo transkripci kodující sekvence pod vliv nebo kontrolu regulačního regionu. Pokud je požadováno, aby kodující sekvence byly translatovány do funkčního proteinu, pak o dvou sekvencích je řečeno, že jsou operativně spojené, pokud indukce funkce promotoru vede ke transkripci kodující sekvence a pokud charakter vazby mezi dvěma DNA sekvencemi 1) nevede k mutaci posunu rámečku, 2) neinterferuje se schopností regulačního regionu řídit transkripci kodujících sekvencí, nebo 3) neinterferuje se schopností korespondujícího RNA transkriptu být translatován na protein. tak, regulační region může být operativně spojen s

kodující sekvencí, pokud je regulační region schopen způsobit transkripci této DNA sekvence, tak že vzniklý transkript může být translatován do požadovaného proteinu nebo polypeptidu.

Přísné hybridizační podmínky. Přísné hybridizační podmínky je termín v oboru používaný a odborníků známý. Pro jakoukoliv danou sekvenci nukleových kyselin jsou přísné hybridizační podmínky podmínky teploty, chaotrofní kyseliny, pufrů, a iontové síly, které umožní hybridizaci této sekvence nukleových kyselin na její komplementární sekvenci a nikoliv na podstatně odlišnou sekvenci. Přesné podmínky, které tvoří "přísné" podmínky, závisí na charakteru sekvence nukleových kyselin, délce sekvence, a frekvenci výskytu podsad této sekvence v jiných neidentických sekvencích. Odlišností hybridizačních podmínek od hladině přísnosti, ve které se vyskytuje nespecifická hybridizace do hladiny, při které je pozorována pouze specifická hybridizace může odborník v oboru určit bez zbytečného experimentování podmínky, které umožní hybridizaci dané sekvence pouze s komplementární sekvencí. Vhodné rozsahy takových podmínek přísnosti jsou popsány v Krause and Aaronson (1991). Hybridizační podmínky, v závislosti na délce a běžnosti sekvence, mohou zahrnovat teploty od 20 °C - 65 °C a iontovou sílu od 5x do 0,1x SSC. Vysoce přísné podmínky hybridizace mohou zahrnovat teploty nižší než 40 °C - 42 °C (pokud jsou obsaženy denaturanty jako je formamid) až vyšší než 60 - 65 °C v iontové síle nižší než 0,1 x SSC. Tyto rozsahy jsou, nicméně, pouze ilustrativní a v závislosti na charakteru cílové sekvence, a možného budoucího vývoje techniky, mohou být přísnější, než je nezbytné. Méně než přísné podmínky jsou využity pro izolaci sekvence nukleových kyselin, které jsou v podstatě shodné, alelické nebo homologní k jakékoliv dané

sekvenci.

Selektivně se váže. Jak je zde použito s ohledem na protilátky, o protilátce je řečeno, že se "selektivně váže" na cíl, pokud protilátka rozpoznává a váže se na požadovaný cíl, ale v podstatě nerozpoznává ani se neváže na jiné molekuly ve vzorku, např. biologickém vzorku, který obsahuje požadovaný cíl.

II. Preseniliny

Předkládaný vynález je částečně založen na objevu rodiny savčích genů, které, pokud jsou mutovány, jsou asociovány s vývojem Alzheimerovy choroby. Objev těchto genů, označených presenilin-1 a presenilin-2, stejně jako charakterizace těchto genů, jejich proteinových produktů, mutantů a možných účinků, je popsán níže. Homology presenilinů u bezobratlých jsou zde také uvedeny, protože mohou vnést světlo do účinků presenilinů a dále mohou být užitečné v různých provedeních, která jsou popsána níže.

1. Izolace lidského genu presenilinu-1

A. Genetické mapování AD3 regionu

Počáteční izolace a charakterizace PS1 genu, potom popisovaného jako AD3 gen nebo S182 gen, byla popsána v Sherrington et al. (1995). Po počátečním regionálním mapování AD3 genového lokusu na 14q24.3 poblíž anonymních mikrosatelitních markerů D14S43 a D14S53 (Schellenberg et al., 1992; St. George-Hyslop et al., 1992; Van Breckoven et al.,

1992) bylo dvacet jedna rodokmenů použito pro segregaci AD jako putativního autosomálně dominantního rysu (St. George-Hyslop et al., 1992) a pro zkoumání segregace 18 dalších genetických markerů z 14q24.3 regionu, které byly organizovány do vysokodensitní mapy genetických vazeb (Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Dříve publikované párová maxima pravděpodobnostní analýzy potvrdily základní kumulativní důkaz pro vazbu mezi familiární Alzheimerovou chorobou (FAD) a všemi těmito markery. Nicméně, mnoho genetických dat podporujících vazbu na tyto markery bylo odvozeno od šesti rozsáhlých rodokmenů s časným nástupem, FAD1 (Nee et al., 1983), FAD2 (Frommelt et al., 1991), FAD3 (Goudsmith et al., 1981; Polenn, 1993), Fad4 (Foncin et al., 1985), TOR1.1 (Bergamini, 1991) a 603 (pericak-vance et al., 1988), kde každý z nich poskytuje alespoň jeden anonymní genetický marker z 14q24.3 (St. George-Hyslop et al., 1992).

Pro přesnější definování umístění AD3 genu ve vztahu k známým umístěním genetických markerů z 14q24.3 byly rekombinační orientační body vyhledávány přímou inspekcí z dat ze surových haplotypů z těch genotypovaných postižených členů šesti rodokmenů, kteří vykazovali definitivní vazbu na chromosom 14. Tato selektivní strategie v tomto určitém případě nezbytně ruší data z rekonstruovaných genotypů zesnulých postižených členů stejně jako od starých asymptomatických členů velkých rodokmenů a nebere v úvahu malé rodokmeny nejistého stavu vazby. Nicméně, tato strategie je velmi důkladná, protože vylučuje získání potenciálně zavádějících dat genotypů získaných buď díky chybám v rekonstruovaných genotypech zesnulých postižených členů vzniklých z nepatrnity nebo chyb vzorků, nebo z použití nevázaných rodokmenů.

Po prohlídce dat haplotypů od postižených subjektů byly u členů šesti velkých rodokmenů, jejichž genotypy byly přímo určeny, zjištěny obligátní rekombinace v D14S48 a D14S53, a v D14S258 a D14S63. Jedna rekombinace v D14S253, která znázorňuje telomerickou vazbu na FAD region, se vyskytla u stejného AD postiženého jedince FAD1 rodokmenu, který byl dříve popsán jako rekombinantní v několika jiných markerech umístěných telomericky do D14S53, včetně D14S48 (St. George-Hyslop et al., 1992). Oproti tomu, jedna rekombinace v D14S258, která značí centromerickou vazbu FAD regionu, se vyskytla u postiženého člena FAD3 rodokmenu, který byl také rekombinantní v několika jiných markerech centromerických k D14S258 včetně D14S63. Oba rekombinantní subjekty měly nesporný důkaz Alzheimerovi choroby potvrzený standartními klinickými testy pro onemocnění u jiných postižených členů jejich rodin a genotyp obou rekombinantních subjektů byl informativní a kosegregující v mnoha lokusech v intervalu centromerickém k D14S53 a telomerickém k D14S258.

Pokud byly analýzy haplotypu rozšířeny tak, aby zahrnovaly rekonstruované genotypy zesnulých postižených členů šesti velkých rodokmenů stejně jako data ze zbývajících patnácti rodokmenů s pravděpodobností vazby menší než 0,95, pak bylo detekováno několik dalších rekombinantů v jednom nebo více markerových lokusech v intervalu mezi D14S53 a D14S258. Tak jeden další rekombinant byl detekován rekonstruováním genotypů zesnulých postižených členů každého ze tří velkých FAD rodokmenů (FAD1, FAD2 a jiných příbuzných rodin) a osm dalších rekombinantů bylo detekováno u postižených členů pěti menších FAD rodokmenů. Nicméně, protože někteří z těchto rekombinantů mohou mít správně umístěný AD3 gen v lépe definovaném cílovém

regionu, bylo nezbytné považovat tyto potenciálně těsnější "vnitřní rekombinanty" za nedůvěryhodné nejen z důvodů uvedených výše, ale také proto, že poskytují vzájemně neslučitelné umístění pro AD3 gen v D14S53 - D14S258 intervalu.

B. Konstrukce fyzikálního sousedícího ("contig")
překlenujícího AD3 regionu.

Jako počáteční krok pro klonování AD3 genu byl konstruován spoj přesahujících genomových DNA fragmentů klonovaných do kvasinkových arteficiálních chromosomových vektorů, fágových arteficiálních chromosomových vektorů a kosmidových vektorů. Studie FISS mapování za použití kosmidů odvozených od YAC klonů 932c7 a 964f5 naznačily, že interval nejpravděpodobněji nesoucí AD3 gen byl velikosti nejméně pět megabází. Protože velká velikost tohoto minimálního kosegregačního regionu činí poziční klonovací strategie neřešitelnou, byly hledány jiné genetické vyhledávače, které byly zaměřeny na umístění AD3 regionu do jednoho nebo více podregionů v intervalu vymezeném D14S53 a D14S258. Haplotypové analýzy markerů mezi D14S53 a D14S258 selhaly při detekci statisticky signifikantního důkazu pro nerovnováhu vazby a/nebo alelickou asociaci mezi FAD rysem a alelami v jakýchkoliv z těchto markerů, nezávisle na tom, zda analýza byla restrihována na rodokmeny s formami častého nástupu FAD, nebo generalizována na všechny rodokmeny. Tento výsledek nebyl neočekávaně daný různými etnickými původy našich rodokmenů. Nicméně, pokud byly rodokmeny podobného etnického původu porovnány, pak přímá inspekce haplotypů pozorovaných na chorobu nesoucím chromosomu segregujícím v různých rodokmenech stejného etnického původu odhalila dvě seskupení markerových lokusů. První z těchto seskupení umístěné centromericky k D14S77 (D14S786,

D14S277 a D14S268) a překlenující 0,95 Mb fyzikální interval obsažený v YAC 78842. Druhé z těchto seskupení bylo umístěno telomericky k D14S77 (D14S43, D14S273 a D14S76) a překlenovalo asi 1 Mb fyzikální interval obsažený v přesahujících YAC klonech 964c2, 74163, 797d11 a části 854f5. Identické alely byly pozorovány v alespoň dvou rodokmenech stejného etnického původu. Jako část této strategie byly usouzeno, že přítomnost účastníků se alel v jedné z těchto skupin fyzikálně seskupených markerových lokusů může odrážet ko-dědičnost malých fyzikálních regionů obklopujících PS1 gen na jedinečně nalezeném chromosomu v každé etnické populaci. Signifikantně, každý z těchto účastníků se rozšířených haplotypů byl vzácný v normální Kavkazské populaci a tyto alely nebyly pozorovány v jiných skupinách markerů překlenujících stejné genetické intervaly kdekoli na chromosomu 14q24.3.

C. Transkripční mapování a analýza kandidátů pro geny

Pro izolování exprivovaných sekvencí kodovaných mezi oběma kritickými intervaly byla použita přímá selekční strategie vyžadující imobilizovanou, klonovanou, lidskou genomovou DNA jako hybridizační cíl pro znovu získání transkribovaných sekvencí z primárních komplementárních poolů DNA odvozených od lidské mozkové mRNA (Rommens et al., 1993). Přibližně 900 putativních DNA fragmentů velikosti 100 až 600 párů bazí bylo získáno z těchto regionů. Tyto fragmenty byly hybridizovány na Souther bloty obsahující genomové DNA od lidí a od jiných savců. Tato identifikovaná podsada 151 klonů, které vykazovaly důkazy pro evoluční konzervaci a/nebo pro komplexní strukturu, což naznačovalo, že byly odvozené od sestřižené DNA. Klony v této podsadě byly tříděny na základě fyzického mapového

umístění, zkřížené hybridizace a sekvence nukleotidů a byly použity pro vyšetření konvenčních lidských mozkových cDNA knihoven na delší cDNA. Bylo izolováno alespoň 19 nezávislých cDNA klonů o délce větší než 1 kb a byly potom seřazeny do částečné transkripční mapy AD3 regionu. Pouze tři z těchto transkriptů korespondovaly se známými charakterizovanými geny (cFOS, dihydrolipoamid sukcinyl transferasa a vazebný protein 2 pro latentní transformující růstový faktor).

D. Získání kandidátů pro geny

Každá z částí otevřeného čtecího rámečku kandidátových genů byla získána RT-PCR z mRNA izolované z mrtvé mozkové tkáně od normálních kontrolních subjektů a od buď mrtvé mozkové tkáně nebo kultivovaných fibroblastových linií postižených členů šesti rodokmenů definitivně vázaných na chromosom 14. RT-PCR produkty byly potom vyšetřovány na rozdíly v sekvenci za použití chemického štěpení a metodou vyhledávání restrikcními endonukleasami konformačního polymorfismu jednořetězcové sekvence (Saleeba and Cotton, 1993; Liu and Sommer, 1995) a přímého sekvencování nukleotidů. S jednou výjimkou, všechny z vyšetřovaných genů, i když ne požadovaných, neobsahovaly aterace v sekvencích, které byly jedinečné u postižených subjektů nebo kosegregovaly s onemocněním. Jednou výjimkou byl kandidátový gen reprezentovaný klonem S182, který obsahoval serii nukleotidových změn, která nebyla pozorována u normálních subjektů a o kterých bylo předpokládáno, že alterují aminokyselinovou sekvenci u postižených subjektů. Gen korespondující tomuto klonu byl nyní označen jako presenilin-1 (PS1). Dvě PS1 sekvence, reprezentující alternativní sestřižené varianty popsané níže, jsou zde popsány jako SEQ ID NO: 1 a SEQ

ID NO: 3. Korespondující předpokládané aminokyselinové sekvence jsou popsány jako SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Bluescript plasmidy nesoucí klony těchto cDNA byly deponovány v ATCC, Rockville, Md., pod ATCC přírůstkovými čísly 97124 a 97508 28.5.1995. Sekvence korespondující SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2 byly také deponovány v GenBank databasy a mohou zde být získány pod přírůstkovým číslem 42110.

2. Izolace genu pro myší presenilin-1

Myší homolog (mPS1) lidského PS1 genu byl získán vyšetřením myší cDNA knihovny značenou lidskou cDNA probou z hPS1 genu. Tímto způsobem byl získán 2 kb částečný transkript (reúresentující 3' konec genu) a několik RT-PCR produktů reprezentujících 5' konec. Sekvencování konsensuálního cDNA transkriptu myšího homologu odhalilo významnou aminokyselinovou identitu s hPS1. Významné je, jak je popsáno níže, že všechny aminokyseliny, které byly mutovány ve FAD rodokmenech byly konservovány mezi myším homologem a normální lidskou variantou. Tato konservace PS1 genu ukazuje, že orthologní gen existuje u myší (mPS1) a že je nyní možné klonovat jiné savčí homology nebo orthology vyšetřováním genomových nebo cDNA knihoven za použití lidských PS1 prob. Tak, podobný přístup umožní identifikaci a charakterizaci PS1 genu u jiných druhů. Sekvence nukleové kyseliny mPS1 je zde popsána jako SEQ ID NO: 16 a korespondující aminokyselinová sekvence je zde popsána jako SEQ ID NO: 17. Obě sekvence byly deponovány v GenBank databasy a mohou zde být získány pod přírůstkovým číslem 42177.

3. Izolace genu pro lidský presenilin-2.

Druhý lidský gen, nyní označený presenilin-2 (PS2) byl izolován a bylo ukázáno, že má významnou nukleotidovou a aminokyselinovou homologii s PS1 genem. První izolace tohoto genu je detailně popsána v Rogaev et al., (1995). Izolace lidského PS2 genu (také označovaného jako "STM2") téměř stejnou metodou je také popsána v Levy-Lahad et al (1995). Stručně, PS2 gen byl identifikován za použití nukleotidové sekvence cDNA pro PS1 pro prohlížení databasí za použití BLASTN vzoru podle Altschul et al. (1990). Byla lokalizována tři vybraná místa exprivované sekvence, identifikovaná přírůstkovým číslem T03769, R14600 a R05907, která měla významnou homologii ($p < 1,0 \cdot 10^{-100}$, více než 97% identita v alespoň 100 sousedních párech bazí).

Z těchto sekvencí byly produkovány oligonukleotidové primery a byly použity pro generování PCR produktů reversní transkriptasovou PCR (RT-PCR). Tyto krátké RT-PCR produkty byly částečně sekvencovány pro potvrzení jejich identity se sekvencemi v databasy a potom byly použity jako hybridizační proby pro vyšetření kompletních cDNA knihoven. Několik různých cDNA v rozsahu od 1 kb do 2,3 kb bylo získáno z cDNA knihovny nádorové buňky (Caco2) a z lidské mozkové cDNA knihovny (E5-1, G1-1, cc54, cc32). Nukleotidová sekvence těchto klonů potvrdila, že byly všechny generovány ze stejného transkriptu.

Gen kodující transkript, PS2 gen, byl mapován na lidský chromosom 1 za použití hybridních mapovacích panelů ke dvěma seskupením CEPH Mega YAC klonů, které byly umístěny podle fyzikální sousedící ("contig") mapy (YAC klony 750g7, 921d12 mapovaný 1q41; a YAC klon 787g12 mapovaný na 1p36.1-p35). Sekvence nukleových kyselin hPS2 klonu je zde popsána jako SEQ ID NO: 18 a korespondující aminokyselinová sekvence je zde popsána jako SEQ

ID NO: 19. Obě sekvence byly deponovány v GenBank databasi a mohou zde být získány pod přírůstkovým číslem L44577. DNA sekvence hPS2 klonu byla také vložena do vektoru a deponována v ATCC, Rockville, MD po přírůstkovým číslem 97214 28.6.1995.

4. Identifikace homologů u *C. elegans* a *D. melanogaster*

A. SPE-4 *C. elegans*

Srovnání sekvence nukleových kyselin a předpokládané aminokyselinové sekvence PS1 s dostupnou databasí za použití BLAST typu seřazení ukázalo střední podobnost s *C. elegans* spermatickým integrálním membránovým proteinem SPE-4 ($P = 1,5 \cdot 10^{-25}$, 24 - 37% identita ve třech skupinách alespoň padesáti zbytků) a slabší podobnost s částmi jiných membránových překlenujících proteinů včetně savčího chromograninu A a alfa podjednotky savčího napěťově závislého kalciového kanálu (Altschul et al., 1990). Podobnosti aminokyselinové sekvence v putativních transmembránových doménách mohou příležitostně dávat sestavení, které jednoduše vzniká z omezeného počtu hydrofobních aminokyselin, ale existuje zde také rozšířené sestavení aminokyselin mezi PS1 a SPE-4 v několika hydrofilních doménách. Oba putativní PS1 protein a SPE-4 jsou předpokládaně srovnatelné velikosti (467 a 465 zbytků, v příslušném pořadí) a, jak je podrobněji popsáno níže, obsahují alespoň sedm transmembránových domén s velkou acidickou doménou předcházející konečné transmembránové doméně. PS1 protein nemá velký předpokládaný hydrofilní region na N konci.

Analýza BLASTP sestavení také detekovala signifikantní homologii mezi PS2 a *C. elegans* SPE-4 proteinem ($P = 3,5 \cdot 10^{-26}$ 20 - 63% identita v pěti doménách alespoň 22 zbytků), a slabší

homologie k mozkovým sodíkovým kanálům (alfa III podjednotka) a alfa podjednotce napětově dependentních kalciových kanálů z různých druhů ($P = 0.02$, 20 - 28% identita ve dvou nebo více doménách každé o alespoň 35 zbytcích) (Altschul, 1990). Tyto sestavení jsou stejná jako jsou ta, která byla výše popsána pro PS1 gen.

B. Sel-12 *C. elegans*

U 461 zbytků Sel-12 proteinu od *C. elegans* a S182 (SEQ ID NO: 2) bylo shledáno, že mají 48% identitu sekvence v 460 aminokyselinách (Levitan and Greenwald, 1995). O Sel-12 proteinu se také soudí, že má mnoho transmembránových domén. Sel-12 gen (přírůstkové číslo U35660) byl identifikován vyšetřením na supresory lin-12 "gain of function" (nabytí funkce) mutace a byl klonován transformační záchranou (Levitan and Greenwald, 1995).

C. DmPS *D. melanogaster*.

Redundantní oligonukleotidy kodující vysoce konzervované regiony presenilin/sel 12 proteinů byly připraveny a použity pro identifikaci relevantních mRNA z dospělých a embryonálních *D. melanogaster*. Tyto mRNA byly sekvencovány a ukázalo se, že obsahují otevřený čtecí rámeček s putativní aminokyselinovou sekvencí vysoce homologní k sekvenci lidských presenilinů. DmPS cDNA je identifikována jako SEQ ID NO: 20.

Tato sekvence koduje polypeptid o 541 aminokyselinách (SEQ ID NO: 21) s asi 52% identitou k lidským presenilinům.

Struktura *D. melanogaster* homologu je podobná struktuře

lidských presenilinů s alespoň sedmi putativními transmembránovými doménami (Kyte-Doolittle analýzy hydrofobicity za použití okna 15 a hranice 1,5). Důkaz alespoň jedné alternativně sestřižené formy byl detekován v klonu pds13 obsahujícím ORF o 541 aminokyselinách, zatímco klony pds7, pds14 a pds1 postrádaly uzavírající nukleotidy 1300 - 1341. Toto alternativní sestřižení povede k alteraci Gly na Ala ve zbytku 384 v putativní TM6->7 smyčce a k fúzi v rámečku k Glu zbytku v kodonu 399 delšího ORF. Zásadní rozdíly v aminokyselinové sekvenci *D. melanogaster* a lidských genech byly v N terminální acidické hydrofilní doméně a v acidické hydrofilní části TM6->7 smyčky. Zbytky obklopující TM6->7 smyčku jsou zejména konzervována (zbytky 220 - 313 a 451 - 524), což naznačuje, že tyto jsou funkčně důležité domény. Šestnáct ze dvaceti zbytků identifikovaných jako mutované v lidském PS1 a PS2 a způsobujících lidský FAD je konzervováno v *D. melanogaster* homologu.

DNA sekvence DmPS genu jak byla klonována byla vložena do Bluescript plasmidu. Tento stabilní vektor byl deponován v ATCC, Rockville, MD, pod ATCC přírůstkovým číslem 97428 26.1.1996.

5. Charakterizace lidských genů pro preseniliny

A. hPS1 transkripty a genová struktura

Hybridizace PS1 (S182) klonu na norther bloty identifikovala transkript hojně exprivovaný v mnoha oblastech mozku a periferní tkáně jako hlavní asi 2,8 kb transkript a vedlejší transkript asi o 7,5 kb (viz např. obrázek 2 v Sherrington et al., 1995). PS1 je exprivován téměř uniformně ve většině regionů mozku a ve většině

periferních tkání s výjimkou jater, kde je transkripce nízká. Ačkoliv identita 7,5 kb transkriptu je nejasná, dvě pozorování naznačují, že asi 2,8 kb transkript reprezentuje aktivní produkt genu. Hybridizace PS1 klonu na northern bloty obsahující mRNA z mnoha myších tkání, včetně mozku, identifikovala pouze jeden transkript identické velikosti k asi 2,8 kb lidskému transkriptu. Všechny delší cDNA klony doposud získané (2,6 - 2,8 kb), které obsahovaly jak 5', tak 3' UTR a které patřily k 2,8 kb prožku v northern blotu, byly mapovány výlučně na stejný fyzikální region chromosomu 14.

Z těchto pokusů může asi 7,5 kb transkript buď vzácně alternativně sestřiženou, nebo polyadenylovanou izoformu asi 2,8 kb transkriptu, nebo může reprezentovat jiný gen s homologií k PS1. cDNA knihovna Caco2 buněčné linie, která exprivuje vysoké hladiny jak PS1, tak PS2, byla vyšetřována na dlouhé transkripty. Byly získány dva různé klony, GL40 a B53. Sekvencování ukázalo, že oba klony obsahují podobné 5' UTR a ORF, který byl identický k Orf kratšího 2,8 kb transkriptu v mozku.

Oba klony obsahovaly neobvykle dlouhý 3' UTR. Tento dlouhý 3'UTR reprezentuje použití alternativního polyadenylačního místa o asi 3 kb dále downstream. tento dlouhý 3'UTR obsahoval množství motivů nukleotidové sekvence, které vedly k palindromům nebo kmenovým-smyčkovým strukturám. Tyto struktury jsou asociovány s mRNA stabilitou a také s translační účinností. Užitečnost tohoto pozorování je v tom, že může být možné vytvořit rekombinantní expresní konstrukty a/nebo transgeny, ve kterých je odstraněno upstream polyadenylační místo, což posiluje použití downstream polyadenylačního místa a delšího 3' UTR. V určitých případech, toto může navodit stabilitu vybraných mRNA druhů, s preferenční

translací, která může být využita pro změnu rovnováhy mutantních versus přirozených transkriptů v cílových buněčných liniích, nebo i in vivo v mozku, buď terapií zárodečných linií nebo použitím virových vektorů jako jsou modifikované herpes simplex virus vektory jako forma genové terapie.

hPS1 gen se rozkládá v genomovém intervalu alespoň 60 kb v 200 kb PAC1 klonu RPCI-1 54D12 z Roswell Park PAC knihovny a třech překrývajících se kosmidových klonů 57-H10, 1-G9, a 24-D5 z Los Alamos Chromosome 14 kosmidové knihovny. Transkripty PS1 genu obsahují RNA ze 13 exonů, které byly identifikovány opakovanou hybridizací oligonukleotidových a částečných cDNA prob na subklonované restriční fragmenty PAC a kosmidových klonů a přímým sekvencováním nukleotidů těchto subklonů. 5' UTR je obsažen v exonech 1 - 4, s tím, že exony 1 a 2 reprezentují alternativní 5' konce transkriptu. ORF je obsažen v exonech 4 až 13, s alternativním spojením, které vede k absenci části exonu 4 nebo celého exonu 9. Exon 13 také obsahuje 3' UTR.

Pokud není jinak uvedeno, v zájmu ujasnění a stručnosti, všechny odkazy na umístění nukleotidů v hPS1 odvozených nukleotidových sekvencí budou využívat číslování basí podle SEQ ID NO: 1 (L42110), hPS1 cDNA sekvence začínající exonem 1. V této cDNA je exon 1 připojen přímo na exon 3, který je připojen na exony 4 - 13. V SEQ ID NO: 1 se exon 1 rozkládá v nukleotidové pozici 1 - 113, exon 3 se rozkládá v pozici 114 - 195, exon 4 se rozkládá v pozici 196 až 335, exon 5 se rozkládá v pozici 336 až 586, exon 6 se rozkládá v pozici 587 až 728, exon 7 se rozkládá v pozici 729 až 796, exon 8 se rozkládá v pozici 797 až 1017, exon 9 se rozkládá v pozici 1018 až 1116, exon 10 se rozkládá v pozici 1117 až 1203, exon 11 se rozkládá v pozici 1204 až 1377, exon 12

se rozkládá v pozici 1378 až 1496, exon 13 se rozkládá v pozici 1497 až 2765. Podobně, pokud není jinak uvedeno, všechny odkazy na umístění aminokyselin v hPS1 odvozených proteinových sekvencích budou využívat číslování zbytků podle SEQ ID NO: 2, translačního produktu SEQ ID NO: 1.

Obklopující genomové sekvence byly získány pro exony 1 - 12 a jsou presentovány v SEQ ID NO: 5 - 14 (přírůstková čísla L76518 - L76527). Genomová sekvence 5' z exonu 13 byla také určena a je presentována v SEQ ID NO: 15 (přírůstková číslo L76528). SEQ ID NO: 5 - 14 také obsahují kompletní exonové sekvence. SEQ ID NO: 15, nicméně, neobsahuje 3' konec exonu 13. Genomové sekvence korespondující exonům 1 a 2 jsou umístěny přibližně 240 bp od 2,6 kb BamHI-HindIII fragmentu, SEQ ID NO: 5. Exony 3 a 4 (které obsahují ATG start kodon) jsou umístěny na separátním 3 kb BamHI fragmentu. Kompletní sekvence intronu 2 mezi BamHI místem 850 bp downstream od exonu 2 a BamHI místem 600 bp upstream od exonu 3 nebyla ještě identifikována a nebyla ihned získána rozšířeným PCR za použití primerů ze sousedících BamHI míst, což naznačuje, že intron 2 může být větší.

Analýzy nukleotidové sekvence sousedící s exony 1 a 2 (SEQ ID NO: 5) odhalila CpG dinukleotidy obsahující NotI restriční místo v intronu 1. Konsensuální sekvence pro několik putativních transkripčních regulačních proteinů obsahujících mnohá seskupení aktivátor proteinu - 2 (AP-2), signálních transducerů a aktivátorů transkripce (STAT3) (Schindler and Darnell, 1995), gamma aktivátorových sekvencí (Gas nebo STAT1), mnohotný start místo element downstream (MED) (Ince and Scotto, 1995) a GC elementy byly přítomny jak v intronu 1, tak v sekvenci 5' od exonu 1 (viz SEQ ID NO: 5). Dva putativní TATA boxy jsou přítomny

upstream od exonu 1, v bp 925 - 933 a 978 - 987 SEQ ID NO: 5, a jsou následovány dvěma putativními transkripčními iniciačními (CAP nebo Chambon-Trifonov) konsensuálními sekvencemi v 1002 - 1007 bp a 1038 - 1043 bp 484 SEQ ID NO: 5. Oproti tomu, sekvence ihned upstream od exonu 2 postrádá TATA boxy nebo CAP místa, ale je obohacena v seskupení CpG ostrůvků.

Schematická mapa strukturální organizace hPS1 genu je presentována na obrázku 1. Nekodující exony jsou znázorněny jako vytečkované rámečky. Kodující exony jsou znázorněny jako prázdné rámečky nebo šrafované rámečky pro alternativně sestřižené sekvence. Restrikční místa jsou: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; N = NotI; P = PstI; V = PvuII; X = XbaI. Přerušování v horizontální linii mezi restrikčními místy reprezentují nedefinované genomové sekvence. Klonované genomové fragmenty obsahující každý exon jsou znázorněny oboustrannými horizontálními šipkami. Velikost genomových subklonů a přírůstková čísla pro každou genomovou sekvenci jsou také dány.

Předpoklady DNA sekundární struktury založené na sekvenci nukleotidů v 290 bp upstream exonu 1 a v intronu 1 odhalily několik palindromů se stabilitou vyšší než 16 kcal/mol. Tyto analýzy sekundární struktury také předpověděly přítomnost tří stabilních motivů kmenových smyček (v bp 1119 - 1129/1214 - 1224; v bp 1387 - 1394/1462 - 1469; a v bp 1422 - 1429/1508 - 1515; vše v SEQ ID NO: 5) s velikostí smyčky dostatečnou pro obkroužení nukleosomu (asi 76 bp). Takové kmenové smyčkové struktury jsou běžnou vlastností genů obsahujících TATA (Kollmar and Farnham, 1993).

Souhrn vlastností těchto 5' regionů je presentován v tabulce

1. Všechny odkazy na umístění basí jsou ve vztahu k SEQ ID NO: 5.

Nejdelší předpokládaný otevřený čtecí rámeček v SEQ ID NO: 1 koduje protein o 467 aminokyselinách, SEQ ID NO: 2. Start kodon pro tento otevřený čtecí rámeček e první ve-fázy ATG umístěný downstream od TGA stop kodonu. Nejsou zde klasické konsensuální Kozak sekvence okolo prvních dvou ve ve fázy ATG kodonů (Sherrington et al., 1995). Jako jiné geny postrádající klasické "silné" start kodony, putativní 5' UTR lidských transkriptů je bohaté na GC.

B. Alternativní transkripce a sestřih hPS1 5' UTR

Ačkoliv první tři exony a část čtvrtého exonu obsahují netranslatované sekvence, analýza mnoha kompletních cDNA klonů izolovaných z cDNA knihovny lidského hippocampu (Stratagene, La Jolla CA) a z buněčné linie adenokarcinomu střeva (Caco2 od J. Rommens) ukázala, že u většiny klonů byly iniciální sekvence odvozeny od exonu 1 a byly přímo připojeny na exon 3 (přírůstkové číslo L42110, SEQ ID NO: 1). Méně často (1 z 9 klonů) byly prvně transkribované sekvence odvozeny od exonu 2 a byly připojeny na exon 3 (přírůstkové číslo L76517, SEQ ID NO: 3). Přímé sekvencování nukleotidů alespoň 40 nezávislých RT-PCR transkriptů izolovaných za použití primeru v exonu 1 selhalo při identifikaci klonů obsahujících jak exon 1, tak exon 2. Konečně, inspekce genomové sekvence upstream od exonu 2 neodhalila 3' sestřihávací místo sekvence. Tato pozorování argumentuje pro to, že exon 2 je skutečným iniciálním exonem spíše než alternativní sestřiženou formou transkriptů začínajících v exonu 1 nebo artefaktem cDNA klonování. Kromě toho, protože klon (cc44) obsahující exon 2 byl získán ze stejné monoklonální Caco2 buněčné linie, je pravděpodobné, že oba exon 1 obsahující transkripty a exon 2

obsahující transkripty existují ve stejné buňce.

Pro testování předpokladů o transkripčních iniciačních místech založených na sekvenci nukleotidů 5' upstream regionu v blízkosti exonu 1 jsme vyšetřovali 5' sekvenci tří nezávislých "kompletních" cDNA klonů obsahujících exon 1 (cc33, cc58 a cc48) a tří sekvencí získaných extensí primery za použití antisense primeru umístěného v exonu 3. Další 5' extenze byla pozorována v cDNA G40L, která mapovala nejproximálnější transkripční start místo na pozici 1214 bp v genomové sekvenci obsahující exon 1 SEQ ID NO: 5 (L76518), a která proto koresponduje pozici -10 SEQ ID NO: 1. Dva další klony (cDNA cc48 a 5' RACE produkt č. 5) nesly společné start místo v pozici 1259 bp v genomové sekvenci, SEQ ID NO: 5, což koresponduje pozici 34 v SEQ ID NO: 1. Dvě zbývající cDNA, stejně jako zbývající 5' RACE klony, začínaly ve více distálních pozicích v exonu 1. 5' RACE klon č. 8 začínal v pozici 1224 bp, shodné s pozicí 1 v SEQ ID NO: 1. Žádný z těchto klonů proto nesahal k předpokládanému CAP místu upstream od exonu 1. Díky nízké prevalenci transkriptů obsahujících iniciační sekvence z exonu 2 nebyly podobné studie jejich start míst provedeny.

C. Alternativní sestřih hPS1 ORF

Kromě transkriptů s různými iniciačními sekvencemi odhalila analýza mnoha cDNA klonů získaných z různých knihoven také dvě variace v PS1 transkriptech, které narušují ORF.

První z těchto je absence 12 nukleotidů z 3' konce exonu 4, nukleotidů 324 až 335 SEQ ID NO: 1. Toto může vznikat ze sestřihu exonu 4 po nukleotidu 323 místo po nukleotidu 335. Transkripty vzniklé z tohoto alternativního sestřihu exonu 4 nekodují aminokyselinové zbytky Val26-Arg27-Ser28-Gln29 SEQ ID NO: 2.

Transkripty vzniklé z těchto dvou alternativních sestřižení exonu 4 byly detekovány v přibližně stejné frekvenci ve všech přežívajících tkáních. U těchto dosud vyšetřovaných klonů je zajímavé, že myší PS1 transkripty obsahují pouze cDNA sekvence pro Ile26-Arg-27-Ser28-Gln29 a že sekvence pro Val-Arg-Ser-Gln motiv je pouze částečně konzervovaná v lidském PS2 jako Arg48-Ser49-Gln50 (Rogaev et al., 1995). Každé z těchto pozorování naznačuje, že tyto rozdíly nejsou zásadní pro vlastní PS1 funkci.

Druhá varianta sestřihu ovlivňující ORF vede k absenci exonu 9, nukleotidů 1018 až 1116 v SEQ ID NO: 1. Analýza RT-PCR produktů odvozených z mRNA mnoha tkání ukázala, že mozek (včetně neokortikálních oblastí typicky postižených AD) a několik jiných tkání (svaly, srdce, plíce, tlusté střevo) predominantně exprivují jeden transkript nesoucí exon 9. Leukocyty (ale ne lymfoblasty) na druhou stranu, také exprivují kratší formu postrádající exon 9. O alternativním sestřihu exonu 9 se předpokládá, že mění aspartatový zbytek v pozici 257 SEQ ID NO: 2 na alanin, že eliminuje dalších 33 zbytků a že vede k fúzy v rámečku na zbytek proteinu začínající threoninem v pozici 291 kodovaným v exonu 10.

D. hPS2 transkripty

Genomová DNA obsahující lidský hPS2 gen nebyla doposud plně charakterizována. Nicméně, mnoho podobností mezi PS1 a PS2 geny je jasných. Intron/exon vazba obou genů, nicméně, se zdá být velmi podobná nebo shodná s výjimkou regionu TM6->7 smyčky.

Hybridizace PS2 cDNA klonů na Northern Blotly detekovala asi

2,3 kb mRNA proužek v mnoha tkáních, včetně regionů mozku, stejně jako asi 2,6 kb mRNA proužek ve svalech, srdečním svalu a slinivce. PS2 je exprivován v nízké hladině ve většině regionů v mozku s výjimkou corpus callosum, kde je transkripce vysoká. Ve svalech skeletu, srdečním svalu a slinivce je PS2 gen exprivován v relativně vyšších hladinách než v mozku a jako dva různé transkripty 2,3 kb a 2,6 kb. Oba transkripty mají velikost zřetelně odlišnou od 2,7 kb PS1 transkriptu a nehybridizují zkříženě s PS1 probami za vysoké přísnosti. cDNA sekvence jedné hPS2 alely je identifikována SEQ ID NO: 18 (přírůstkové číslo: L44577).

Nejdelší ORF v této PS2 cDNA konsensuální nukleotidové sekvenci určuje polypeptid obsahující 448 aminokyselin (SEQ ID NO: 19) počítaných od prvního ve fázi ATG kodonu, v pozici 366 - 368 v SEQ ID NO: 18, který je obklopen Kozak konsensuální sekvencí. Stop kodon je v pozici 1710 - 1712.

Jako bylo provedeno pro PS1, analýza PS2 RT-PCR produktů z několika tkání, včetně mozku a svalů, RNA ukázala dvě alternativní varianty sestřižení, ve kterých může být relativně velký segment vystřižen. Tak, s relativně nízkou frekvencí, jsou produkovány transkripty, ve kterých jsou nukleotidy 1152 - 1250 PS2 transkriptu, SEQ ID NO: 18, (kodující zbytky 263 - 295, SEQ ID NO: 19) alternativně sestřiženy. Jak bylo uvedeno výše, toto sestřižení těsně koresponduje s alternativním sestřihem exonu 9 PS1 (Rogaev et al., 1995).

Další varianta sestřihu PS2 cDNA sekvence postrádající GAA triplet v pozici nukleotidů 1338 - 1340 v SEQ ID NO: 18 může být také nalezena ve všech vyšetřovaných tkáních. Tento alternativní

sestřih vede k vynechání Glu zbytku v aminokyselinové pozici 325.

6. Struktura presenilinových proteinů

A. Rodina presenilinových proteinů

Preseniliny jsou nyní popsány jako nová rodina vysoce konzervovaných integrálních membránových proteinů se společným strukturálním motivem, společnými vzory alternativního sestřihání, a společnými mutačními regiony **hot spots**, které korelují s putativními strukturálními doménami, které jsou přítomné u mnoha zvířecích buněk od bezobratlých a od obratlovců. Analýza předpokládaných aminokyselinových sekvencí lidských genů pro preseniliny za použití Hopp and Woods algoritmu naznačila, že proteiny jsou rozsáhlé integrální membránové proteiny jako jsou receptory, kanálové proteiny nebo strukturální membránové proteiny. Kyte-Doolittle hydropatické znázornění putativního hPS1 proteinu je znázorněno na obrázku 2. Hydropatické znázornění a strukturální analýzy naznačují, že tyto proteiny mají asi sedm hydrofobních transmembránových domén (označených TM1 až TM7) separovaných hydrofilními smyčkami. U jiných modelů může být předpokládáno, že mají nejméně 5 a nejvíce 10 transmembránových domén v závislosti na parametrech použitých v algoritmu pro tento předpoklad. Přítomnost sedmi membránu překlenujících domén, nicméně, je charakteristikou několika tříd G-vázaných receptorových proteinů, ale je také pozorována u jiných proteinů (např. kanálových proteinů). Absence rozpoznatelného signálního peptidu a malý počet glykosylačních míst jsou pozoruhodné.

Aminokyselinové sekvence hPS1 a mPS1 proteinů jsou srovnány na obrázku 3 a sekvence hPS2 a mPS2 proteinů jsou srovnány na obrázku 4. V každém obrázku jsou shodné aminokyselinové zbytky

ukázány horizontálními čarami. Sedm putativních transmembránových domén je ukázáno horizontálními liniemi nad nebo pod sekvencemi.

Hlavní rozdíly mezi členy této rodiny jsou v sekvencích aminokyselin hydrofilních, acidických smyčkových domén na N-konci a mezi putativní TM6 a TM7 doménou presenilinových proteinů (TM6->7 smyčka). Většina ze zbytků kodovaných hPS1 exonem 9, který je alternativně sestřižen v některých non-neurálních tkáních, tvořila část putativní TM6->7 smyčky. Kromě toho, u korespondujících alternativně sestřižených variant identifikovaných v hPS2 se zdálo, že kodují část TM6->7 smyčky. Variabilní sestřih této hydrofilní smyčky a skutečnost, že aminokyselinová sekvence smyčky se liší mezi členy genové rodiny, naznačuje, že tato smyčka je významnou funkční doménou proteinu a může udílet určitou specificitu fyziologickým a patogením interakcím jednotlivých presenilinových proteinů. Protože N-terminální hydrofilní doména nese určitý acidický náboj jako TM6->7 hydrofilní acidická smyčka a v modelu sedmi transmembránových domén je pravděpodobné, že má stejnou orientaci s ohledem na membránu, a je také variabilní mezi preseniliny, je velmi pravděpodobné, že tyto dvě domény mají funkci buď koordinovaným nebo nezávislým způsobem (např. stejné nebo různé ligandy nebo funkční vlastnosti). Tak je pravděpodobné, že N-konec je také významnou funkční doménou proteinu a může udílet určitou specificitu fyziologickým a patogením interakcím jednotlivých presenilinových proteinů.

Jak je podrobněji popsáno níže, patogení mutace v PS1 a PS2 seskupení v oblasti TM1->2 smyčkové a TM6->7 smyčkové domény dále naznačují, že tyto domény jsou funkčními doménami těchto proteinů. Obrázky 5 a 6 jsou schematické obrázky předpokládané

struktury PS1 a PS2 proteinů, v příslušném pořadí, se známými mutačními místy ukázanými na obrázcích. Jak je ukázáno na obrázcích, TM1->2 vazebná sekvence je předpokládaně umístěná na opačné straně membrány než je N-konec a TM6->7 smyčka, a může být významná ve transmembránové komunikaci. Toto je podporováno PS1 Y115H mutací, která byla pozorována v rodokmenech s časným nástupem familiární AD (30 - 40 roků) a dalšími mutacemi v TM1/2 šroubovicích, u kterých může být očekáváno, že destabilizují smyčku. TM1->2 smyčka je relativně krátká (PS1: zbytky 101 - 132; PS2: zbytky 107 - 134), což činí tuto sekvenci více přístupnou pro konvenční syntesu peptidů. Sedm PS1 mutací je seskupeno v regionu mezi kodonem 82 a kodonem 146, který obsahuje putativní první transmembránovou doménu (TM1), TM1->2 smyčku a TM2 doménu v PS1. Obdobně, mutace v kodonu 141 PS2 je také umístěna v TM2 doméně. Tyto mutace pravděpodobně destabilizují TM1->2 smyčkovou doménu a její kotvící bod v TM1 a TM2. Dvanáct PS1 mutací vede k alteraci aminokyselin mezi kodony 246 a 410, které jsou zahrnuty v TM6, TM6->7 smyčce, a TM7 doméně. Tyto mutace mohou modifikovat strukturu nebo stabilitu TM6->7 smyčky (buď přímo nebo modifikací konformace TM6 nebo TM7).

Další důkaz pro významnou funkční roli umístěnou v TM6->7 smyčce je divergence sekvence v centrální části TM6->7 smyčky (přibližně aminokyseliny 300 - 671) mezi různými členy presenilinové rodiny proteinů. Podobně, jelikož N-terminální sekvence členů presenilinové rodiny proteinů je také divergentní, je pravděpodobné, že mírně divergentní sekvence hrají roli v udílení specificity funkce pro každý z různých presenilinových proteinů, zatímco konzervované sekvence udílejí společné biologické aktivity. Tyto regiony mohou reprezentovat ligandová vazebná místa. Pokud je tomu tak, pak mutace v TM6->7 regionu

pravděpodobně modifikují vazebnou aktivitu ligandu. TM1->2 smyčka, která je konzervována mezi různými členy presenilinové rodiny proteinů, pravděpodobně reprezentuje efektorovou doménu na opačné straně membrány. S výjimkou mutace sestřihu exonu 10, většina z jiných (chybných) mutací je připojena na stejné povrchy putativních transmembránových šroubovic, což naznačuje, že mohou ovlivňovat vazbu ligandu a funkci kanálů. Tak tyto domény (naúř. TM6->7 a TM1->2 smyčky) mohou být použity jako místa pro vývoj specifických vazebných agens pro inhibici účinku mutací a/nebo pro znovunastolení normální funkce presenilinového proteinu u subjektu s Alzheimerovou chorobou.

Podobnost mezi putativními produkty *C. elegans* SPE-4 a PS1 geny implikuje, že mohou mít podobné aktivity. U SPE-4 proteinu se zdá, že je zahrnut ve tvorbě a stabilizaci komplexu fibrosní tělo - membránová arganela (FBMO) během spermatogenese. FBMO je specializovaná organela odvozená od Golgiho systému, která se skládá z membránově vázaných váčků připojených na a částečně obklopených komplexem paralelních proteinových vláken a může být zahrnuta v transportu a skladování solubilních a na membránu vázaných polypeptidů. Mutace v SPE_4 narušují FBMO komplexy a ukončují spermatogenesi. Proto může být fyziologickou funkcí SPE-4 buď stabilizace mezi integrálním mebránovým pučením a fúsemi, nebo stabilizace interakcí mezi membránovými a fibrilárními proteiny v průběhu intracelulárního transportu FBMO komplexu během spermatogenese. O srovnatelných funkcích je možné uvažovat pro preseniliny. Například, PS1 může být zahrnut buď v prostoru jiných na membránu vázaných proteinů jako je β APP, nebo v axonálním transportu a fúsním štěpení membránově vázaných vesikulí během transportu proteinů, tak jako v Golgiho aparátu nebo systému endosom-lysosom. Pokud jsou tyto hypotese

správné, pak může být u mutací očekáváno, že povedou k aberantnímu transportu a zpracování β APP a/nebo abnormálním interakcím s proteiny cytoskeletu jako je s mikrotubuly asociovaný protein Tau. Abnormality v intracelulární a extracelulární dispozici β APP a Tau jsou skutečně součástí neuropatologických vlastností Alzheimerovy choroby. Ačkoliv umístění PS1 a PS2 mutací ve vysoce konzervovaných zbytcích v konzervovaných doménách putativních proteinů naznačují, že jsou patogení, jsou alespoň tři z těchto mutací sami konzervativní, což je v souladu s nástupem choroby v dospělosti. Jelikož žádná z těchto dosud pozorovaných mutací není delece ani nesmyslná mutace, u kterých je předpokládáno, že způsobují úplnou ztrátu exprese nebo funkce, nemůžeme předpokládat, zda tyto mutace budou mít dominantní účinek nabytí funkce, což navodí aberantní zpracování β APP nebo dominantní účinek ztráty funkce, což způsobí zástavu normálního zpracování β APP. Sestřihová mutace exonu 10 způsobuje fúzy v rámečku exonu 9 na exon 10 a může mít strukturální účinek na PS1 protein, což může pozměnit intracelulární zaměření nebo vazbu ligandu, nebo to může jinak ovlivnit funkci PS1.

Alternativní možností je, že produkt PS1 genu může reprezentovat receptor nebo protein kanálu. Mutace takového proteinu může být v příčinném vztahu k několika jiným neurologickým chorobám jak u obratlovců (např. maligní hypertermie, hyperkalemická periodická paralýza u lidí), tak u bezobratlých organismů (deg-1(d) mutanty *C. elegans*). Ačkoliv se patologie těchto jiných onemocnění nepodobá patologii Alzheimerovy choroby, existuje zde důkaz pro funkční abnormality iontových kanálů u Alzheimerovy choroby. Například, byly popsány anomálie v tetra-ethylamonium-senzitivním 113pS draslíkovém

kanálu a v homeostase vápníku. Poruchy v transmembránovém proudění vápníku mohou být zejména relevantní ve světle slabé homologie mezi PS1 a α -ID podjednotkou napětově závislého vápníkového kanálu a ve světle pozorování, že zvýšení intracelulárního vápníku v kultivovaných buňkách může napodobit některé biochemické vlastnosti Alzheimerovy choroby, jako je alterace ve fosforylaci Tau-s mikrotubuly asociovaného proteinu a zvýšená produkce A β -peptidů.

B. Struktura hPS1

Jak je ukázáno v SEQ ID NO: 2, největší známá forma lidského PS1 proteinu obsahuje 467 aminokyselin a má předpokládanou molekulovou hmotnost asi 51,37 kDa. Varianta s výše popsáním alternativním sestřižením exonu 4 (ve které jsou deletovány zbytky korespondující pozicím 26 - 29 SEQ ID NO: 2) bude obsahovat o 4 aminokyseliny méně a bude mít hmotnost okolo 50,93 kDa. Podobně, varianta s výše popsáním alternativním sestřižením exonu 9 (ve které jsou deletovány zbytky korespondující pozicím 258 - 290 SEQ ID NO: 2) bude obsahovat o 33 aminokyselin méně a bude mít hmotnost okolo 47,74 kDa.

Umístění putativních domén je presentováno v tabulce 2. Znovu si povšimněte, že číslování pozice zbytků je s ohledem na SEQ ID NO: 2 a je přibližné (t.j. $\pm$ 2 zbytky).

Schematické znázornění putativní PS1 struktury je ukázáno na obrázku 5. N-konec je vysoce hydrofilní, negativně nabitá doména s několika potenciálními fosforylačními doménami, následovaná sekvenčně hydrofobní membránu překlenující doménou o přibližně 19 zbytcích (TM1), nabitou hydrofilní smyčkou o přibližně 32

zbytcích (TM1->2), pěti dalšími membránu překlenujícími doménami (TM2 až TM6) oddělenými krátkými (1 - 15 zbytků) hydrofilními doménami (TM2->3 až TM5->6) a další rozsáhlou, acidickou hydrofilní nabitou smyčkou (TM6->7) a alespoň jednou (TM7) a možná dvěma, jinými hydrofobními potenciálně membránu překlenujícími doménami, kulminujícími v polární doméně na C-konci.

Protein také obsahuje mnoho potenciálních fosforylačních míst, kde jedním z nich je MAP kinasa konsensuální místo, které je také obsaženo v hyperfosforylaci Tau během konverze normálního Tau na neurofibrilární síť. Tato konsensuální sekvence může poskytnout putativní element vážící tuto proteinovou aktivitu na jiné biochemické aspekty Alzheimerovy choroby, a může reprezentovat pravděpodobný terapeutický cíl. Prohlídka proteinové struktury odhalila dvě sekvence YTPF (zbytky 115 - 118, SEQ ID NO: 2) a STPE (zbytky 353 - 356, SEQ ID NO: 2), které reprezentují 5/T-P motiv, který je MAP kinasa konsensuální sekvencí. Několik jiných fosforylačních míst existuje s konsensuálními sekvencemi pro protein kinasa C (PKC) aktivitu. Protože PKC aktivita je asociována s odlišnostmi metabolismu APP, které jsou relevantní k Alzheimerově chorobě, jsou tato místa na PS1 proteinu a jeho homolozích také cílem pro terapeutika. Předběžné důkazy ukazují, že, alespoň v transfektovaných buňkách, PS1 protein je fosforylován pouze v malé míře, zatímco PS2 protein je signifikantně fosforylován. Alespoň pro PS2 se zdá, že se tato fosforylace vyskytuje na serinových zbytcích na N-terminální doméně mechanismem, který nevyžaduje PKC (Capell et al., 1996).

Povšimněte si, že alternativní sestřih na konci exonu 4 odstraňuje 4 aminokyseliny z hydrofilní N-terminální domény a

může být očekáváno, že odstraňuje konsensuální fosforylační sekvenci. Kromě toho, alternativní sestřih exonu 9 vede ke zkrácené izoformě PS1 proteinu, kde je nepřítomno pět terminálních hydrofobních zbytků TM6 a část hydrofilní negativně nabitě TM6->7 smyčky ihned C-terminálně k TM6. Tato alternativně sestřižená izoforma je charakterizována zachováním sekvence z N-konce dále a tím, že obsahuje tyrosin v pozici 256 SEQ ID NO: 2, změnu aspartatu v pozici 257 na alanin a sestřihC-terminální části proteinu a tím, že obsahuje tyrosin 291. Takové rozdíly v sestřihu jsou často asociovány s důležitými funkčními doménami proteinů. Toto dokazuje, že tato hydrofilní smyčka (a následně N-terminální hydrofilní smyčka s podobným aminokyselinovým nábojem) je/jsou aktivní funkční domény PS1 produktu a tak jsou místem pro terapeutický zásah.

C. Struktura lidského PS2

Lidské PS1 a PS2 proteiny vykazují 63% celkovou identitu aminokyselin a několik domén vykazuje úplnou identitu. Jak může být proto očekáváno, analýzy hydrofobicity naznačují, že oba proteiny také mají podobnou strukturální organizaci. Tak je o obou proteinech předpokládáno, že mají sedm hydrofobních putativních transmembránových domén a oba proteiny mají velké acidické hydrofilní domény na N-konci a mezi TM6 a TM7. Další podobnost byla zřejmá z výše popsané strukturální analýzy RT-PCR produktů z mozkové a svalové RNA, která ukázala, že nukleotidy 1153 - 1250 PS2 transkriptu jsou alternativně sestřiženy. Tyto nukleotidy kodují aminokyseliny 263 - 296, které jsou umístěny v TM6->7 smyčkové doméně putativního PS2 proteinu a které mají 94% identitu sekvence s alternativně sestřiženými aminokyselinami 257 - 290 v PS1.

Umístění putativních domén hPS2 proteinu je presentováno v tabulce 3. Povšimněte si, že číslování pozice zbytků je s ohledem na SEQ ID NO: 19 a je přibližné (t.j. ± 2 zbytky).

Schematické znázornění putativní PS2 struktury je ukázáno na obrázku 6. Podobnost mezi hPS1 a hPS2 je největší v několika doménách proteinu korespondujících intervalům mezi TM1 a TM6, a od TM7 do C-konce PS1 proteinu. Hlavní rozdíly mezi PS1 a PS2 jsou ve velikosti a sekvencích aminokyselin negativně nabitě hydrofilní TM6->7 smyčky a v sekvencích N-terminálních hydrofilních domén.

Nejpatrnější rozdíly mezi dvěma předpokládanými aminokyselinovými sekvencemi se vyskytují v centrální části TM6->7 hydrofilní smyčky (zbytky 304 - 374 hPS1; 310 - 355 hPS2) a v N-terminální hydrofilní doméně. Analogicky, tato doména je také méně vysoce konzervována mezi myším a lidským PS1 genem (identita = 47/60 zbytků) a nevykazuje žádnou podobnost k ekvivalentním regionům SPE-4.

7. Presenilinové mutanty

A. PS1 mutanty

Bylo identifikováno několik mutací v PS1 genu, které způsobují vážný typ familiární Alzheimerovy choroby. Jedna nebo kombinace těchto mutací může být odpovědná za tuto formu Alzheimerovi choroby, stejně jako za několik jiných neurologických onemocnění. Mutace mohou být jakoukoliv formou substituce, inserce nebo

delece nukleotidové sekvence, které vedou ke změnám v předpokládané sekvenci aminokyselin nebo které vedou k aberantnímu zpracování transkriptu, aberantní hladině nebo stabilitě. Specifické choroby způsobující mutace ve formě nukleotidových a/nebo aminokyselinových delecí nebo substitucí jsou popsány níže, ale je předpokládáno, že další mutace mohou být nalezeny u jiných rodin. Skutečně, po počátečním objevu pěti různých chybných mutací u osmi různých rodokmenů (Sherrington et al., 1995) bylo očekáváno ze zkušeností z jiných dědičných onemocnění (např. amyotrofické laterální sklerosy asociované s mutací v Ca^{2+} superoxid dismutasovém genu), že budou identifikovány další mutace. Toto očekávání bylo naplněno naším následujícím objevem dalších mutací presenilinů (Rogaev et al., 1995) a obdobnými pozorováními, která uskutečnili jiní (např. Cruts et al., 1995; Campion et al., 1995). Tak, jak je zde použito s ohledem na PS1 geny a proteiny, není termín "mutantní" omezen na tyto jednotlivé mutace, ale spíše je konstruován tak, jak je definováno výše.

Přímé sekvencování překrývajících se RT-PCR produktů pokrývajících 2,8 kb S182 transkript izolovaný od postižených členů šesti velkých rodokmenů vázaných na chromosom 14 vedlo nejprve k objevu pěti chybných mutací v každém ze šesti rodokmenů. Každá z těchto mutací kosegregovala s onemocněním v příslušném rodokmenu a nebyla přítomná v asi 142 nepříbuzných neurologicky normálních subjektů stejného etnického původu jako FAD rodokmeny (248 nepříbuzných chromosomů). Umístění genu v fyzikálním intervalu segregujícím s AD3 rysem, přítomnost osmi různých chybných mutací, které kosegregovaly s rysem onemocnění v šesti rodokmenech definitivně vázaných na chromosom 14 a nepřítomnost těchto mutací v 284 nezávislých normálních

chromosomech dohromady potvrdila, že PS1 gen je AD3 lokus. Další biologická podpora pro tuto skutečnost vychází ze skutečnosti, že zbytky mutované u FAD příbuzných jsou konservovány v evoluci (např. hPS1 v. mPS1), že mutace jsou umístěny v doménách proteinu, které jsou také vysoce konservované u homologů jiných obratlovců a bezobratlých a že produkt PS1 genu je exprimován ve vysokých hladinách ve většině regionů mozku, včetně těch, které jsou nejvážněji postiženy AD.

Od původního objevu PS1 genu bylo zmapováno mnoho dalších mutací asociovaných s rozvojem AD. Tabulka 4 charakterizuje mnoho z nich. Každá z pozorovaných delecí nebo substitucí nukleotidů se vyskytla v putativním ORF PS1 transkriptu a určuje změnu kodované aminokyseliny v ukázané pozici. Mutace jsou uvedeny s odkazem na jejich nukleotidové umístění v SEQ ID NO: 1 a s ohledem na jejich aminokyselinové umístění v SEQ ID NO: 2. Vstup "NA" ukazuje, že data nejsou dostupná.

Jak bude zmíněno v další sekci, bylo také nalezeno mnoho PS2 mutací. Srovnání hPS1 a hPS2 sekvencí je ukázáno na obrázku 4 a ukazuje, že tyto patogení mutace jsou v regionech PS2 proteinu, které jsou konservovány v PS1 proteinu. Proto, korespondující mutace v PS1 proteinu mohou také být očekávány jako patogení a jsou obsaženy v PS1 mutantech zde poskytnutých. Dále, jakékoliv patogení mutace identifikované v jakémkoliv konservovaném regionu genu pro presenilin mohou být považovány za reprezentující mutant jiných presenilinů, které nesou tento konzervovaný region.

Zajímavé je, že mutace A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280G, A285V, L286V, 291-319, G384A, L392V a C410Y se všechny vyskytují v nebo poblíž acidické hydrofilní smyčky mezi

putativními transmembránovými doménami TM6 a TM7. Osm z těchto mutací (A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280G, A285V, L286V) je také umístěno v alternativně sestřižené doméně (zbytky 257 - 290 v SEQ ID NO: 2).

Všechny z těchto mutací mohou být testovány mnoha strategiemi (přímé sekvencování nukleotidů, ligační polymerasová řetězová reakce, SSCP, RFLP, nové "DNA chip" technologie, atd.) za použití RT-PCR produktů reprezentujících zralé mRNA/cDNA sekvence nebo genomovou DNA.

Konečně, mělo by být zmíněno, že bylo zjištěno také několik polymorfismů, které neměly zřejmý škodlivý účinek. Jeden z nich, T->G změna nukleotidu 863 SEQ ID NO: 1, způsobuje F205L polymorfismus v TM4. Jiné (C->A v bp 1700; G->A v bp 2603; delece bp2620) jsou v 3' UTR.

B. PS2 mutanty

Silná podobnost mezi PS1 a PS2 genovými produkty vedla k možnosti, že PS2 gen může být místem onemocnění způsobujících mutací v některých z malého počtu AD rodokmenů s časným nástupem, u kterých studie genetické vazby vyloučily chromosomy 14, 19 a 21. RT-PCR byla použita pro izolaci cDNA korespondujících k PS2 transkriptu z lymfoblastů, fibroblastů nebo mrtvé mozkové tkáně od postižených členů osmi rodokmenů s časným nástupem FAD, u kterých byly mutace ve β APP a PS1 genech dříve vyloučeny studiemi přímým sekvencováním.

Vyšetření těchto RT-PCR produktů detekovalo heterozygotní A->G substituci v nukleotidu 1080 u všech čtyř postižených členů

rozšířeného rodokmenu italského původu (Flo10) s časným nástupem patologicky potvrzené FAD (nástup 50 - 70 let). O této mutaci může být předpokládáno, že způsobuje Met->Val chybnou mutaci v kodonu 239 v TM5.

Druhá mutace (A->T v nukleotidu 787) způsobující Asn->Ile substituci v kodonu 141 v TM2 byla nalezena u postižených členů skupiny příbuzných rodokmenů Volga German původu (representován buněčnými liniemi AG09369, AG09907, AG09952 a AG09905, Coriell Institute, Camden NJ). Signifikantně, jeden subjekt (AG09907) byl homozygotní pro tuto mutaci, což je pozorování, které je kompatibilní s přirozeným křížením těchto rodokmenů. Signifikantně, tento subjekt neměl signifikantně odlišný obraz od subjektů heterozygotních pro N141I mutaci. Mutace PS2 genu nebyly nalezeny v 284 normálních kavkazských kontrolách ani nebyly přítomny u postižených členů rodokmenů s AD3 typem AD.

Obě tyto PS2 mutace způsobují substituce zbytků, které jsou vysoce konzervovány v PS1/PS2 genové rodině.

Další PS2 mutace je způsobena T->C substitucí v páru bazí 1624, což způsobuje substituci Ile na Thr v kodonu 420 C-konce. Tato mutace byla nalezena v dalších případech familiární AD s časným nástupem (45 let).

Tyto hPS2 mutace jsou uvedeny v tabulce 5 s odkazem na jejich nukleotidové umístění v sekvenční SEQ ID NO: 18 a s odkazem na jejich aminokyselinovou pozici v SEQ ID NO: 19. Vstup "NA" ukazuje, že data nejsou dostupná.

Jak bylo zmíněno v předchozí sekci, bylo také nalezeno mnoho

PS1 mutací. Srovnání hPS1 a hPS2 sekvencí je ukázáno na obrázku 4 a ukazuje, že tyto patogení mutace jsou v regionech PS1 proteinu, které jsou rozsáhle konzervovány v PS2 proteinu. Proto, korespondující mutace v PS2 proteinu mohou také být očekávány jako patogení a jsou obsaženy v PS2 mutantech zde poskytnutých. Dále, jakékoliv patogení mutace identifikované v jakémkoliv konzervovaném regionu genu pro presenilin mohou být považovány za reprezentující mutant jiných presenilinů, které nesou tento konzervovaný region.

Nalezení genu, o jehož produktu se soudí, že nese významné aminokyselinové a strukturální podobnosti s produktem PS1 genu naznačuje, že tyto proteiny mohou být ve funkčním vztahu jako nezávislé proteiny s překrývající se funkcí, ale snad s mírně odlišnými specifickými aktivitami, jako fyzikálně asociované podjednotky multimerického polypeptidu nebo jako nezávislé proteiny provádějící následující funkce ve stejné dráze.

Pozorování tří různých chybných mutací v konzervovaných doménách PS2 proteinu u subjektů s familiární formou AD naznačuje, že tyto mutace jsou, podobně jako mutace v PS1 genu, příčinné pro AD. Tento závěr je signifikantní jelikož, ačkoliv fenotyp onemocnění asociovaný s mutacemi v PS1 genu (nástup 30 - 50 let, trvání 10 let) je nepatrně odlišný od fenotypu asociovaného s mutacemi PS2 genu (nástup 40 - 70 let, trvání více než 20 let), obecné podobnosti jasně ukazují, že biochemická dráha vyjadřovaná členy této genové rodiny je centrální pro genesi alespoň AD s časným nástupem. Jemné rozdíly ve fenotypu onemocnění mohou odrážet nižší hladinu exprese PS2 transkriptu v CNS, nebo mohou odrážet odlišnou roli pro genový produkt PS2.

Analogicky k účinkům PS1 mutací může PS2, pokud je mutován, způsobit aberantní zpracování APP (Prokursorový protein pro amyloid) na A β peptid, hyperfosforylaci Tau s mikrotubuly asociovaného proteinu a abnormality v intracelulární homeostase vápníku. Interferenční s těmito abnormálními interakcemi poskytuje cíl pro terapeutické intervence u AD.

Konečně, byl nalezen alespoň jeden nukleotidový polymorfismus u jednoho normálního individua, jehož PS2 cDNA měla T->C změnu v bp 626 SEQ ID NO: 18, bez jakékoliv změny v kodované sekvenci aminokyselin.

III. Preferovaná provedení

Částečně na základě objevů zde popsaných jsou poskytnuta následující preferovaná provedení předkládaného vynálezu

1. Izolované nukleové kyseliny

V jedné serii provedení poskytuje předkládaný vynález izolované nukleové kyseliny korespondující k, nebo ve vztahu k, sekvenci nukleové kyseliny pro presenilin, která je zde popsána. Jak je podrobněji popsáno dále, tyto sekvence obsahují normální PS1 a PS2 sekvence od lidí a od jiných druhů savců, homologní sekvence z nesavčích druhů jako je *Drosophila* a *C. elegans*, podsady těchto sekvencí použitelné jako proby a PCR primery, podsady těchto sekvencí kodujících fragmenty presenilinových proteinů nebo korespondujících jednotlivých strukturálních domén nebo polymorfních regionů, komplementární nebo antisense sekvence korespondující fragmentům presenilinových genů, sekvence, ve

kterých byl presenilin kodující region operativně připojen na exogení regulační regiony a sekvence kodující fúsní proteiny částí presenilinových proteinů fúsovaných na jiné proteiny použitelné jako markery exprese, jako "cíle" pro purifikaci nebo ve vyšetřeních a testech pro proteiny interagující s preseniliny.

Tak v první serii provedení jsou poskytnuty izolované sekvence nukleových kyselin, které kodují normální nebo mutantní verze PS1 a PS2 proteinů. Příklady takových sekvencí nukleových kyselin jsou zde popsány. Tyto nukleové kyseliny mohou být genomové sekvence /např. SEQ ID NO: 5 - 15) nebo mohou být cDNA sekvence (např. SEQ ID NO: 1, 3, 16 a 18). Kromě toho, nukleové kyseliny mohou být rekombinantní geny nebo "minigeny", ve kterých všechny nebo některé introny různých kombinací intronů a exonů a lokálně cis účinkujících regulačních elementů mohou zapracovány v propagaci nebo expresi konstruktů nebo vektorů. Tak, například, vynález poskytuje sekvence nukleové kyseliny, ve které jsou inkorporovány alternativně sestřižené variace zde popsané na DNA úrovni, což umožňuje buňkám obsahujícím tyto sekvence exprimovat pouze jednu z alternativně sestřižených variant v každé pozici sestřihu. Například, může být produkován rekombinantní gen, ve kterém 3' konec exonu 1 PS1 genu (bp 1337 SEQ ID NO: 5) je připojen přímo na 5' konec exonu 3 (bp 588 SEQ ID NO: 6) takže je produkován pouze transkript korespondující predominantnímu transkriptu. Nezávisle na tom může být vytvořen rekombinantní gen "posilující" alternativní sestřih exonu 2 a exonu 3. Obdobně, mohou být produkovány rekombinantní geny, ve kterých jsou inkorporovány exon 4 nebo exon 9 sestřihové varianty PS1 (nebo korespondující TM6->7 sestřihové varianty PS2) do DNA, takže buňky obsahující tento rekombinantní gen mohou exprimovat pouze jednu z těchto variant. Za účelem redukce velikosti

rekombinantního genu pro presenilin může být využita cDNA nebo mohou být různé kombinace netranslatovaných exonů a intronů odstraněny z DNA konstruktů. konečně, mohou být produkovány rekombinantní geny, ve kterých je 5' UTR pozměněn, takže transkripční probíhá nutně od jednoho nebo od druhého ze dvou transkripčních iniciačních míst. Takové konstrukty mohou být zejména užitečné, jak je popsáno níže, v identifikaci sloučenin, které mohou indukovat nebo reprivovat expresi presenilinů. Mnoho variací těchto provedení je nyní poskytnuto detailním popisem genů pro preseniliny, který je zde poskytnut.

Kromě popsaných sekvencí pro presenilin je odborník v oboru nyní schopen identifikovat a izolovat nukleové kyseliny reprezentující geny pro preseniliny nebo cDNA, které jsou alelické k popsaným sekvencím nebo které jsou heterospecifické homology. Tak, předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny korespondující k těmto alelám a homologům, stejně jako různé výše popsané rekombinantní konstrukty odvozené z těchto sekvencí, prostředky, které jsou v oboru dobře známé. Stručně, odborník v oboru může nyní vyšetřovat přípravky genomové nebo cDNA, včetně vzorků připravených z jednotlivých organismů (např., lidských AD pacientů nebo členů jejich rodiny) stejně jako bakteriální, virové, kvasinkové a jiné knihovny na genomovou nebo cDNA, za použití prob nebo PCR primerů pro identifikaci alelických nebo homologních sekvencí. protože je žádoucí identifikovat další mutace genu pro presenilin, které mohou přispívat k rozvoji AD nebo jiných onemocnění, protože je žádoucí identifikovat další presenilinové polymorfismy, které nejsou patogení a protože je také žádoucí vytvořit různé zvířecí modely, které mohou být použity pro studium AD a pro vyhledávání potenciálních terapeutik, je zejména předpokládáno, že další

presenilinové sekvence budou izolovány z jiných přípravků nebo knihoven lidských nukleových kyselin a z přípravků nebo knihoven od zvířat včetně krys, myší, křečků, morčat, králíků, psů, koček, koz, ovcí, prasat, a ne-lidských primátů. Dále, homology presenilinu od kvasinek nebo jiných druhů bezobratlých, včetně *C. elegans* nebo jiných hlístů, stejně jako *Drosophila* nebo jiného hmyzu, mohou být zejména užitečné pro vyšetřování léčiv. Například, bezobratlý nesoucí mutantní presenilinové homology (nebo savčí presenilinové transgeny), které způsobují rychle se vyskytující a snadno odečitatelný fenotyp (např. abnormální vulvu nebo vývoj oka po několika dnech) mohou být pro vyhledávání léčiv, která blokují účinek mutantního genu. Takový bezobratlý mohou sloužit o mnoho rychleji a účinněji pro hromadné vyšetřování než obratlovci. Pokud je takovýmto způsobem nalezena sloučenina, může být testována na vyšších zvířatech.

Standartní hybridizační vyšetření nebo PCR techniky mohou být použity (jak jsou použity, například, v identifikaci mPS1 genu) pro identifikaci a/nebo izolaci takových alelických a homologních sekvencí za použití relativně krátké sekvence genu pro presenilin. Sekvence mohou obsahovat 8 nebo méně nukleotidů v závislosti na charakteru cílové sekvence, použité metodě a požadované specificitě. Budoucí vývoj techniky může umožnit použití ještě kratších sekvencí. S nyní dostupnou technologií jsou preferovány sekvence 9 - 50 nukleotidů, a lépe okolo 18 - 24 nukleotidů. Tyto sekvence mohou být vybrány z těch, které jsou zde popsány, nebo mohou být odvozeny od alelických nebo heterospecifických homologů zde popsanych. Při probování mRNA nebo při vyšetřování cDNA knihoven jsou preferovaně použity proby a primery z kodujících sekvencí (spíše než introny) a sekvence, které jsou vynechány v alternativně sestřižených variantách jsou

typicky vypuštěny, pokud není specificky požadována identifikace těchto variant. Alelické varianty genů pro presenilin budou pravděpodobně hybridizovat na popsané sekvence za přísných hybridizačních podmínek, jak jsou zde definovány, zatímco podmínky nízké přísnosti mohou být použity pro identifikaci heterospecifických homologů.

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález izolované nukleové kyseliny, které obsahují subsady sekvencí pro presenilin nebo jejich komplementy. Jak bylo uvedeno výše, takové sekvence mají uplatnění jako proby a PCR primery pro identifikaci a izolaci alelických nebo homologních variant genů pro preseniliny. Subsekvence korespondující k polymorfním regionům presenilinů, jak je popsáno výše, budou také mít uplatnění ve vyšetřované a/nebo genotypizaci jedinců pro diagnostické účely, jak je popsáno dále. Kromě toho, a také jak je popsáno dále, takové subsady budou mít uplatnění pro kodování

- 1) fragmentů presenilinových proteinů pro obsažení ve fúsních proteinech,
- 2) fragmentů, které obsahují funkční domény presenilinových proteinů pro užití ve vazebných studiích,
- 3) fragmentů presenilinových proteinů, které mohou být použity jako imunogeny pro vznik protilátek proti presenilinovým proteinům, a
- 4) fragmenty presenilinů, které mohou účinkovat jako kompetitivní inhibitory nebo jako napodobovači presenilinů pro inhibici nebo napodobení jejich fyziologických funkcí.

Konečně, takové subsady mohou kodovat nebo reprezentovat komplementární nebo antisense sekvence, které mohou hybridizovat na geny pro preseniliny nebo na presenilinové mRNA transkripty za fyziologických podmínek pro inhibici transkripce nebo translace těchto sekvencí. Proto, v závislosti na zamýšleném použití, předkládaný vynález poskytuje subsekvence nukleových kyselin genů pro preseniliny, které mohou mít délku v rozsahu od 8 - 10 nukleotidů (např. pro použití jako PCR primery) do téměř plné velikosti genomové nebo cDNA. Tak předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny obsahující sekvence korespondující alespoň 8 - 10, lépe 15 a nejlépe alespoň 20 sousedícím nukleotidům genů pro preseniliny, jak jsou zde popsány nebo jinak poskytnuty, nebo jejich komplementy. Jak bylo uvedeno výše, nicméně, kratší sekvence mohou být užitečné s jinými technologiemi.

V jiné serii provedení předkládaný vynález poskytuje nukleové kyseliny, ve kterých jsou sekvence kodující presenilin, s nebo bez intronů nebo rekombinantně zpracované jak bylo popsáno výše, operativně připojeny na endogenní nebo exogenní 5' a/nebo 3' regulační regiony. Endogenní regulační regiony hPS1 genu jsou zde popsány a detailně uvedeny. Za použití předkládaného objevu a standartních genetických technik (např. PCR extenze, cíleného "gene walking"), je odborník v oboru nyní také schopen klonování korespondujících 5' a/nebo 3' endogenních regulačních regionů. Obdobně, alelické varianty hPS1 a hPS2 endogenních regulačních regionů, stejně jako endogenní regulační regiony z jiných savčích homologů, jsou podobně poskytnuty bez zbytečného experimentování.

Alternativně, exogení regulační regiony (t.j. regulační regiony z jiných konspecifických genů nebo heterospecifické regulační regiony) mohou být operativně připojeny na sekvence kodující presenilin tak, aby řídily expresi. Vhodné 5' regulační regiony budou zahrnovat promotorové elementy a mohou také zahrnovat další elementy jako je operátorová nebo enhancerová sekvence, ribosomová vazebná sekvence, RNA čepičková sekvence, a podobně. Regulační region může být vybrán ze sekvencí, které kontrolují expresi genů prokaryotických nebo eukaryotických buněk, jejich virů nebo jejich kombinací. Takové regulační regiony obsahují, ale nejsou omezeny na, lac system, trp system, tac system, a trc system; hlavní operátor a promotorové regiony fágu lambda; kontrolní region fd obalového proteinu; časný a pozdní promotor SV40; promotory odvozené od polyomaviru, adenoviru, retroviru, bakuloviru a opičího viru; 3-fosfoglycerát kinasový promotor; promotory kvasinkové kyselý fosfatasy; kvasinkové alfa-rozmnožovací faktory; promotorové elementy jiných eukaryotických genů exprimované v neuronech nebo jiných typech buněk; a jejich kombinace. Zejména mohou být vybrány ty regulační elementy, které jsou indukovatelné nebo reprimovatelné (např. β -galaktosidasový promotor) pro umožnění kontroly a/nebo manipulovatelnosti exprese genů pro presenilin v buňkách transformovaných těmito nukleovými kyselinami. Alternativně mohou být kodující regiony pro presenilin operativně spojeny s regulačními elementy, které umožňují tkáňově specifickou expresi v mnohobuněčném organismu. Takové konstrukty jsou zejména užitečné pro produkci transgeních organismů pro zajištění exprese genů pro presenilin pouze ve vhodných tkáních. Volba vhodných regulačních regionů je v možnostech odborníka a rekombinantní použití mnoha takových regulačních regionů je nyní v oboru zavedeno.

V jiné serii provedení předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny kodující celé nebo části presenilinových proteinů ve formě fúsního proteinu. V těchto provedeních je regulační region nukleové kyseliny (endogenní nebo exogenní) operativně připojen na první kodující region, který je kovalentně navázán v rámečku na druhý kodující region. Druhý kodující region může být volitelně navázán na jeden nebo více dalších kodujících regionů a poslední kodující region je připojen na terminační kodon a, volitelně, na vhodné 3' regulační regiony (např. polyadenylační signály). Sekvence pro presenilin ve fúsním proteinu mohou reprezentovat první, druhý nebo jakýkoliv další kodující region. Sekvence pro presenilin mohou být konzervované nebo nekonzervované domény a mohou být umístěny v kterémkoliv kodujícím regionu fúze. Non-presenilinové sekvence fúze mohou být vybrány podle potřeby a úvahy provádějící osoby a nejsou omezeny předkládaným vynálezem. Užitečné non-presenilinové sekvence, nicméně, zahrnují krátké sekvence "smyček" jako jsou antigenní determinanty nebo poly-His smyčky, které mohou být použity při purifikaci nebo identifikaci vzniklého fúsního proteinu. Alternativně může non-presenilinový kodující region kodovat velký protein nebo proteinový fragment, jako je enzym nebo vazebný protein, který může také asistovat při identifikaci a purifikaci proteinu, nebo může být užitečný v testech jak jsou popsány dále. Jednotlivé předpokládané presenilinové fúsní proteiny zahrnují poly-His a GST (glutathion S-transferasa) fúze, které jsou užitečné při izolaci a purifikaci presenilinů, a kvasinkové dvouhybridové fúze, popsané dále, které jsou užitečné v testech pro identifikaci jiných proteinů, které se váží na nebo interagují s preseniliny.

V jiné serii provedení předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny ve formě rekombinantních DNA konstruktů, ve kterých je markerový nebo reporterový gen (např. β -galaktosidasa, luciferasa) operativně připojen na 5' regulační region genu pro presenilin tak, že exprese markerového genu je pod kontrolou regulačních sekvencí pro presenilin. Za použití regulačních regionů pro presenilin popsanych nebo jinak uvedených v předkládaném vynálezu, včetně regulačních regionů z PS1 a PS2 genů od lidí nebo jiných savčích druhů, je odborník v oboru nyní schopen produkovat takové konstrukty. Jak je podrobněji uvedeno dále, takové izolované nukleové kyseliny mohou být použity pro produkci buněk, buněčných linií nebo transgeních zvířat, které jsou užitečné při identifikaci sloučenin, které mohou, přímo nebo nepřímo, různě ovlivňovat expresi presenilinů.

Konečně, izolované nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu zahrnují jakoukoliv z výše uvedených sekvencí, pokud je obsažena ve vektoru. Vhodné vektory obsahují klonovací vektory a expresní vektory všech typů, včetně plasmidů, fagemidů, kosmidů, episomů a podobně, stejně jako integrační vektory. Tyto vektory mohou také obsahovat různé markerové geny (např. geny pro resistenci nebo citlivost na antibiotika), které jsou užitečné při identifikaci buněk úspěšně transformovaných vektorem. Kromě toho, vektory mohou obsahovat regulační sekvence, na které jsou nukleové kyseliny podle vynálezu operativně připojeny a/nebo mohou také obsahovat kodující regiony tak, že nukleové kyseliny podle vynálezu, pokud jsou vhodně ligovány do vektoru, jsou exprimovány jako fúsní proteiny. Takové vektory mohou také obsahovat vektory pro použití ve kvasinkovém "dvouhybridovém", bakulovirovém a fag-vystaveném systému. Vektory mohou být vybrány tak, aby byly použitelné pro prokaryotní, eukaryotní nebo virovou

expresi, jak je nutné nebo potřebné pro jednotlivé aplikace. Například, vektor viru vakcinie nebo vektor opičího viru s SV40 promotorem (např. pSV2), nebo Herpes simplex virus nebo adenoasociovaný virus mohou být užitečné pro transfekci savčích buněk včetně neuronů v kultuře in vivo, a bakulovirový vektor může být použit při transfekci hmyzích buněk (např. motýlých buněk). Velký počet různých vektorů je nyní komerčně dostupný a jinak v oboru známý, a volba vhodného vektoru je na schopnostech a rozvaze odborníka.

2. V podstatě čisté proteiny

Předkládaný vynález poskytuje v podstatě čisté přípravky presenilinových proteinů, fragmentů presenilinových proteinů a fúsních proteinů obsahujících preseniliny nebo jejich fragmenty. Proteiny, fragmenty a fúse mají význam, jak je zde popsáno, při generování protilátek k normálním nebo mutantním presenilinům, v identifikaci vazebných proteinů pro preseniliny, a v diagnostických a terapeutických metodách. Proto, v závislosti na zamýšleném použití, poskytuje předkládaný vynález v podstatě čisté proteiny nebo peptidy obsahující aminokyselinové sekvence, které jsou podsekvencemi kompletních presenilinových proteinů a které mohou mít délku v rozsahu 4 - 10 aminokyselin (např. pro použití jako imunogeny), nebo 10 - 100 aminokyselin (např. pro použití v testech vazby), kompletních presenilinových proteinů. Tak poskytuje předkládaný vynález v podstatě čisté proteiny nebo peptidy obsahující sekvence korespondující alespoň 4 - 5, lépe 6 - 10 a nejlépe alespoň 50 nebo 100 následujícím aminokyselinám presenilinových proteinů, jak jsou zde popsány nebo jinak uvedeny.

Proteiny nebo peptidy podle předkládaného vynálezu mohou být izolovány a purifikovány jakoukoliv z mnoha metod vybraných na základě vlastností vykazovaných jejich proteinovými sekvencemi. Jelikož mají preseniliny vlastnosti integrálních nebo membránu překlenujících proteinů, může být membránová frakce buněk, ve kterých je presenilin normálně vysoce expřívován (např. neuronů, oligodendroglíí, svalů, slinivky) izolována a proteiny mohou být extrahovány, například, solubilizací detergentem. Alternativně může být presenilinový protein, fúsní protein nebo jeho fragment purifikován z buněk transformovaných nebo transfektovaných expresními vektory (např. bakulovirovým systémem jako jsou pPbac a pMbac vektory (Stratagene, La Jolla, CA); kvasinkovými expresními systémy jako je pYESHIS Xpress vektor (Invitrogen, San Diego, CA); eukaryotickými expresními systémy jako je pCDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), který má konstantní konstitutivní expresi, nebo LacSwitch (Stratagene, La Jolla, CA), který je indukovatelný; nebo prokaryotními expresními vektory jako je pKK233-3 (Clontech, Palo Alto, CA). Za té situace, že protein nebo fragmenty integrují do endoplasmatického retikula nebo plasmatické membrány rekombinantních buněk (např. imortalizovaných lidských buněčných linií nebo jiných eukaryotických buněk), může být protein purifikován z membránové frakce. Alternativně, pokud není protein správně lokalizován nebo agreguje v inklusních tělískách v rekombinantních buňkách (např. prokaryotických buňkách), pak může být protein purifikován z kompletního lysátu buněk nebo ze solubilizovaných inklusních tělísek.

Purifikace může být provedena za použití standartních technik purifikace proteinů včetně, ale nejenom, gelové filtrační chromatografie, iontové výměnné chromatografie, vysoce účinné

kapalinové chromatografie (RP-HPLC, iontová výměnná HPLC, HPLC s vylučováním podle velikosti, vysoce účinná chromatofokusační chromatografie, hydrofobní interakční chromatografie, imunoprecipitace nebo imunoafinitní purifikace. Gelová elektroforesa (např. PAGE, SDS-PAGE) může být také použita pro izolování proteinů nebo peptidů na základě jejich molekulové hmotnosti, charakteru náboje a hydrofobicity.

Presenilinový protein, nebo jeho fragment může být také konvenčně purifikován vytvořením fúsního proteinu obsahujícího požadovanou presenilinovou sekvenci fúsovanou na jiný peptid jako je antigenní determinanta nebo poly-His smyčka (např. QIAexpress vektory, QIAGEN Corp. Chatsworth, CA), nebo větší protein (např. GST využívající pGEX-27 vektor (Amrad, USA) nebo zelený fluorescentní protein využívající Green Lantern vektor (Gibco/BRL. Gaithersburg, MD). Fúsní protein může být exprimován a získán z prokaryotických nebo eukaryotických buněk a může být purifikován za použití jakékoliv standartní metody založené na sekvenci fúsního vektoru. Například, fúsní protein může být purifikován imunoafinitně nebo imunoprecipitačně s protilátkou k non-presenilinové části fúse nebo, v případě poly-His smyčky, afinitní vazbou na niklovou kolonu. Požadovaný presenilinový protein nebo fragment může pak být dále purifikován z fúsního proteinu enzymatickým štěpením fúsního proteinu. Metody pro přípravu a použití takových fúsních konstruktů pro purifikaci proteinů jsou v oboru dobře známé a někoik kitů pro tento účel je nyní komerčně dostupných. Ve světle předkládaného vynálezu je nyní umožněno použití takových fúsních konstruktů s preseniliny.

3. Protilátky k presenilinům

Předkládaný vynález tako poskytuje protilátky a metody pro výrobu protilátek, které se selektivně vážou na presenilinové proteiny nebo jejich fragmenty. Zejména, identifikováním funkčních domén presenilinů a polymorfních regionů asociovaných s AD poskytuje předkládaný vynález protilátky, a metody pro výrobu protilátek, které se budou selektivně vázat na a, proto, identifikovat a/nebo rozlišovat normální a mutantní (t.j. patogení) formy presenilinových proteinů. Protilátky podle vynálezu mají použití jako laboratorní reagens pro, inter alia, imunoafinitní purifikaci presenilinů, Western blotting pro identifikaci buněk nebo tkání exprimujících preseniliny a imunocytochemické nebo imunofluorescenční techniky pro stanovení subcelulární lokalizace proteinu. Kromě toho, jak je popsáno dále, protilátky podle vynálezu mohou být použity jako diagnostické nástroje pro identifikaci nosičů presenilinových alel spojených s AD nebo jako terapeutický nástroj pro selektivní vazbu a inhibici patogeních forem presenilinových proteinů in vivo.

Protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být generovány za použití celých presenilinových proteinů podle vynálezu nebo za použití jakéhokoliv presenilinového epitopu, který je charakteristický pro tento protein a který je významně odlišný od ostatních hostitelských proteinů. Takové epitopy mohou být identifikovány, například, srovnáním sekvence 4 - 10 aminokyselinových zbytků ze sekvence pro presenilin s počítačovou databází proteinových sekvencí od relevantního hostitele. Preferovaně jsou epitopy vybrány z N- a C- konců, nebo ze smyčkových domén, které spojují transmembránové domény proteinů. Konkrétně, předpokládá se, že protilátky k polymorfnímu N-terminálnímu regionu, TM1->2 smyčce nebo TM6->7 smyčce mají

největší využití jak v diagnostice, tak v terapii. Na druhou stranu, protilátky proti vysoce konzervovaným doménám by měly mít největší význam pro purifikaci nebo identifikaci presenilinů.

Za použití IBM Pustell programu byly identifikovány umístění aminokyselinových zbytků jako potenciální antigení místa v hPS1 proteinu a mohou být užitečné při generování protilátek podle vynálezu. Tyto pozice, korespondující pozicím v SEQ ID NO: 2, jsou uvedeny v tabulce 6.

Jiné metody vybrání antigeních determinant jsou, samozřejmě, v oboru známy a mohou být využity. Kromě toho mohou být využity větší fragmenty (např. 8 - 20 nebo, preferovaně, 9 - 15 zbytků) obsahující některé z těchto epitopů. Například, fragment obsahující 109 - 112 epitopů může obsahovat zbytky 107 - 114, nebo 105 - 116. Také větší fragmenty, obsahující například celé funkční domény nebo mnohotné funkční domény (např. TM1, TM1->2, a TM2 nebo TM6, TM6->7 a TM7) mohou být také preferovány. Pro jiné presenilinové proteiny (např. pro mPS1 nebo pro jiné non-lidské homology, nebo pro PS2) mohou být vybrána homologní místa.

Za použití stejného IBM Pustell programu byly identifikovány umístění aminokyselinových zbytků jako potenciální antigení místa v hPS2 proteinu a mohou být užitečné při generování protilátek podle vynálezu. Tyto pozice, korespondující pozicím v SEQ ID NO: 19, jsou uvedeny v tabulce 7.

Jako pro PS1, jiné metody vybrání antigeních determinant jsou, samozřejmě, v oboru známy a mohou být využity. Kromě toho mohou být využity větší fragmenty (např. 8 - 20 nebo, preferovaně, 9 - 15 zbytků) obsahující některé z těchto epitopů. Například,

fragment obsahující 310 - 314 epitopů může obsahovat zbytky 308 - 316, nebo 307 - 317. Také větší fragmenty, obsahující například celé funkční domény nebo mnohotné funkční domény (např. TM1, TM1->2, a TM2 nebo TM6, TM6->7 a TM7) mohou být také preferovány. Pro jiné presenilinové proteiny (např. pro mPS1 nebo pro jiné non-lidské homology, nebo pro PS1) mohou být vybrána homologní místa.

Presenilinové imunogení přípravky mohou být produkovány ze surových extraktů (např. membránové frakce buněk vysoce exprivujících protein), z proteinů nebo peptidů významně purifikovaných z buněk, které je rekombinantně nebo přirozeně exprivují nebo, pro krátké imunogeny, chemickou syntesou peptidů. Presenilinové imunogeny mohou také být ve formě fúsních proteinů, ve kterých je non-presenilinový region vybrán pro své adjuvantní vlastnosti. Jak je zde použito, presenilinový imunogen by měl být definován jako přípravek obsahující peptid obsahující alespoň 4 -8, a lépe alespoň 9 - 15 následujících aminokyselinových zbytků presenilinových proteinů, jak jsou zde popsány nebo jinak uvedeny. Sekvence o méně zbytcích mohou, samozřejmě, také být užitečné v závislosti na zamýšleném použití a budoucím vývoji techniky. Proto, jakékoliv od presenilinů odvozené sekvence, které jsou použity pro generování protilátek k presenilinům by měly být považovány za presenilinové imunogeny.

Protilátky podle vynálezu mohou být polyklonální nebo monoklonální, nebo to mohou být fragmenty protilátek, včetně Fab fragmentů, $F(ab')_2$ a jednořetězcových fragmentů protilátek. Kromě toho, po identifikaci užitečných protilátek metodou podle vynálezu, mohou být generovány rekombinantní protilátky, včetně jakýchkoliv fragmentů protilátky uvedených výše, stejně jako

humanizované protilátky na základě non-lidských protilátek k presenilinovým proteinům. Ve světle předkládaných objevů presenilinových proteinů, stejně jako charakterizování jiných presenilinů jak je zde uvedeno, může odborník v oboru produkovat výše uvedené protilátky jakýmkoliv z mnoha standartních prostředků v oboru dobře známých. Pro přehled protilátkových technik, viz. *Antibody Engineering: A Practical Guide*, Borrebaek, ed., W.H. Freeman and Company, NY (1992), nebo *Antibody Engineering*, 2. vyd., Borrebaek, ed., Oxford University Press, Oxford (1995).

Obecně, polyklonální protilátky mohou být generovány nejprve imunizací myší, králíků, koz nebo jiných vhodných zvířat presenilinovým imunogenem ve vhodném nosiči. Pro zvýšení imunogenicity přípravku může být imunogen připojen na proteinový nosič nebo může být smísen s adjuvans (např. Freundovým adjuvans). Dosycovací injekce, ačkoliv nejsou nezbytné, jsou doporučovány. Po vhodné době pro umožnění vývoje protilátkové odpovědi, preferovaně po několika týdnech, může být zvířatům odebrána krev a sérum může být purifikováno pro izolování imunoglobulinových složek.

Podobně, obecně, anti-presenilinové monoklonální protilátky mohou být produkovány nejprve injikováním myší, králíků, koz nebo jiných vhodných zvířat presenilinovým imunogenem ve vhodném nosiči. Stejně jako výše může být použit proteinový nosič nebo adjuvans a dosycovací injekce (např. dva- nebo třikrát týdně během 8 až 10 týdnů) jsou doporučovány. Po umožnění vývoje protilátkové odpovědi jsou zvířata usmrcena a jejich sleziny jsou odstraněny a resuspendovány v, například, fosfátem pufovaném salinickém roztoku (PBS). Buňky sleziny slouží jako zdroj

lymfocytů, z nichž některé produkují protilátky vhodné specificity. Tyto buňky jsou potom fúsovány s imortalizovanou buněčnou linií (např. myelomovou) a produkty fúze jsou umístěny do mnoha tkáňových kultivačních jamek za přítomnosti selektivního agens jako je HAT. Jamky jsou potom seriově vyšetřovány a znovu umístěny na plotny, kdy se pokaždé selektují buňky vytvářející požadovanou protilátku. Typicky je provedeno několik vyšetření a opětovných umístění, dokud více než 90% jamek neobsahuje jeden klon, který je pozitivní na produkci protilátek. Monoklonální protilátky produkované takovými klony mohou být purifikovány standartními metodami jako je afinitní chromatografie za použití Protein A sepharosy, iontovou výměnnou chromatografií nebo variacemi a kombinacemi těchto technik.

Protilátky podle vynálezu mohou být značeny nebo konjugovány s jinými sloučeninami nebo materiály pro diagnostické a/nebo terapeutické použití. Například, mohou být navázány na radionuklidy, fluorescentní sloučeniny nebo enzymy pro zobrazení nebo terapii, nebo na liposomy pro zacílení sloučenin obsažených v liposomech na specifickou tkáň.

4. Transformované buněčné linie

Předkládaný vynález také poskytuje buňky nebo buněčné linie, jak prokaryotické, tak eukaryotické, které byly transformovány nukleovými kyselinami podle předkládaného vynálezu, což způsobilo klonální propagaci těchto nukleových kyselin a/nebo expresi proteinů nebo peptidů jimi kodovaných. Tak buňky nebo buněčné linie budou mít využití nejen v propagaci a produkci nukleových kyselin a proteinů podle předkládaného vynálezu, ale také, jak je popsáno dále, jako modelové systémy pro diagnostické a

terapeutické testy. Jak je zde použito, termín "transformované buňky" je míněn tak, aby zahrnoval jakoukoliv buňku, nebo potomstvo jakékoliv buňky, do které byla zavedena jakákoliv nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu, buď transformací, transfekcí, infekcí nebo jinými prostředky. Metody pro produkci vhodných vektorů, transformování buněk těmito vektory a identifikování transformantů jsou dobře známé v oboru a jsou zde pouze stručně uvedeny (viz např. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Prokaryotické buňky použitelné pro produkci transformovaných buněk podle vynálezu zahrnují členy bakteriálních rodů *Escherichia* (např. *E. coli*), *Pseudomonas* (např. *P. aeruginosa*), a *Bacillus* (např. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*), stejně jako mnoho jiných a často v oboru používaných. Prokaryotické buňky jsou zejména užitečné pro produkci velkého množství proteinů a peptidů podle vynálezu (např. normálních nebo mutantních presenilinů, fragmentů presenilinů, fúsních proteinů presenilinů). Bakteriální buňky (např. *E. coli*) mohou být použity v mnoha expresních vektorových systémech včetně, např. plasmidů s T7 RNA polymerasa/promotor systémem, bakterifág lambda regulačními sekvencemi, nebo M13 fág mGPI-2. Bakteriální hostitelé mohou také být transformovány fúsními proteinovými vektory, které tvoří, například, lacZ, trpE, maltosa-vazebný protein, poly-His smyčky, nebo glutathion-S-transferasa fúsní proteiny. Všechny z těchto, stejně jako mnoho jiných prokaryotních expresních systémů, je dobře známo v oboru a je běžně komerčně dostupných (např. pGEX-27 (Amrad, USA) pro GST fúse).

Eukaryotní buňky a buněčné linie použitelné pro produkci transformovaných buněk podle vynálezu zahrnují savčí buňky a buněčné linie (např. PC12, COS, CHO, fibroblasty, myelomové buňky, neuroblastomy, hybridomy, buňky lidské embryonální ledviny 293, oocyty, embryonální kmenové buňky), hmyzí buněčné linie (např. za použití bakulovirového vektoru jako je pPbac nebo pMbac (Stratagene, La Jolla, CA)), kvasinky (za použití kvasinkového expresního vektoru jako je pYESHIS (Invitrogen, CA)), a houby. Eukaryotní buňky jsou zejména užitečné pro provedení, ve kterých je nezbytné, aby presenilinové proteiny, nebo jejich funkční fragmenty, prováděli funkci a/nebo podléhaly intracelulárním interakcím asociovaným s buď normálními, nebo mutantními proteiny. Tak, například, transformované eukaryotické buňky jsou preferovány pro použití jako modely funkce nebo interakcí presenilinů a testy na vyšetřování kandidátů terapeutik preferovaně využívají transformovaných eukaryotických buněk.

Pro provedení exprese v eukaryotických buňkách může být vyvinuta řada vektorů a jsou komerčně dostupné, které umožňují indukovatelnou (např. LacSwitch expresní vektory, Stratagene, La Jolla, CA) nebo příbuznou (např. pcDNA3 vektory, Invitrogen, Chatsworth, CA) expresi presenilinových nukleotidových sekvencí pod regulací arteficiálního promotorového elementu. Takové promotorové elementy jsou často odvozeny od CMV nebo SV40 virových genů, ačkoliv jiné silné promotorové elementy, které jsou aktivní v eukaryotických buňkách mohou být také použity pro indukci transkripce presenilinových nukleotidových sekvencí. Typicky tyto vektory také obsahují arteficiální polyadenylační sekvence a 3' UTR, které mohou být také odvozeny od exogeních virových genových sekvencí nebo od jiných eukaryotických genů. Dále, v některých konstruktech jsou také ve vektoru obsaženy

arteficiální, nekodující, sestřihovatelné introny a exony pro posílení exprese požadované nukleotidové sekvence (v tomto případě sekvencí pro preseniliny). Tyto expresní systémy jsou běžně dostupné z komerčních zdrojů a jsou typizovány vektory jako je pcDNA3 a pZeoSV (Invitrogen, San Diego, CA). Oba poslední vektory byly úspěšně použity pro způsobení exprese presenilinových proteinů v transfektovaných COS, CHO a PC12 buňkách (Levesque et al, 1996). Nespočet komerčně dostupných stejně jako na zakázku projektovaných vektorů je dostupno z komerčních zdrojů pro umožnění exprese jakéhokoliv požadovaného presenilinového transkriptu ve více méně jakémkoliv typu buněk, buď konstitutivně, nebo po vystavení jistým exogením stimulům (např. odstranění tetracyklinu nebo expozice IPTG).

Vektory mohou být zavedeny do buněk příjemce nebo do "hostitelských" buněk různými metodami dobře v oboru známými včetně, ale nejenom, transfekce fosforečnanem vápenatým, transfekce fosforečnanem stroncia, DEAE dextranové transfekce, elektroporace, lipofekce (např. Dosper Liposomal transfekční reagens, Boehringer Mannheim, Germany), mikroinjekce, balistická inserce na mikrokorálky, protoplastová fúze nebo, pro virové nebo fágové vektory, infekce rekombinantním virem nebo fágem.

5. Modely transgeních zvířat

Předkládaný vynález také poskytuje produkci transgeních non-lidských zvířecích modelů pro studium Alzheimerovy choroby, pro vyšetřování kandidátů farmaceutických sloučenin, pro vytvoření explantovaných savčích CNS buněčných kultur (např. neuronálních, gliálních, organotypických nebo smíšených buněčných kultur), ve kterých je mutantní nebo divoký typ presenilinových

sekvencí exprimován nebo ve kterých byly geny pro presenilin inaktivovány (např. "knock-out" delece), a pro hodnocení potenciálních terapeutických intervencí. Před předkládaným vynálezem existoval částečný zvířecí model pro Alzheimerovu chorobu prostřednictvím inserce a nadměrné exprese mutantní formy lidského genu pro proteinový prekursor amyloidu jako minigenu pod regulací promotorového elementu receptoru pro destičkový růstový faktor β (Games et al., 1995). Tento mutant (β APP₇₁₇ Val $\rightarrow$ Ile) způsobuje objevení synaptické patologie a deposit amyloidového β peptidu v mozku transgeních zvířat nesoucích tento transgen ve velkém množství kopií. Tyto změny v mozku transgeních zvířat jsou velmi podobné těm, které jsou pozorovány pro lidskou AD (Games et al., 1995). Je, nicméně, stále nejasné, zda se tato zvířata stanou dementními, ale existuje obecný konsensus, že je nyní možné vytvořit alespoň některé aspekty AD u myší.

Zvířecí druhy, které jsou vhodné pro použití ve zvířecích modelech podle předkládaného vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na, krysy, myši, křečky, morčata, králíky, psi, kočky, kozy, ovce, prasata, a non-lidské primáty (např. opice Rhesus, šimpanze). Pro použití v počátečních studiích jsou preferováni transgení hlodavci (např. myši) vzhledem k relativní snadnosti chovu a krátkému životu. Kromě toho, jak bylo uvedeno výše, transgení kvasinky nebo bezobratlý (např. hlísti, hmyz) mohou být preferováni pro některé studie, protože umožňují ještě rychlejší a levnější vyšetřování. Transgení non-lidští primáti mohou být nicméně preferováni pro dlouhodobější studie vzhledem k jejich větší podobnosti k lidem a jejich vyšším kognitivním schopnostem.

Za použití nukleových kyselin popsaných nebo jinak uvedených v tomto vynálezu existuje několik dostupných přístupů pro vytvoření

transgeních zvířecích modelů pro Alzheimerovu chorobu. Tak poskytnuté zvířecí modely zahrnují:

1) Zvířata, u kterých byl rekombinantně zaveden normální lidský gen pro presenilin do genomu jako další gen, pod regulací buď exogeních, nebo endogeních promotorových elementů, a buď jako minigen, nebo jako větší genomový fragment; u kterých byl normální lidský gen pro presenilin rekombinantně substituován za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu; a/nebo u kterých byla jedna nebo obě kopie zvířecích homologních genů pro presenilin rekombinantně "humanizována" částečnou substitucí sekvencí kodujících lidský homolog homologní rekombinací nebo zaměřením genu. Tato zvířata jsou užitečná pro hodnocení účinku transgeních postupů a účinků zavedení nebo substituce lidských nebo humanizovaných genů pro presenilin.

2) Zvířata, u kterých byl rekombinantně zaveden mutantní (t.j. patogení) lidský gen pro presenilin do genomu jako další gen, pod regulací buď exogeních, nebo endogeních promotorových elementů, a buď jako minigen, nebo jako větší genomový fragment; u kterých byl mutantní lidský gen pro presenilin rekombinantně substituován za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu; a/nebo u kterých byla jedna nebo obě kopie zvířecích homologních genů pro presenilin rekombinantně "humanizována" částečnou substitucí sekvencí kodujících mutantní lidský homolog homologní rekombinací nebo zaměřením genu. Tato zvířata jsou užitečná jako modely, které budou ukazovat některé nebo všechny charakteristiky, na biochemické, fyziologické úrovni nebo na úrovni chování, lidí nesoucích jednu nebo více alel, které jsou patogení pro Alzheimerovu chorobu nebo jiná onemocnění asociovaná s geny pro

presenilin.

3) Zvířata, u kterých byla rekombinantně zavedena mutantní verze jednoho ze zvířecích genů pro presenilin (nesoucí, například, specifickou mutaci korespondující, nebo podobnou, jedné z patogeních mutací lidských presenilinů) do genomu jako další gen, pod regulací buď exogeních, nebo endogeních promotorových elementů, a buď jako minigen, nebo jako větší genomový fragment; a/nebo u kterých byla mutantní verze jednoho ze zvířecích genů pro presenilin (např. nesoucí specifickou mutaci korespondující, nebo podobnou, jedné z patogeních mutací lidských presenilinů) rekombinantně substituována za jednu nebo obě kopie zvířecího homologního genu pro presenilin homologní rekombinací nebo zaměřením genu. Tato zvířata jsou užitečná jako také modely, které budou ukazovat některé nebo všechny charakteristiky, na biochemické, fyziologické úrovni nebo na úrovni chování, lidí nesoucích jednu nebo více alel, které jsou patogení pro Alzheimerovu chorobu nebo jiná onemocnění asociovaná s geny pro presenilin.

4) "Knock-out" zvířata, u kterých byla jedna nebo obě kopie genu pro zvířecí presenilin parciálně nebo kompletně deletována homologní rekombinací nebo zaměřením genu, nebo byla inaktivována insercí nebo substitucí exogení sekvence homologní rekombinací nebo zaměřením genu exogení sekvence (např. stop kodonů, lox p míst). Taková zvířata jsou použitelná jako modely pro studium účinků, které může mít ztráta exprese genu pro presenilin, pro hodnocení toho, zda ztráta funkce je preferovatelná pro pokračování exprese mutantních forem a pro vyšetření toho, zda mohou být vyvolány jiné geny pro nahrazení mutantních presenilinů (např. substituce PS1 PS2) nebo pro

intervenci s účinky jiných genů (např. APP nebo ApoE) způsobujících AD pro léčbu AD a jiných chorob. Například, normální gen pro presenilin může být nezbytný pro účinek mutantních APP genů pro jejich aktuální vyjádření jako AD a, proto, transgení presenilinové zvířecí modely mohou být užitečné v hodnocení takových mnohogenových interakcí.

Pro vytvoření zvířecího modelu (např. transgení myši) může být normální nebo mutantní gen pro presenilin (např. normální nebo mutantní hPS1, mPS1, hPS2, mPS2 atd.), nebo normální nebo mutantní verze rekombinantní nukleové kyseliny kodující alespoň funkční doménu presenilinu (například rekombinantní konstrukt obsahující mPS1 sekvenci, do které byla substituována nukleotidová sekvence korespondující lidské mutantní sekvenci) insertována do buněk zárodečné linie nebo do kmenových buněk za použití standartních technik mikroinjekce do oocyty, nebo transfekce nebo mikroinjekce do embryonálních kmenových buněk. Zvířata produkovaná těmito nebo podobnými procesy jsou označována jako transgení. Podobně, pokud je požadováno inaktivovat nebo nahradit endogéní gen pro presenilin, může být použita homologní rekombinace za použití embryonálních kmenových buněk. Zvířata produkovaná těmito nebo podobnými procesy jsou označována jako "knock-out" (inaktivovace) nebo "knock-in" (nahrazení) modely.

Pro injikování do oocyty může být jedna nebo více kopií rekombinantních DNA konstruktů podle předkládaného vynálezu insertována do pronukleu právě fertilizovaného oocyty. Tento oocyt je potom reimplantován do pseudo-těhotné náhradní matky. Živě narozená zvířata jsou vyšetřována na integranty za použití analýzy DNA (např. z ocasních žil myšího potomstva) na přítomnost insertovaných rekombinantních transgeních sekvencí. Transgeny

mohou být buď kompletní genomové sekvence injikované jako YAC, BAC, PAC nebo jiné chromosomální DNA fragmenty, cDNA s buď přirozeným promotorem nebo s heterologním promotorem, nebo minigen obsahující všechny kodující regiony nebo jiné elementy, které jsou nezbytné pro optimální expresi.

Retrovirová infekce časných embryí může být také provedena pro inserci rekombinantních DNA konstruktů podle vynálezu. V této metodě je transgen (např. normální nebo mutantní hPS1 nebo PS2 sekvence) insertován do retrovirového vektoru, který je použit pro infikování embryí (např. myších nebo embryí non-lidských primátů) přímo během ranných stadií vývoje za generování chimér, z nichž některé povedou k transmisi zárodečné linie.

Homologní rekombinace za použití kmenových buněk umožňuje vyšetřování buněk s přeneseným genem pro identifikaci vzácných homologních rekombinací. Pokud jsou identifikovány, mohou být použity pro generování chimér za pomoci injikování blastocyst a část vzniklých zvířat bude vykazovat transmisi zárodečné linie z rekombinantní linie. Tato metoda je zejména užitečná, pokud je požadována inaktivace genu pro presenilin. Například, inaktivace mPS1 genu u myši může být provedena projektováním DNA fragmentu, který obsahuje sekvence z mPS1 exonu spolu se selektovatelným markerem. Homologní rekombinace vede k inserci markerové sekvence do prostředku exonu, což způsobí inaktivaci mPS1 genu a/nebo delecii vnitřních sekvencí. DNA analýza jednotlivých klonů může potom být použita pro rozpoznání homologní rekombinace.

Techniky pro generování transgeních zvířat, stejně jako techniky pro homologní rekombinaci nebo pro zaměření genu, jsou široce akceptovány a prováděny. Je dostupný laboratorní manuál

pro manipulaci s myšími embryi, například, který podrobně popisuje standartní laboratorní techniky pro produkci transgeních myší (Hogan et al., 1986). Pro vytvoření transgenu je požadovaná cílová sekvence (např. mutantní nebo přirozená sekvence pro presenilin) typicky ligována do klonovacího místa umístěného downstream od nějakého promotorového elementu, kterým bude regulovat expresi RNA ze sekvence pro presenilin. Downstream od sekvence pro presenilin je typicky arteficiální polyadenylační sekvence. V transgeních modelech, které byly použity pro úspěšné vytvoření zvířat, která napodobují aspekty dědičných lidských neurodegenerativních onemocnění, byly nejúspěšnější promotorové elementy promotor genu pro β podjednotku receptoru pro destičkový růstový faktor a křeččí promotor genu pro prionový protein, ačkoli jiné promotorové elementy, které řídí expresi v buňkách centrálního nervového systému mohou být také užitečné. Alternativním přístupem pro vytvoření transgenu je použití endogeního presenilinového promotoru a regulačních sekvencí pro řízení exprese presenilinového transgenu. Konečně, je možné vytvořit transgen za použití velkých genomových DNA fragmentů jako jsou YAC, které obsahují celý gen pro presenilin stejně jako jeho vhodné regulační sekvence. Takové konstrukty byly úspěšně použity pro řízení lidské APP exprese v transgeních myších (Lamb et al., 1993).

Zvířecí modely mohou být také vytvořeny zaměřením endogeního genu pro presenilin tak, aby se alterovala endogení sekvence pro presenilin homologní rekombinací. Toto zacílení může mít za následek odstranění endogení sekvence (knock-out) nebo pozměnění endogení sekvence za vytvoření aminokyselinové změny asociované s lidským onemocněním nebo jinak abnormální sekvence (např. sekvence, která je více podobná lidské sekvenci než původní

zvířecí sekvenční) (knock-in zvířecí modely). Je dostupné velké množství vektorů pro provedení tohoto a také jsou dostupné vhodné zdroje genomové DNA pro yší a jiné zvířecí genomy, které může být zaměřena, od společností jako je Genome Systems Inc. (St. Louis, Missouri, USA). Typickou vlastností těchto zaměřovacích vektorových konstruktů je to, že 2 až 4 kb genomové DNA je ligováno 5' na selektovatelný marker (např. bakteriální gen pro resistenci na neomycin pod kontrolou jeho vlastního promotorového elementu nazývaného "neomycinová kazeta"). Druhý DNA fragment z požadovaného genu je potom ligován downstream od neomycinové kazety, ale upstream od druhého selektovatelného markeru (např. thymidin kinasy). DNA fragmenty jsou vybrány tak, že mutantní sekvenční mohou být zavedeny do zárodečné linie zaměřeného zvířete homologním nahrazením endogenních sekvencí jednou ze sekvencí obsažených ve vektoru. Alternativně, sekvenční může být vybrána tak, aby způsobila delecí sekvenční, které je normálně umístěna mezi levým a pravým raménem vektoru obklopujícím neomycinovou kazetu. První je známý jako knock in, druhý je známý jako knock-out. Opět, nespočet modelových systémů bylo vytvořeno, zejména pro zaměření knock-outů genů obsahujících ty, které jsou relevantní k neurodegenerativním onemocněním (např. zaměření delecí myšího APP genu zhengem et al., 1995; zaměření delecí myšího prionového genu asociovaného s degenerací CNS u lidí s nástupem v dospělosti, které provedl Bueler et al., 1996).

Konečně, ekvivalenty transgenických zvířat, včetně zvířat s mutovanými nebo inaktivovanými geny pro presenilin, mohou být produkovány za použití chemiké nebo rentgenové mutagenese gamet, následované oplodněním. Za použití izolovaných nukleových kyselin, které jsou zde popsány nebo jinak dány, může odborník v oboru rychle vyšetřit vzniklé potomstvo pomocí, například,

přímého sekvencování, RFLP, PCR, nebo hybridizační analýzy pro detekování mutantů, nebo Southern blottingu pro demonstrování ztráty jedné alely dávkou.

6. Testy pro léčiva, která ovlivňují expresi presenilinů

V jiné serii provedení předkládaný vynález poskytuje testy pro identifikaci malých molekul nebo jiných sloučenin, které jsou schopné indukce nebo inhibice exprese presenilinových genů nebo proteinů (např. PS1 nebo PS2). Testy mohou být provedeny in vitro za použití netransformovaných buněk, imortalizovaných buněčných linií nebo rekombinantních buněčných linií, nebo in vivo za použití transgeních zvířecích modelů, které jsou zde dány.

Konkrétně, testy mohou detekovat přítomnost zvýšené nebo snížené exprese PS1, PS2 nebo jiných s preseniliny spojených genů nebo proteinů na základě zvýšené nebo snížené exprese mRNA (za použití, např., prob nukleových kyselin, které jsou zde popsány), zvýšené nebo snížené hladiny PS1, PS2 nebo jiných s preseniliny příbuzných proteinových produktů (za použití, např., antipresenilinových protilátek, které jsou zde popsány), nebo zvýšené nebo snížené exprese markerového genu (např. β galatosidasy nebo luciferasy) operativně připojeného k presenilin 5' regulačnímu regionu v rekombinantním konstruktu.

Tak, například, je možné kultivovat buňky, o kterých je známo, že exprivují určitý presenilin a přidat do kultivačního media jednu nebo více testovaných sloučenin. Po ponechání dostatečně dlouhé doby (např. 0 - 72 hodin) pro to, aby mohla sloučenina indukovat nebo inhibovat expresi presenilinů může být jakákoliv změna v expresi od stanovené základní hladiny detekována za

použití jakékoliv techniky popsané výše a v oboru známé. V jednotlivých preferovaných provedeních jsou buňky z imortalizované buněčné linie jako je lidská neuroblastomová, glioblastomová nebo hybridomní buněčná linie. Za použití prob nukleových kyselin a/nebo protilátek popsaných v tomto vynálezu je detekce změn v expresi presenilinů, a tak identifikace sloučenin, které indukují nebo reprivují expresi presenilinů, pouze rutinním experimentováním.

V jednotlivých preferovaných provedeních je využit rekombinantní test, ve kterém je reporterový gen jako β -galaktosidasa, zelený fluorescentní protein, alkalická fosfatasa nebo luciferasa operativně připojen na 5' regulační regiony genu pro presenilin. Preferované vektory zahrnují Green Lantern 1 vektor (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) a Great AScAPE pSEAP vektor (Clontech, Palo Alto). hPS1 regulační regiony zde popsané, nebo jiné presenilinové regulační regiony, mohou být snadno izolovány a klonovány odborníkem ve světle předkládaných objevů kodujících regionů těchto genů. Reporterový gen a regulační regiony jsou připojeny v rámečku (nebo v jednom ze třech možných čtecích rámečků) tak, že transkripce a translace reporterového genu může proběhnout pod kontrolou regulačních elementů pro presenilin. Rekombinantní konstrukt může potom být zaveden do jakéhokoliv vhodného typu buněk, ačkoliv savčí buňky jsou preferovány, a lidské buňky jsou nejvíce preferovány. Transformované buňky mohou být kultivovány v kultuře a, po stanovení základní hladiny exprese reporterového genu, může být testovaná sloučenina přidána do media. Snadná detekce exprese reporterového genu poskytuje rychlý, vysoce dokonalý test pro identifikaci induktorů a represorů genu pro presenilin.

Sloučeniny identifikované touto metodou budou mít potenciální použití při modifikaci exprese PS1, PS2 nebo jiných s preseniliny spojených genů in vivo. Tyto sloučeniny mohou být dále testovány na zvířecích modelech zde popsaných pro identifikaci těch sloučenin, které mají nejsilnější in vivo účinek. Kromě toho, jak je zde popsáno s ohledem na malé molekuly maící vazebnou aktivitu pro preseniliny, mohou tyto molekuly sloužit jako "úvodní sloučeniny" pro další vývoj farmaceutických sloučenin, například, podrobením těchto sloučenin sekvenčním modifikacím, molekulárnímu modelování a jiným běžným postupům využívaným při racionálním vývoji léčiv.

7. Identifikace sloučenin s vazebnou kapacitou pro presenilin

Ve světle předkládaných objevů bude odborník v oboru schopen provádět nové vyšetřovací metody pro identifikaci proteinů a jiných sloučenin, které se váží na, nebo jinak interagují s, preseniliny. Proteiny a sloučeniny budou zahrnovat endogenní buněčné složky, které interagují s preseniliny in vivo a které, proto, poskytují nové cíle pro farmaceutické a terapeutické intervence, stejně jako budou zahrnovat rekombinantní, syntetické a jiné exogenní sloučeniny, které mohou mít vazebnou kapacitu pro presenilin a, proto, mohou být kandidáty na farmaceutická agens. Tak, v jedné serii provedení, buněčné lysáty nebo tkáňové homogenizáty (např. homogenizát lidského mozku, lysát lymfocytů) může být vyšetřován na proteiny nebo jiné sloučeniny, které se váží na normální nebo na mutantní presenilin. Alternativně, jakákoliv z mnoha exogenních sloučenin, přirozeně se vyskytující a/nebo syntetická (např. knihovny malých molekul nebo peptidů) může být vyšetřována na vazebnou aktivitu pro presenilin. Malé molekuly jsou v tomto kontextu zejména preferovány, protože mohou

být lépe absorbovány po orálním podání, mají méně potenciálních antigeních determinant a/nebo s větší pravděpodobností překonávají hematencefalickou bariéru než větší molekuly jako jsou nukleové kyseliny nebo proteiny. Metody podle předkládaného vynálezu jsou zejména užitečné v tom, že mohou být použity pro identifikaci molekul, které se selektivně nebo preferovaně váží na mutantní formu presenilinového proteinu (více než na normální formu a proto mohou mít zejména význam v léčbě heterozygotních obětí této dominantní autosomální choroby.

Protože normální fyziologické role PS1 a PS2 jsou dosud neznámé, mohou mít sloučeniny, které se vážou na normální, mutantní nebo na obě formy těchto presenilinů využití v léčbě a diagnostice. Sloučeniny, které se vážou pouze na normální presenilin mohou, například, účinkovat jako enhancery jejich normální aktivity a proto alespoň částečně kompenzovat ztracenou nebo nepřítomnou aktivitu mutantních forem presenilinu u obětí Alzheimerovy choroby. Sloučeniny, které se vážou jak na normální, tak na mutantní formy presenilinu mohou být užitečné, pokud různě ovlivňují aktivity dvou forem tak, že zmírňují celkovou odchylku od normální funkce. Alternativně, blokování aktivity jak normálních, tak mutantních forem jak PS1, tak PS2 může mít méně vážné fyziologické a klinické následky než normální progresse choroby a proto sloučeniny, které se váží na a inhibují jak normální, tak mutantní formy presenilinu, mohou být terapeuticky použitelné. Preferovaně jsou, nicméně, identifikovány sloučeniny, které mají vyšší vazebnou afinitu k mutantním presenilinům než k normálním presenilinům (např. alespoň 2 - 10 krát vyšší K_a) a které selektivně nebo preferovaně inhibují aktivitu mutantní formy. Takové sloučeniny mohou být identifikovány za použití jakýchkoliv technik zde popsanych a

potom srovnáním vazebných afinit pro normální a mutantní formy PS1 a PS2 sloučeniny, která je kandidátem.

Účinek agens, které se vážou na preseniliny (normální nebo mutantní formy) může být monitorován buď přímým monitorováním této vazby za použití přístrojů (např. BIAcore, LKB Pharmacia, Sweden) pro detekci této vazby, například, podle změny ve fluorescenci, podle molekulové hmotnosti nebo podle koncentrace buď vazebného agens nebo presenilinové složky, buď v rozpustné fázi nebo v na substrát vázané fázi.

Po identifikaci metodou popsanou výše může být sloučenina, která je kandidátem produkována v množstvích dostatečných pro farmaceutické podání a testování (např. μg nebo mg nebo větší množství) a může být formulována ve farmaceuticky akceptovatelných nosičích (viz např. Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, A., vyd., Mack Pub., 1990). Tyto kandidáti sloučenin mohou pak být podány k transformovaným buňkám podle vynálezu, transgením zvířecím modelům podle vynálezu, k buněčným liniím odvozeným od zvířecích modelů nebo od lidských pacientů nebo pacientům trpícím Alzheimerovou chorobou. Zvířecí modely zde popsané jsou zejména užitečné v testování kandidátových sloučenin, které se vážou na normální nebo mutantní presenilin na jejich terapeutickou účinnost.

Kromě toho, po identifikaci metodou popsanou výše může sloučenina, která je kandidátem, sloužit také jako "úvodní sloučenina" v projektování a vývoji nových léčiv. Například, jak je v oboru dobře známo, sekvenční modifikace malých molekul (např. nahrazení aminokyselinového zbytku s peptidy; nahrazení funkčních skupí peptidovými nebo non-peptidovými sloučeninami) je standartní přístup ve farmaceutické průmyslu pro vývoj nových

farmaceutických sloučenin. Takový vývoj obecně probíhá od "úvodní sloučeniny", o které je známo, že má alespoň nějakou aktivitu (např. vazbu na PS1 nebo blokovací schopnost) požadované farmaceutické látky. Konkrétně, pokud je identifikována jedna nebo více sloučenin, které mají alespoň nějakou požadovanou aktivitu (např. modulaci aktivity presenilinu), pak může strukturální srovnání molekul značně informovat odborníka naznačením částí úvodních sloučenin, které by měly být konservovány a částí, které mohou být měněny při rojektování nové kandidátové sloučeniny. Tak poskytuje předkládaný vynález také prostředky pro identifikaci úvodních sloučenin, které mohou být sekvenčně modifikovány za produkce nových kandidátových sloučenin pro použití v léčbě Alzheimerovy choroby. Tyto nové sloučeniny potom mohou být testovány jak na vazbu na presenilin, tak na blokování (např., v testech vazby popsáných výše) a na terapeutickou účinnost (např. na zvířecích modelech zde popsáných). Tento postup může být opakován dokud nejsou identifikovány sloučeniny, které mají požadovanou terapeutickou aktivitu a/nebo účinnost.

V každé presentované serii provedení je proveden test pro detekci vazby mezi "presenilinovou složkou" a nějakou jinou skupinou. Zejména užitečné budou sekvenční testy, ve kterých jsou sloučeniny testovány na schopnost vazby na pouze normální nebo na pouze mutantní formy presenilinových funkčních domén za popužití mutantních a normálních presenilinových složek ve vazebném testu. U takových sloučenin se očekává, že budou mít největší terapeutický užitek, jak je podrobněji popsáno dále. "Presenilinovou složkou" v testu může být kompletní normální nebo mutantní forma presenilinového proteinu (např. hPS1 nebo hPS2 varianta), ale nemusí být. Spíše mohou být využity jednotlivé

funkční domény presenilinů, jak byly popsány výše, buď jako separátní molekuly nebo jako část fúsního proteinu. Například, pro izolaci proteinů a sloučenin, které interagují s těmito funkčními doménami může být vyšetření provedeno za použití fúsních konstruktů a/nebo syntetických peptidů korespondujících k těmto regionům. Tak, pro PS2, mohou být vyrobeny GST-fúsní peptidy obsahující sekvence korespondující přibližně aminokyselinám 1 až 87 (N-konec), nebo 269 - 387 (TM6->7 smyčka), nebo jakýmkoliv jiným požadovaným konservovaným doménám. Pro kratší funkční domény může být produkován syntetický peptid korespondující, například, přibližně aminokyselinám 107 až 134 (TM1->2 smyčka). Podobně, pro PS1, mohou být vyrobeny GST- nebo jiné fúsní peptidy obsahující sekvence korespondující přibližně aminokyselinám 1 až 81 (N-konec), nebo 266 - 410 (TM6->7 smyčka), nebo syntetické peptidy korespondující, například, přibližně aminokyselinám 101 až 131 (TM1->2 smyčka). Volitelně, jsou možné různé kombinace fúsních proteinů a presenilinových funkčních domén a zde jsou uvedeny mnohé příklady. Kromě toho, funkční domény mohou být pozměněny pro tento test, například, zavedením reaktivní skupiny nebo aminokyselinového zbytku (např. cysteinu) do funkční domény, aby se usnadnila imobilizace domény na substrátu (např. za použití sulfhydrylových reakcí). Tak byl například syntetizován TM1->2 smyčkový fragment (31-mer) obsahující další C-terminální cysteinový zbytek. Tento peptid byl použit pro vytvoření afinitního substrátu pro afinitní chromatografii (Sulfo-link; Pierce) pro izolaci vazebných proteinů pro mikrosequencování. Podobně mohou být vytvořeny jiné funkční domény nebo antigení fragmenty s modifikovanými zbytky (viz., např. příklad 10).

Proteiny a jiné sloučeniny identifikované těmito metodami

mohou být purifikovány a charakterizovány akýmikoliv standartními metodami známými v oboru. Proteinu mohou, například, být purifikovány a separovány za použití elektroforetických (např. SDS-PAGE, 2D-PAGE) nebo chromatografických (např. HPLC) technik a mohou potom být mikrosekvencovány. Pro proteiny s blokováním N-koncem je použito štěpení (např. CNBr a/nebo trypsinem) určitého vazebného proteinu pro uvolnění peptidových fragmentů. Následující purifikace/charakterizace HPLC a mikrosekvencováním a/nebo spektrometrií hmoty konvenčními metodami poskytuje data vnitřní sekvence takových blokováných proteinů. Pro neproteinové sloučeniny mohou být použity standartní analytické techniky organické chemie (např. IR, NMR a hmotová spektrometrie, analýzy funkčních skupin; rentgenová krystalografie) pro určení jejich struktury a identity.

Metody pro vyšetření buněčných lysátů, tkáňových homogenizátů, nebo knihoven malých molekul na kandidáty vazebných molekul pro presenilinsou v oboru dobře známy a, ve světle předkládaného objevu mohou být nyní využity pro identifikaci sloučenin, které se vážou na normální nebo mutantní presenilinové složky nebo které modulují aktivitu presenilinu jak je definována nespecifickými měřeními (např. změnami intracelulárního Ca^{2+} , poměru GTP/GDP) nebo specifickými měřeními (např. změno v A β peptidové produkci nebo změnami v expresi jiných downstream genů, které mohou být monitorovány různými metodami, 2D gelovou elektroforesou, různou hybridizací nebo SAGE metodami). Preferované metody obsahují variace následujících technik:

- 1) přímé extrakce afinitní chromatografií;
- 2) ko-izolace presenilinových složek a navázaných proteinů nebo jiných sloučenin imunoprecipitací;

- 3) Biomolecular Interaction Assay (BiaCore); a
 - 4) kvasinkových dvouhybridových systémů.
- Tyto a jiné jsou diskutovány odděleně níže.

A. Afinitní chromatografie

Ve světle předkládaných objevů může být využito mnoha afinitních vazebných technik známých v oboru pro izolaci proteinů nebo jiných sloučenin, které se váží na preseniliny zde popsané. Obecně, presenilinová složka musí být imobilizována na substrátu (např. koloně nebo filtru) a roztok obsahující testovanou sloučeninu je uveden do kontaktu s presenilinovým proteinem, fúzí nebo fragmentem za podmínek, které jsou permissivní pro vazbu. Substrát je potom promyt roztokem pro odstranění nenavázaných nebo slabě naázaných molekul. Druhé promytí může potom eluovat ty sloučeniny, které se silně vážou na imobilizované normální nebo mutantní presenilinové složky. Alternativně, testované sloučeniny mohou být imobilizovány a roztok obsahuje jednu nebo více složek presenilinu může být uveden do kontaktu s kolonou, filtrem nebo jiným substrátem. Schopnost presenilinových složek vázat se na testované sloučeniny může být určena stejně, jak bylo uvedeno výše nebo může být použita označená forma presenilinové složky (např. radioznačená nebo chemiluminiscentní funkční doména) pro rychlejší hodnocení vazby na substrátu imobilizovaných sloučenin. Kromě toho, protože jak o PS1, tak o PS2 se soudí, že to jsou s membránou asociované proteiny, může být preferováno, aby presenilinové proteiny, fúze nebo fragmenty byly inkorporovány do lipidových dvojvrstev (např. liposomů) pro navození jejich správného složení. Toto zejména platí, pokud je použita presenilinová složka obsahující alespoň jednu transmembránovou doménu. Takové presenilin-liposomy mohou být imobilizovány na

substrátech (buď přímo nebo prostřednictvím jiného elementu v liposomové membráně), mohou procházet přes substrát s imobilizovanými testovanými sloučeninami, nebo mohou být použity v jakékoliv z mnoha dobře známých vazebných testů pro membránové proteiny. Alternativně může být presenilinová složka izolována v membránové frakci z buněk produkujících složku a tato membránová frakce může být použita ve vazebném testu.

B. Ko-imunoprecipitace

Jinou dobře charakterizovanou technikou pro izolaci presenilinových složek a jejich asociovaných proteinů nebo jiných sloučenin je přímá imunoprecipitace s protilátkami. Tato technika byla úsečně použita, například, pro izolaci mnoha proteinů asociovaných se synaptickými váčky (Phizicky and Fields, 1994). Tak, buď normální nebo mutantní, volné nebo membránově vázané složky presenilinů mohou být smíseny v roztoku se sloučeninami, které jsou kandidáty, za podmínek, které jsou permissivní pro vazbu a presenilinové složky mohou být imunoprecipitovány. Proteiny nebo jiné sloučeniny mohou potom být identifikovány standartními technikami jak je popsáno výše. Obecné techniky pro imunoprecipitaci mohou být nalezeny v, například, Harlow and Lane, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Protilátky použité v tomto testu, jak je zde popsán, mohou být polyklonální nebo monoklonální, a zahrnují různé fragmenty protilátek (např. Fab, $F(ab')_2$), stejně jako jednořetězcové protilátky a podobně.

C. Biomolecular Interaction Assay

Jinou použitelnou metodou pro detekci a izolaci vazebných proteinů je Biomolecular Interaction Assay nebo "BIAcore" system vyvinutý Pharmacia Biosensor a popsaný v protokolu výrobce (LKB Pharmacia, Sweden). Ve světle předkládaného vynálezu je odborník nyní schopen využít tento system, nebo system v podstatě ekvivalentní, pro identifikaci proteinů nebo jiných sloučenin majících vazebnou kapacitu pro preseniliny. BIAcore system využívá afinitně purifikované anti-GST protilátky pro imobilizaci GST-fúsních proteinů na sensorovém čipu. Volitelně, jiné fúsní proteiny a korespondující protilátky mohou být substituovány. Sensor využívá povrchové plasmonové resonance, což je optický fenomen, který detekuje změny v indexech lomu. Homogenizát požadované tkáně probíhá přes imobilizovaný fúsní prtoein a interakce protein-protein jsou registrovány jako změny v indexu lomu. Tento system může být použit pro určení kinetiky vazby a pro hodnocení toho, zda je pozorovaná vazba fyziologicky relevantní.

D. Kvasinkový dvouhybridový system

Kvasinkové "dvouhybridové" systemy mají výhodu ve transkripčních faktorech, které jsou složeny ze dvou fyzikálně separovatelných, funkčních domén (Phizicky and Fields, 1994). Nejběžněji používaný je kvasinkový GAL4 transkripční aktivátor skládající se z DNA vazebné domény a transkripční aktivátorové domény. Dva různé klonovací vektory jsou použity pro generování separátních fúsí GAL4 domén na geny kodující potenciální vazebné proteiny. Fúsní prtoeiny jsou ko-exprivovány, zaměřeny na jádro a, pokud se interakce vyskytnou, produkuje aktivace reporterového genu (např. lacZ) detekovatelný fenotyp. například, Clontech

Matchmaker System-2 může být použit s Clontech mozkovou cDNA GAL4 aktivační doménovou fúsní knihovnou s presenilin-GAL4 vazebnými doménovými fúsními klony (Clontech, Palo Alto, CA). Ve světle těchto objevů je nyní odborník v oboru schopen produkovat mnoho presenilinových fúsí, včetně fúsí obsahujících buď normální nebo mutantní funkční domény presenilinových proteinů, a vyšetřit takové fúsní knihovny tak, aby identifikoval presenilinové vazebné proteiny.

E. Jiné metody

Sekvence nukleotidů a proteinových produktů, včetně mutantních a normálních forem těchto nukleových kyselin a jejich korespondujících proteinů, mohou být použity ve výše uvedených technikách pro izolaci jiných interagujících proteinů a pro identifikaci jiných genů, jejichž exprese je alterována nadměrnou expresí normálních presenilinových sekvencí, nebo sníženou expresí presenilinových sekvencí, nebo expresí mutantních presenilinových sekvencí. Identifikace těchto interagujících proteinů, stejně jako identifikace jiných genů, jejichž úroveň exprese je alterována působením mutantních presenilinových sekvencí (například) bude identifikovat jiné genové cíle, které budou mít přímý vliv na patogenesi této choroby v její klinické nebo patologické formě. Přesněji, budou identifikovány jiné geny, které mohou sami být místem jiných mutací způsobujících Alzheimerovu chorobu, nebo které mohou sami být cílem cíleného terapeutického zásahu (např. pro redukci hladin exprese k normálu nebo pro farmakologický blok účinků jejich nadměrné exprese) jako potenciální léčby této choroby. Přesněji, tyto techniky spočívají na PCR-založených a/nebo na hybridizaci založených metodách pro identifikaci genů, které jsou různě exprivovány mezi dvěma stavy

(buněčná linie exprimující normální preseniliny ve srovnání se stejnou buněčnou linií exprimující mutantní presenilinové sekvence). Tyto techniky zahrnují různé zobrazení, seriové analýzy genové exprese (SAGE), a hmotovou spektrometrii proteinových 2D-gelů a subtraktivní hybridizaci (popsanou Nowakem, 1995 a Kahnem, 1995).

Podle volby odborníka v oboru zde existuje mnoho jiných metod a vyšetření pro jednotlivé proteiny a jiné sloučeniny, stejně jako existují rozsáhlé knihovny proteinů a jiných sloučenin (např. fágové zobrazovací knihovny a klonovací systémy od Stratagene, La Jolla, CA) pro identifikaci molekul, které se váží na normální nebo mutantní složky presenilinů. Všechny z těchto metod obsahují krok smísení normálního nebo mutantního presenilinového proteinu, fúze nebo fragmentu s testovanými sloučeninami, umožnění vazby (pokud se nějaká vyskytne) a testování navázaných komplexů. Všechny takové metody jsou nyní dostupné díky předkládanému objevu v podstatě čistých presenilinů, fragmentů funkčních domén podstatě čistých presenilinů, presenilinových fúsních proteinů, protilátek k presenilinům, a metod pro jejich výrobu a použití.

8. Metody pro identifikaci sloučenin pro modulaci aktivity presenilinů

V jiné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro identifikaci sloučenin se schopností modulovat aktivitu normálních a mutantních presenilinů. Jak je zde použito s ohledem na tuto serii provedení zahrnuje termín "aktivita" široce genovou a proteinovou expresi, post-translační zpracování presenilinového proteinu, přenos a lokalizaci, a jakoukoliv funkční aktivitu

(např. enzymatickou, receptorovou-efektorovou, vazebnou, kanálovou), stejně jako downstream účinky kterékoli z nich. Preseniliny se zdají být integrálními membránovými proteiny normálně asociovanými s endoplasmatickým retikulem a/nebo Golgiho aparátem a mohou mít funkce zapojené v transportu nebo přenosu APP a /nebo v regulaci intracelulární hladiny vápníku. Kromě toho, je známo, že presenilinové mutace jsou asociovány se zvýšenou produkcí A β peptidů, s objevením se plaků amyloidu a neurofibrilárních změtí, se snížením kognitivní funkce a s apoptotickou smrtí buněk. Proto, za použití transformovaných buněk a modelů transgeních zvířat podle předkládaného vynálezu, buněk získaných od subjektu nesoucích mutantní gen pro presenilin nebo zvířecích nebo lidských subjektů nesoucích přirozeně se vyskytující presenilinové mutace je nyní možné vyšetřovat farmaceutické a terapeutické kandidáty na jejich léčebné účinky detekováním změn v jedné nebo více z těchto funkčních charakteristik nebo fenotypových manifestací normální nebo mutantní presenilinové exprese.

Tak poskytuje předkládaný vynález metody pro vyšetřování nebo testování proteinů, malých molekul nebo jiných sloučenin, které modulují aktivitu presenilinu uvedením buněk in vivo nebo in vitro do kontaktu se sloučeninou, která je kandidátem a testováním změn v markerech asociovaných s normální nebo s mutantní aktivitou presenilinu. Marker asociovaný s aktivitou presenilinu může být jakákoliv měřitelná biochemická, fyziologická, histologická a/nebo behaviorální charakteristika asociovaná s expresí presenilinu. Konkrétně, užitečné markery zahrnují jakoukoliv měřitelnou biochemickou, fyziologickou, histologickou a/nebo behaviorální charakteristiku, která odlišuje buňky, tkáně, zvířata nebo jednotlivce nesoucí alespoň jeden

mutantní gen pro presenilin od jejich normálních protějšků. kromě toho, markerem může být jakékoliv specifické nebo nespecifické měření aktivity presenilinu. Presenilin specifická měření zahrnují měření exprese presenilinu (např. hladin presenilinové mRNA nebo proteinů), která mohou využívat proby nukleových kyselin nebo protilátek podle předkládaného vynálezu. Nespecifická měření zahrnují změny v buněčné fyziologii jako je pH, intracelulární vápník, hladiny cyklického AMP, poměry GTP/GDP, aktivita fosfatidylinositolu, fosforylace proteinů, atd., což může být monitorováno prostředky jako je cytosensorový mikrofyzioметр (Molecular Devices Inc., Spojené státy americké). Aktivace nebo inhibice aktivity presenilinu v jeho mutantní nebo normální formě může být také monitorována vyšetřením změn v expresi jiných genů, které jsou specifické pro presenilinovou dráhu vedoucí k Alzheimerově chorobě. Toto může být zobrazeno takovými technikami jako je diferenciální zobrazení, diferenciální hybridizace a SAGE (sekvenční analýza genové exprese), stejně jako dvourozměrovou gelovou elektroforesou buněčných lysátů. V každém případě, různě exprivované geny mohou být obasněny identickými studiemi před a po aplikaci sloučeniny, která je kandidátem. Dále, jednotlivé geny, jejichž exprese je modulována podáním kandidátních sloučenin, mohou být zjištěny klonováním, sekvencováním nukleotidů, sekvencováním aminokyselin nebo hmotovou spektrometrií (viz Nowak, 1995).

Obecně, buňky mohou být uvedeny do kontaktu se sloučeninou, která je kandidátem a, po vhodné době (např. 0 - 72 hodin pro většinu biochemických měření kultivovaných buněk), může být testován marker aktivity presenilinu a ten může potom být srovnán se základním měřením. Základní měření může být provedeno před uvedením buněk do kontaktu se sloučeninou, která je kandidátem,

nebo to může být externí základ stanovený jinými pokusy nebo jinak známý v oboru. Buňky mohou být transformované buňky podle předkládaného vynálezu nebo to mohou být explantáty od zvířat či jednotlivců. Konkrétně, buňky mohou být explantáty od nosičů mutací presenilinů (např. lidských subjektů s Alzheimerovou chorobou), nebo mohou být ze zvířecího modelu podle předkládaného vynálezu (např. transgení hlísti nebo myši nesoucí mutantní geny pro presenilin). Pro zvýšení účinku presenilinových mutací na A β dráhu mohou být použity transgení buňky nebo zvířata, která mají zvýšenou A β produkci. Preferované buňky zahrnují ty, které jsou z neurologických tkání jako jsou neuronální, gliální nebo smíšené buněčné kultury; a kultury fibroblastů, jater, ledvin, sleziny nebo kostní dřeně. Buňky mohou být uvedeny do kontaktu se sloučeninami, které jsou kandidát v kultuře in vitro, nebo mohou být podány in vivo živým zvířatům nebo lidským jedincům. Pro živá zvířata a lidské jedince může být testovaná sloučenina podána orálně nebo parenterálním způsobem vhodným pro sloučeninu. Pro klinické testy lidských subjektů může být měření prováděno periodicky (např. denně, týdně nebo měsíčně) po dobu několika měsíců nebo let.

Protože většina nosičů presenilinových mutací bude heterozygotních (t.j. nesoucích jednu normální a jednu mutantní presenilinovou alelu) mohou být sloučeniny testovány na svou schopnost modulovat normální, stejně jako presenilinovou aktivitu. Tak, například, sloučenina, která zvyšuje funkci normálních presenilinů může být užitečná v léčbě s preseniliny asociovaných chorob ako je Alzheimerova choroba. Alternativně, protože suprese aktivity jak normálních, tak mutantních presenilinů u heterozygotních jedinců může mít méně závažné klinické následky než progrese asociovaných onemocnění, může být

žádoucí identifikovat sloučeniny, které inaktivují nebo suprivují všechny formy presenilinů. Preferovaně, nicméně, jsou identifikovány sloučeniny, které selektivně a specificky inaktivují nebo suprivují aktivitu mutantních presenilinů bez porušení funkce normálního presenilinového genu nebo proteinu.

Ve světle identifikace, charakterizace a objevů presenilinových genů a proteinů, nukleokyselinových prob pro preseniliny a protilátek pro preseniliny, a presenilinových transformovaných buněk a transgeních zvířat podle předkládaného vynálezu je nyní odborník v oboru schopen provádět mnoho testů, které budou detekovat modulování aktivity presenilinu sloučeninami, které jsou kandidáty. Zejména preferovaná a uvažovaná provedení jsou dále popsána o něco podrobněji.

A. Exprese presenilinů

V jedné serii provedení jsou využita specifická měření exprese presenilinů pro vyšetřování kandidátových sloučenin pro jejich schopnost ovlivňovat aktivitu presenilinů. Tak, za použití presenilinových nukleových kyselin a protilátek zde popsaných je možné použít hladiny mRNA nebo proteinů jako merkeru pro schopnost sloučeniny, která je kandidátem, modulovat aktivitu presenilinů. Použití takových prob a protilátek pro měření genové a proteinové exprese je dobře v oboru známé a je zde popsáno na jiném místě. Zejména žádoucí může být identifikace sloučenin, které mohou měnit relativní hladiny různých sestřižených variant presenilinů. Mnoho z těchto presenilinových mutací asociovaných s Alzheimerovou chorobou, například, je umístěno v regionu putativní TM6->7 smyčky, která je subjektem alternativního sestřihu v některých periferních tkáních (např. v bílých

krvinkách). Sloučeniny, které mohou zvyšovat relativní frekvenci tohoto sestřihu mohou být proto účinné v zabránění exprese mutací v tomto regionu.

B. Intracelulární lokalizace

V jiné serii provedení mohou být sloučeniny vyšetřovány na svou schopnost modulovat aktivitu presenilinů na základě jejich účinku na přenos a intracelulární lokalizaci presenilinů. Imunocytochemicky bylo u presenilinů ukázáno, že jsou lokalizovány v membránových strukturách asociovaných s endoplasmatickým retikulem a Golgiho aparátem, a jeden presenilinový mutant (H163R), ale žádný jiný, byl vizualizován v malých cytoplasmatických vesikulách neznámé funkce. Rozdíly v lokalizaci normálních a mutantních presenilinů mohou proto přispívat k etiologii s preseniliny spřažených onemocnění. Sloučeniny, které mohou ovlivňovat lokalizaci presenilinů mohou proto být identifikovány jako potenciální terapeutika. Standardní techniky známé v oboru mohou být využity pro detekci lokalizace presenilinů. Obecně, tyto techniky budou využívat protilátek podle předkládaného vynálezu a zejména protilátek, které se selektivně váží na jeden nebo více mutantních presenilinů, ale ne na normální preseniliny. Já je dobře známé v oboru, takové protilátky mohou být značeny jakoukoliv z mnoha technik (např. fluorescenční nebo radioaktivní značkou, značenými sekundárními protilátkami, avidin-biotinem, atd.) pro vizualizaci intracelulárního umístění presenilinů. Preseniliny mohou být ko-lokalizovány na určité struktury, jak je v oboru známo, za použití protilátek k markerům těchto struktur (např. TGN38 pro Golgiho, receptor pro transferin pro post-Golgiho transportní vakuoly, AMP2 pro lysozomy). Western bloty purifikovaných frakcí

z buněčných lyzátů obohacených na různé intracelulárně membránově vázané organely (např. lysozomy, synaptosomy, Golgiho aparát) mohou být také použity. Kromě toho, relativní orientace různých domén presenilinů přes buněčné domény může být testována, například, elektronovou mikroskopií a protilátkami namířenými k těmto doménám.

B. Iontová regulace/metabolismus

V jiné serii provedení mohou být sloučeniny testovány na jejich schopnost modulovat aktivitu presenilinů na základě měření intracelulárních hladin Ca^{2+} , Na^+ nebo K^+ nebo jejich metabolismu. Jak bylo uvedeno výše, preseniliny jsou s membránou asociované proteiny, které mohou sloužit jako, nebo interagovat s, iontovými receptory nebo iontovými kanály. Tak, sloučeniny mohou být vyšetřovány na svou schopnost modulovat s preseniliny spojený vápník nebo jiné iontové metabolismy měřením buď in vivo, nebo in vitro průtoku iontovými kanály a/nebo transmembránové napětí nebo proud za použití náplastových svorek, napěťových svorek a fluorescentního barviva sensitivního na intracelulární vápník nebo transmembránové napětí. Iontový kanál nebo funkce receptoru může být také testována měřením aktivace druhých posílů jako je cyklický AMP, cGMP tyrosin kinas, fosfatas, zvýšením intracelulárního vápníku a podobně. Rekombinantně vyrobené proteiny mohou také být rekonstruovány v umělejších membránových systémech pro studium konduktance iontových kanálů a, proto, buňka použitá v tomto testu může obsahovat umělejší membránu nebo buňku. Testy na změnu v iontové regulaci nebo metabolismu mohou být provedeny na kultivovaných buňkách exprimujících endogenní normální nebo mutantní preseniliny. Takové studie mohou také být provedeny na buňkách

transfektovaných vektory schopnými exprese jednoho z presenilinů, nebo funkční domény jednoho z presenilinů, v normální nebo v mutantní formě. Kromě toho, pro zvýšení signálu měřeného v takových testech mohou být buňky kotransfektovány geny kodujícími proteiny iontových kanálů. Například, *Xenopus* oocytární buňky nebo krysí ledviné (HEK293) buňky mohou být kotransfektovány normálními nebo mutantními sekvencemi pro preseniliny a sekvencemi kodujícími krysí mozkovou Na^+ $\beta 1$ podjednotku, Ca^+ $\beta 1$ podjednotku králíčího kosterního svalů, nebo K^+ $\beta 1$ podjednotku krysího srdce. Změny v s presenilinem spojené nebo presenilinem zprostředkované aktivity iontového kanálu mohou být měřeny dvěma mikroelektrodovými napěťovými svorkami v případě oocytů nebo celobuněčnými náplastovými svorkami zaznamenávajícími HEK293 buňky.

C. Apoptosa nebo buněčná smrt

V jiné serii provedení mohou být sloučeniny testovány na jejich schopnost modulovat aktivitu presenilinů na základě jejich účinku na s preseniliny spojenou nebo preseniliny zprostředkovanou apoptosu nebo smrt buněk. Tak, například, může být stanovena základní hladina apoptosy nebo buněčné smrti pro buňky v kultuře, nebo může být posmrtně určen základní stupeň ztráty neuronů v určitém věku pro zvířecí modely nebo pro lidské subjekty, a schopnost sloučeniny, která je kandidátem suprimovat nebo inhibovat apoptosu nebo buněčnou smrt může být měřena. Buněčná smrt může být měřena standartními mikroskopickými technikami (např. světelnou mikroskopií) nebo může být přesněji měřena apoptosa za pomoci charakteristické morfologie jádra nebo charakteristické fragmentace DNA, která vytváří jaderná oka (viz Gavrieli et al., 1992; Jacobson et al., 1993; Vito et al., 1996).

TUNEL může být také použit pro hodnocení smrti buněk v mozku (viz např. Lassmann et al., 1995). V preferovaných provedeních jsou sloučeniny vyšetřovány na svou schopnost suprovovat nebo inhibovat ztrátu neuronů v transgeních zvířecích modelech podle předkládaného vynálezu. Transgení myši nesoucí, například, mutantní lidský, mutantní myší nebo humanizovaný mutantní presenilinový gen mohou být použity pro identifikaci nebo pro hodnocení sloučenin, které mohou oddálit nebo zabránit neurodegeneraci asociované s Alzheimerovou chorobou. Podobný model transgeních myší, nesoucích mutantní APP gen, byl nedávno popsán Gamesem et al., (1995).

D. A β peptidová produkce

V jiné serii provedení mohou být sloučeniny vyšetřovány na jejich schopnost modulovat s preseniliny spojenou nebo preseniliny zprostředkovanou změnu ve zpracování APP. A β peptid je produkován v několika izoformách vznikajících rozdíly ve zpracování APP. A β peptid je od 39 do 43 aminokyselinový derivát β APP, který je progresivně deponován v difusních a senilních plakách a v krevních cévách subjektů s AD. v lidském mozku jsou A β peptidy heterogenní jak v N-, tak v C-konci. několik pozorování, nicméně, naznačilo, že jak kompletní, tak N-terminálně zkrácené formy dlouhých A β peptidů končících zbytky 42 nebo 43 (t.j. A β 1-42/43 a A β x-42/43) mají významnější roli u AD než peptidy končící zbytkem 40. Tak, A β 1-42/43 a A β x-42/43 jsou časným a významným rysem jak senilních plaků, tak difusních plaků, zatímco peptidy končící zbytkem 40 (t.j. A β 1-40 a A β x-40) jsou predominantně asociovány s podsadou zralých plaků a s amyloidovými krevními cévami (viz např. Iwatsubo et al., 1995; Gravina et al., 1995; Tamaoka et al., 1995; Podlisny et al.,

1995). Kromě toho, izoformu s dlouhou koncovou částí mají větší náchylnost ke tvorbě vláken, a je proto míněno, že jsou více neurotoxické než A β 1-40 peptidy (Pike et al., 1993; Hilbich et al., 1991). Konečně, chybné mutace v kodonu 717 β APP genu asociované s časným nástupem FAD vedou k nadprodukci A β s dlouhým koncem v mozku postižených nosičů mutace, v periferních buňkách a plasmě jak postižených, tak presymptomatických jedinců a v buněčných liniích transfektovaných β APP₇₁₇ mutantní cDNA (Tamaoka et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Jak je popsáno v příkladu 18 níže, nyní jsme objevili, že zvýšená produkce A β peptidů s dlouhým koncem je také asociována s mutacemi v genech pro preseniliny.

Tak v jedné serii provedení poskytuje předkládaný vynález metody pro vyšetření kandidátových sloučenin na jejich schopnost blokovat nebo inhibovat zvýšenou produkci dlouhých izoform A β peptidů v buňkách a transgeních zvířatech exprimujících mutantní gen pro presenilin. Konkrétně, předkládaný vynález poskytuje takové metody, ve kterých byly kultivované savčí buňky, jako jsou mozkové buňky nebo fibroblasty, transformovány podle metod zde popsanych, nebo ve kterých byla transgení zvířata, jako jsou hlodavci nebo non-lidští primáti, produkovány metodami, které jsou zde popsány tak, že exprimují reativně vysoké hladiny mutantních presenilinů. Volitelně mohou být takové buňky nebo transgení zvířata také transformována tak, aby exprimovaly normální formu β App proteinu v relativně vysokých hladinách.

V této serii provedení je sloučenina, která je kandidátem, podána k buněčné linii nebo transgením zvířatům (např. přidáním do media buněk v kultuře; nebo orálním nebo parenterálním způsobem zvířatům) a, po vhodné době (např. 0 - 72 hodin pro

buňky v kultuře, dnech nebo měsících pro zvířací modely) je odebrán biologický vzorek (např. supernatant buněčné kultury nebo buněčný lysát z buněk v kultuře; tkáňový homogenizát nebo plasma od zvířat) a je testován na hladinu dlouhých izoform A β peptidů. Mohou být určeny absolutní hladiny peptidů (např. nMol/ml) nebo relativní hladiny (např., poměr dlouhých a krátkých A β izoform). A β izoformy mohou být detekovány jakýmkoliv způsobem v oboru známým (např. elektroforetickou separací nebo sekvencováním) ale, preferovaně, jsou využity protilátky, které jsou specifické k dlouhým izoformám pro určení absolutních nebo relativních hladin A β 1-42/43 nebo A β x-42/43 peptidů. Kandidáti farmaceutik nebo terapeutik, které redukuje absolutní nebo relativní hladiny těchto dlouhých A β izoform, zejména v modelech transgenických zvířat podle předkládaného vynálezu, budou pravděpodobně mít terapeutický užitek v léčbě Alzheimerovy choroby, nebo jiných chorob způsobených mutacemi presenilinů nebo aberacemi v APP metabolismu.

E. Fosforylace mikrotubulárních asociovaných proteinů

V jiné serii provedení mohou být sloučeniny, které jsou kandidáty vyšetřovány na svou schopnost modulovat aktivitu presenilinů hodnocením účinku sloučeniny na úroveň fosforylace mikrotubulárních asociovaných proteinů (MAP) jako je Tau. Abnormální fosforylace Tau a jiných MAP v mozku obětí Alzheimerovy choroby je v oboru dobře známá. Tak sloučeniny, které mohou zabránit nebo inhibovat abnormální fosforylaci MAP mohou mít užitek v léčbě s preseniliny asociovaných onemocnění jako je AD. Jak je uvedeno výše, buňky od normálních nebo mutantních zvířat nebo subjektů, nebo transformované buněčné linie a zvířecí modely podle předkládaného vynálezu mohou být

použity. Preferované testy budou využívat buněčné linie nebo zvířecí modely transformované mutantními lidskými nebo humanizovanými mutantními geny pro presenilin. Základní stav fosforylace MAP v těchto buňkách může být stanoven a potom může být sloučenina, která je kandidátem, testována na svou schopnost zabránit, inhibovat nebo působit proti hyperfosforylaci asociované s mutanty. Stav fosforylace MAP může být určen jakoukoliv standartní metodou známou v oboru, ale preferovaně jsou využity protilátky, které se vážou selektivně ne fosforylované nebo nefosforylované epitopy. Takové protilátky k fosforylovaným epitopům Tau proteinu jsou známy v oboru (např. ALZ50).

9. Vyšetřování a diagnostika Alzheimerovy choroby

A. Obecné diagnostické metody

Geny pro preseniliny a genové produkty, stejně jako od presenilinů odvozené proby, primery a protilátky, které jsou zde popsány, jsou užitečné při vyšetřování nosičů alel asociovaných s Alzheimerovou chorobou, pro diagnostiku obětí Alzheimerovi choroby, a pro vyšetřování a diagnostiku příbuzných presenilních a senilních demencí, psychiatrických onemocnění jako je schizofrenie a deprese a neurologických onemocnění jako je mrtvice a mozkové krvácení, kde všechny jsou pozorovány ve větším nebo menším rozsahu u symptomatických subjektů nesoucích mutace PS1 nebo PS2 genů nebo APP genu. Jedinci rizikový pro Alzheimerovu chorobu, jako jsou ti s AD přítomnou v rodině, nebo jedinci, kteří nejsou známí jako rizikový, mohou být rutinně vyšetřováni za použití prob pro detekci přítomnosti mutantních presenilinových genů nebo proteinů různými technikami. Diagnostika

dědičných případů těchto chorob může být provedena technikami založenými na nukleových kyselinách (včetně genomových a mRNA/cDNA sekvencích), proteinech a/nebo protilátkách zde popsaných, včetně funkčních testů projektovaných pro detekci selhání nebo zvýšení normální presenilinové aktivity a/nebo přítomnosti specifických nových aktivit způsobených mutantními preseniliny. Preferovaně jsou metody a produkty založeny na lidských PS1 nebo PS2 nukleových kyselinách, proteinech nebo protilátkách jak jsou zde popsány. Jak bude odborníkům v oboru nicméně jasné, signifikantní evoluční konservace velkých částí PS1 a PS2 nukleotidových a aminokyselinových sekvencí, i v druzích tak odlišných jako jsou lidé, myši, *C. elegans* a *Drosophila*, umožňuje odborníkům použít takové non-lidské homologní nukleové kyseliny, proteiny a protilátky i pro aplikace zaměřené na lidské nebo jiné zvířecí subjekty. Tak bude, pro stručnost, ale bez omezení rozsahu vynálezu, následující popis zaměřen na použití lidských homologů PS1 a PS2. Bude nicméně jasné, že homologní sekvence z jiných druhů, včetně těch, které jsou zde popsány, budou pro mnohé účely ekvivalentní.

Jak bude odborníkem oceněno, volba diagnostické metody podle předkládaného vynálezu bude ovlivněna charakterem dostupných biologických vzorků, které budou testovány a charakterem požadované informace. PS1, například, je vysoce exprivován v mozkové tkáni, ale mozkové biopsie jsou invazivní a nákladné postupy, zejména pro rutiní vyšetřování. Jiné tkáně, které exprivují signifikantní hladiny PS1, nicméně, mohou demostrovat alternativní sestřih (např. lymfocyty) a proto, PS1 mRNA nebo protein z trakových buněk může být méně informativní. Tak může být preferován test založený na genomové PS1 DNA, protože žádná informace nebude záviset na alternativním sestřihu a protože v

podstatě všechny jaderné buňky mohou poskytnout použitelný vzorek. Diagnostika založená na jiných presenilinech (např. hPS2, mPS1) jsou subjektem podobných úvah: dostupností tkání, hladin exprese v různých tkáních a alternativních mRNA a proteinových produktů vzniklých z alternativního sestřihu.

B. Na proteinech založená vyšetření a diagnostika

Pokud je diagnostický test založen na presenilinových proteinech, pak je mnoho způsobů možných. například, diagnosa může být dosažena monitorováním rozdílů v elektroforetické mobilitě normálních a mutantních proteinů. Takový přístup bude zejména užitečný pro identifikaci mutantů, ve kterých je přítomna substituce náboje, nebo ve kterých inserce, delece nebo substituce vedly k signifikantní změně v elektroforetické migraci vzniklého proteinu. Alternativně, diagnosa může být založena na rozdílech charakteru proteolytického štěpení normálních a mutantních proteinů, rozdílech v molárních poměrech různých aminokyselinových zbytků nebo na funkčních testech demonstrujících pozměněnou funkci genových produktů.

V preferovaných provedeních bude na proteinech založená diagnostika využívat rozdílů ve schopnosti protilátek vázat se na normální a mutantní presenilinové proteiny (zejména na hPS1 nebo hPS2). Takové diagnostické testy mohou využívat protilátek, které se váží na normální proteiny, ale ne na mutantní proteiny, nebo naopak. Jednotlivě, může být použit test, ve kterém je mnoho monoklonálních protilátek, každá schopná vazby na mutantní epitop. Hladina navázané anti-mutantní protilátky ve vzorku získaného od testovaného subjektu (vizualizovaná například radioznačením, ELISA nebo chemiluminiscencí) může být srovnána s

hladinou vazby v kontrolním vzorku. Alternativně, může být použita protilátka, která se váže na normální, ale ne na mutantní preseniliny a snížená hladina vazby protilátky může být použita pro odlišení homozygotních normálních jedinců od mutantních heterozygotů nebo homozygotů. Takové protilátková diagnostika může být použita pro in situ imunochistochemii za použití bioptických vzorků ze tkání CNS získaných antemortem nebo postmortem, včetně neuropatologických struktur asociovaných s těmito chorobami jako jsou neurofibrilární oka a plaky amyloidu, nebo může být použita se vzorky kapalin jako je mozkomíšní mok nebo s periferní tkání jako jsou bílé krvinky.

C. Na nukleových kyselinách založená vyšetření a diagnostika

Pokud je diagnostický test založený na nukleových kyselinách ze vzorku, pak může být test založen na mRNA, cDNA nebo genomové DNA. Pokud je použita mRNA ze vzorku, pak musí být provedeno mnoho stejných úvah s ohledem na zdroj tkáně a pravděpodobnost alternativního sestřihu. To znamená, že zde musí být malá nebo žádná exprese transkriptů, pokud nejsou vybrány nebo dostupné vhodné zdroje, a alternativní sestřih může vést ke ztrátě nějaké informace nebo k obtížné interpretaci. Nicméně, již jsme ukázali (Sherrington et al., 1995; Rogaev, 1995), že mutace v 5' UTR, 3' UTR, otevřeném čtecím rámečku a místech sestřihu jak PS1, tak PS2 mohou být spolehlivě identifikovány v mRNA/cDNA izolované z bílých krvinek a/nebo kožních fibroblastů. Pokud je testována mRNA, cDNA nebo genomová DNA, mohou být použity standartní metody dobře známé v oboru pro detekci přítomnosti určité sekvence buď in situ nebo in vitro (viz např. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Obecně

může nicméně být vyšetřována jakákoliv tkáň nebo jaderné buňky.

Genomová DNA použitá pro diagnosu může být získána z tělesných buněk, jako jsou ty, které jsou přítomny v krvi, tkáňových biopsiích, chirurgických vzorcích nebo autoptickém materiálu. DNA může být izolována a použita přímo pro detekci specifické sekvence, nebo může být amplifikována polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) před analýzou. Podobně, RNA nebo cDNA mohou být také použity, s nebo bez PCR amplifikace. Pro detekci specifické sekvence nukleových kyselin může být použito přímé sekvencování nukleotidů, hybridizace za použití specifických oligonukleotidů, trávení restrikcími enzymy a mapování, PCR mapování, RNAsová protekce, chemické chybné štěpení, ligasou zprostředkovaná detekce a různé jiné metody. Oligonukleotidy specifické pro jednotlivé sekvence mohou být chemicky syntetizovány a radioaktivně nebo neradioaktivně (např. biotinem, ethidiumbromid) značeny a hybridizovány na jednotlivé vzorky imobilizované na membránách nebo na jiných pevných nosičích (např. "dot-blot" nebo přenosem z gelů po elektroforese), nebo v roztoku. Přítomnost nebo absence cílových sekvencí může být potom vizualizována za pomoci metod jako je autoradiografie, fluorometrie nebo kolorimetrie. Tyto postupy mohou být automatizovány za použití mnoha krátkých oligonukleotidů známé sekvence fixovaných ve známé hustotě na silikonové plátky.

1. Vhodné proby a primery

Pro hybridizaci, RNAsovou protekci, ligasou zprostředkovanou detekci, PCR amplifikaci nebo pro jakoukoliv jinou standartní metodu bude mnoho subsekvencí sekvencí pro preseniliny zde popsaných použitelných jako proby a/nebo primery. Tyto sekvence a

subsekvence budou zahrnovat jak normální presenilinové sekvence, tak poškozující mutantní sekvence. Obecně, použitelné sekvence budou obsahovat alespoň 8 - 9, lépe 10 - 50 a nejlépe 18 - 24 souvislých nukleotidů z presenilinových intronů, exonů nebo intro/exon spojení. V závislosti na cílové sekvenci, požadované specifitě a budoucím vývoji techniky mohou mít význam také kratší sekvence. Proto, jakákoliv od presenilinů odvozená sekvence, která je použita pro izolaci, klonování, amplifikaci, identifikaci nebo jinou manipulaci s presenilinovou sekvencí může být považována za vhodnou probu nebo primer. Zejména budou považovány za užitečné sekvence obsahující nukleotidové pozice z genů pro preseniliny, o kterých je známo, že jsou zde přítomny chorobu způsobující mutace, nebo sekvence, které sousedí s těmito pozicemi.

(a) PS1 proby a primery

Jak bylo uvedeno výš, bylo nyní identifikováno mnoho chorobu způsobujících mutací v lidském PS1 genu. Detekce těchto a jiných PS1 mutací je nyní umožněna za použití izolovaných prob nukleových kyselin nebo primerů odvozených od normálních nebo od mutantních PS1 genů. Zejména užitečné jsou proby nebo primery, odvozené od sekvencí kodujících N-konec, TM1-TM2 region a TM6-TM7 region. Jak bylo uvedeno výše, nicméně, byly již identifikovány mutace, které ovlivňují jiné regiony PS1 proteinu a, za použití metod zde popsaných, jich bude více jednoznačně identifikováno. Proto, předkládaný vynález poskytuje izolované proby a primery nukleových kyselin korespondující normálním a mutantním sekvencím z jakékoliv části PS1 genu, včetně intronů a 5' a 3' UTR, u kterých může být ukázáno, že jsou asociovány s vývojem Alzheimerovy choroby.

Pouze jako příklad, a bez omezení vynálezu, mohou být využity proby a primery odvozené od hPS1 DNA segmentu bezprostředně sousedícího C410Y mutaci ve vyšetřovacích a diagnostických metodách. Tato mutace vzniká, alespoň u některých jedinců, ze substituce A za G v pozici 1477 SEQ ID NO: 1. Tak, genomová DNA, mRNA nebo cDNA získaná ze vzorků periferní krve od jedince mohou být vyšetřovány za použití oligonukleotidových prob nebo primerů obsahujících toto potenciální místo mutace. Pro hybridizační proby pro tuto mutaci mohou být využity proby o 8 - 50 a lépe proby o 18 - 24 bazích překlenující místo mutace (např. bp 1467 - 1487 v SEQ ID NO: 1). Pokud má být proba použita s mRNA, pak by samozřejmě měla být komplementární k mRNA (a proto korespondující nekodujícímu řetězci PS1 genu). Pro proby použité s genomovou DNA nebo s cDNA může být komplementární k oboum řetězcům. Pro detekci sekvencí obsahujících tuto mutaci PCR metodou by měly vhodné primery obsahovat sekvence o 8 - 50, a lépe 18 - 24 nukleotidech délky odvozené od regionů sousedících s mutací na kterékoliv straně, a které korespondují pozicím kdekoliv od 1 do 1000 bp, ale lépe od 1 - 200 bp, vzdálené od místa mutace. PCR primery, které jsou 5' od místa mutace (na kodujícím řetězci) by měly korespondovat v sekvenci kodujícímu řetězci PS1 genu, zatímco PCR primery, které jsou 3' k místu mutace (na kodujícím řetězci) by měly korespondovat nekodujícímu nebo anti-sense řetězci (např. 5' primer korespondující bp 1451 - 1468 SEQ ID NO: 1 a 3' primer korespondující komplementu 719 - 699 SEQ ID NO: 14).

Podobné primery mohou být vybrány pro jiné PS1 mutace nebo pro mutace "hot-spots" obecně. Například, 5' PCR primer pro M146L mutaci (A->C v bp 684) může obsahovat sekvenci korespondující přibližně bp 601 - 620 SEQ ID NO: 1 a 3' primer může

korespondovat komplementu o přibližně 1328 - 1309 SEQ ID NO: 8. Povšimněte si, že tento příklad využívá primerů jak z intronových, tak z exonových sekvencí. Jako jiný příklad, vhodný 5' primer pro A246E mutaci (C->A v bp 985) může obsahovat sekvence korespondující přibližně bp 907 - 925 SEQ ID NO: 1 nebo 3' primer může korespondovat komplementu o přibližně 1010 - 990 SEQ ID NO: 1. Jako jiný příklad, 5' primer pro H163R mutaci (A->G v bp 736 SEQ ID NO: 1 nebo v bp 419 SEQ ID NO: 9) může obsahovat sekvence korespondující přibližně bp 354 - 375 SEQ ID NO: 9 nebo 3' primer může korespondovat komplementu o přibližně 581 - 559 SEQ ID NO: 1. Podobně, mohou být využity intronové nebo exonové sekvence, například, pro produkci 5' primeru pro L286V mutaci (C->G v bp 1104 SEQ ID NO: 1 nebo v bp 398 SEQ ID NO: 11) obsahující sekvenci korespondující přibližně bp 249 - 268 SEQ ID NO: 11 nebo bp 1020 - 1039 SEQ ID NO: 1, a 3' primery korespondující komplementu přibližně bp 510 - 491 SEQ ID NO: 11.

Mělo by být uvedeno, že proby a primery mohou obsahovat specificky mutované nukleotidy. Tak, například, hybridizační proba nebo 5' primer mohou být produkovány pro C410Y mutaci tak, že obsahují sekvenci korespondující přibližně bp 1468 - 1486 SEQ ID NO: 1 pro vyšetření nebo pro amplifikaci normálních alel, nebo korespondující stejné sekvenci, ale s bp korespondující bp 1477 pozměněnou (G->T) pro vyšetření nebo amplifikaci mutantních alel.

(b) PS2 proby a primery

Stejně obecné úvahy jak byly popsány výše s ohledem na proby a primery pro PS1 mohou být stejně aplikovány na proby a primery pro PS2. Konkrétně, proby a primery mohou korespondovat intronovým, exonovým nebo intron/exonovým vazebným sekvencím,

mohou korespondovat sekvencím z kodujících nebo nekodujících (antisense) řetězců, a mohou korespondovat normálním nebo mutovaným sekvencím.

Pouze jako příklad, PS1 N141I mutace (A->T v bp 787) může být vyšetřována PCR amplifikací sousedního DNA fragmentu za použití 5' primeru korespondujícího přibližně bp 733 - 751 SEQ ID NO: 18 a 3' primeru korespondujícího komplementu přibližně bp 846 - 829 SEQ ID NO: 18. Podobně, 5' primer pro M239V mutaci (A->G v bp 1080) může obsahovat sekvenci korespondujícího přibližně bp 1009 - 1026 a 3' primer může korespondovat komplementu přibližně bp 1118 - 1101 SEQ ID NO: 18. Jako jiný příklad, sekvence kodující region sousedící s I420T mutací (T->C v bp 1624) může být vyšetřována PCR amplifikací genomové DNA za použití 5' primeru korespondujícího přibližně bp 1576 - 1593 SEQ ID NO: 18 a 3' primeru korespondujícího komplementu přibližně bp 1721 - 1701 SEQ ID NO: 18 pro generování produktu o 146 párech bazí. Tento produkt, například, může být potom probován alelově specifickými oligonukleotidy pro divoký typ (např. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18) a/nebo pro mutantní typ (např. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18 s T->C v bp 1624) sekvence.

(2) Hybridizační vyšetřování

Pro in situ detekci normálních nebo mutantních PS1, PS2 nebo jiných s preseniliny spojených sekvencí nukleových kyselin může být standartními technikami připraven vzorek tkáně a potom může být uveden do kontaktu s jednou nebo více z výše popsanych prob, preferovaně s takovou, která je značena pro usnadnění detekce a test pro hybridizaci nukleových kyselin je proveden za přísných podmínek, které umožňují hybridizaci pouze mezi probou a vysoce

nebo přesně komplementárními sekvencemi. Protože se většina s doposud detekovaných mutací PS1 a PS2 skládá ze substituce jedné nukleové kyseliny, budou vyžadovány hybridizační podmínky vysoké přísnosti pro odlišení normálních sekvencí od většiny mutantních sekvencí. Pokud je známý presenilinový genotyp rodičů subjektu, pak mohou být proby vybrány podle něj. Alternativně mohou být využity proby pro mnoho mutantů sekvenčně nebo v kombinaci. Protože většina jedinců majících mutace presenilinu bude heterozygotních, mohou být také použity proby k normálním sekvencím a homozygotní normální individua mohou být odlišena podle množství vazby (např. podle intensity radioaktivního signálu). V jiné variaci může být využit test kompetitivní vazby, ve kterém jsou použity jak normální, tak mutantní proby, ale pouze jedna z nich je značena.

(3) Restrikční mapování

Alterace sekvence mohou také tvořit nebo rušit náhodná místa pro restrikční enzymy, která jsou odhalena použitím trávení vhodným enzymem, které je následováno "gel-blot" hybridizací. DNA fragmenty nesoucí místo (normální nebo mutantní) jsou detekovány zvýšením nebo snížením jejich velikosti, nebo zvýšením nebo snížením počtu korespondujících restrikčních fragmentů. Taková analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), nebo restrikční mapování, může být použito s genomovou DNA, mRNA nebo cDNA. Sekvence pro preseniliny mohou být amplifikovány PCR za použití výše popsaných primerů před restrikcí, a v tomto případě může délka PCR produktů ukazovat na přítomnost nebo absenci jednotlivých restrikčních míst, a/nebo mohou být podrobeny restrikci po amplifikaci. Fragmenty presenilinů mohou být vizualizovány běžnými prostředky (např. UV světlem za přítomnosti

ethidium bromidu).

Pouze jako příklad je zde uvedeno, že PS1 M146L mutace (A->C v bp 684 SEQ ID NO: 1) ruší PspHI místo; H163R mutace (A->G v bp 736) ruší NlaIII místo; A246E mutace (C->A v bp 985) vytváří DdeI místo; a L286V mutace (C->G v bp 1104) vytváří PvuIII místo. Odborník v oboru si může snadno vybrat z mnoha komerčně dostupných restričních enzymů a, na základě normálních a mutantních sekvencí popsaných v předkládaném vynálezu, může provést analýzu restričního mapování, která bude detekovat v podstatě jakoukoliv mutaci presenilinů.

(4) PCR mapování

V jiné serii provedení může být mutace substituce jedné baze detekována v PCR na základě různé délky nebo produkce PCR produktu. Tak, primery, které překlenují místa mutace nebo které, preferovaně, mají 3' konce v místech mutace, mohou být využity pro amplifikaci vzorku genomové DNA, mRNA nebo cDNA od subjektu. U chyby v místě mutace může být očekáváno, že změna schopnost normálních a mutantních primerů navodit polymerasovou reakci a, proto, může vést k profilům produktů, které se liší mezi normálními subjekty a heterozygotními a/nebo homozygotními presenilinovými mutanty. PCR produkty normálního a mutantního genu mohou být různě separovány a detekovány standartními technikami, jako je polyakrylamidová nebo agarosová gelová elektroforesa a vizualizace se značenými probami, ethidium bromidem a podobně. Vzhledem k možnému nespecifickému primingu nebo přeskočení míst mutace, stejně jako vzhledem k faktu, že většina nosičů mutantních alel bude heterozygotních, může být účinnost této techniky snížena.

(5) Elektroforetická mobilita

Genetické testování založené na odlišnostech DNA sekvence může také být dosaženo detekcí alterací elektroforetické mobility DNA, mRNA nebo cDNA fragmentů v gelech. Malé delece a inserce sekvence, například, mohou být vizualizovány gelovou elektroforezou s vysokou rozlišovací schopností jedno nebo dvou řetězcové DNA, nebo jako změny v charakteru migrace DNA heteroduplexů v non-denaturační gelové elektroforese. Mutace presenilinů nebo polymorfismus může být také detekován metodami, které využívají posuny mobility během jednořetězcového konformačního polymorfismu (SSCP) asociovaného se sekundární strukturou mRNA nebo jednořetězcové DNA.

(6) Chemické štěpení chyb

Mutace v presenilinech mohou být také detekovány využitím metody chemického štěpení chyb (CCM) (viz např. Saleeba and Cotton, 1993, a referenční tam uvedené). V této technice mohou být proby (větší než 1 kb) smíseny se vzorkem genomové DNA, cDNA nebo mRNA získané od subjektu. Vzorek a proby jsou smíseny a podrobeny podmínkám, které umožňují tvorbu heteroduplexů (pokud se nějaké tvoří). Preferovaně jsou jak proby, tak vzorky nukleových kyselin dvouřetězcové, nebo mohou proba a vzorek být společně amplifikovány PCR, pro zajištění tvorby všech možných chybných heteroduplexů. Chybně spárované T zbytky jsou reaktivní s oxidem osmičelým a chybně spárované C zbytky jsou reaktivní s hydroxylaminem. Protože každý chybně spárovaný A bude doprovázen chybně spárovaným T a každý chybně spárovaný G bude doprovázen

chybně spárovaným C, povede jakýkoliv rozdíl v nukleotidech mezi probou a vzorkem (včetně malých insercí a delecí) k tvorbě alespoň jednoho reaktivního heterouplexu. Po ošetření oxidem osmičelým a/nebo hydroxylaminem pro modifikaci jakýchkoliv míst chybného párování, je směs podrobena chemickému štěpení v jakémkoliv modifikovaném chybně spárovaném místě, například, reakcí s piperidinem. Směs může potom být analyzována standartními technikami jako je gelová elektroforesa pro detekci produktů štěpení, které budou ukazovat chybné párování mezi probou a vzorkem.

(7) Jiné metody

Různé jiné metody pro detekci mutací presenilinů, založené na sekvencích presenilinů zde popsaných, budou jasné odborníkům v oboru. Jakákoliv z těchto může být využita v souladu s předkládaným vynálezem. Tyto zahrnují, ale nejsou omezeny na, nukleasové protekční testy (S1 nebo ligasou zprostředkované), ligovaný PCR, denaturační gradientní gelovou elektroforesu (DGGE; viz např. Fischer and Lerman, 1983), vyhledávání restrikčními endonukleasami v kombinaci s SSCP (REF-SSCP; viz např. Liu and Sommer, 1995), a podobně.

D. Jiná vyšetření a diagnostika

V dědičných případech, jako primární událost, a v nedědičných případech jako sekundární událost způsobená stavem choroby, se může vyskytnout abnormální zpracování PS1, PS2, APP nebo proteinů reagujících s PS1, PS2 nebo APP. Toto může být detekováno jako abnormální fosforylace, glykosylace, glykační amidace, nebo proteolytické štěpné produkty v tělesných tkáních nebo tekutinách

(např. CSF nebo krvi).

Diagnosa může také být provedena pozorováním alterací v presenilinové transkripci, translaci a posttranslační modifikaci a zpracování, stejně jako alterací v intracelulárním a extracelulárním přenosu produktu genu pro presenilin v mozku a periferních buňkách. Takové změny budou obsahovat alterace v množství presenilinové messengerové RNA a/nebo proteinu, alterace ve fosforylačním stavu, abnormální intracelulární umístění/distribuci, atd. Takové testy budou zahrnovat: Northern Blots (s presenilin specifickými a nespecifickými nukleotidovými probami), Western blots a enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA) (s protilátkami namířenými specificky k presenilinu nebo k presenilinové funkční doméně, včetně různých post-translačních modifikačních stavů včetně glykosylovaných a fosforylovaných izoform). Tyto testy mohou být provedeny na periferních tkáních (např. krevních buňkách, plasmě, kultivovaných nebo jiných fibroblastových tkáních, atd.) stejně jako na biopsiích CNS tkání získaných antemortem nebo postmortem, a na mozkomíšní tekutině. Takové testy mohou také obsahovat in situ hybridizaci a imunohistochemické vyšetření (pro lokalizaci messengerové RNA a proteinu do specifických subcelulárních kompartmentů a/nebo v neuropatologických strukturách asociovaných s těmito chorobami jako jsou neurofibrilární oka nebo plaky amyloidu).

E. Vyšetřovací a diagnostické kity

V souladu s předkládaným vynálezem jsou také poskytnuty diagnostické kity, které obsahují reagens nezbytná pro výše popsaná diagnostická vyšetření. Například, mohou být poskytnuty kity obsahující protilátky nebo sady protilátek, které jsou

specifické pro jeden nebo více mutantních epitopů. Tyto protilátky mohou být v jednotlivém provedení značeny jakýmkoliv standartními prostředky, které usnadňují vizualizaci a vazbu. Alternativně, mohou být poskytnuty kity, ve kterých jsou přítomny oligonukleotidové proby nebo PCR primery, jak byly popsány výše, pro detekci a/nebo amplifikaci mutantních PS1, PS2 a jiných s preseniliny spojených sekvencí. Opět, takové proby mohou být značeny pro snadnější detekci specifické hybridizace. podle vhodnosti pro různá diagnostická provedení popsaná výše, oligonukleotidové proby a protilátky v takových kitech mohou být imobilizovány na substrátech a mohou být poskytnuty vhodné kontroly.

10. Metody léčby

Předkládaný vynález nyní poskytuje základ pro terapeutický zásah u onemocnění, která jsou způsobena, nebo která mohou být způsobena, mutacemi presenilinů. jak bylo podrobně popsáno výše, mutace v PS1 a PS2 genech jsou asociovány s vývojem forem Alzheimerovy choroby s časným nástupem a proto je předkládaný vynález zejména zaměřen na ne léčbu subjektů s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou, nebo těch, u kterých je riziko jejího rozvoje. Ve světle exprese PS1 a PS2 genů v různých tkáních je nicméně dosti pravděpodobné, že účinek mutací v tomto lokusu není omezen na mozek a proto že mohou být příčinou jiných chorob než Alzheimerovy choroby. Proto je předkládaný vynález také zaměřen na choroby manifestující se v jiných tkáních, které mohou vznikat z mutací, chybné exprese, chybného metabolismu nebo jiných zděděných nebo získaných alterací genů pro preseniliny a genových produktů. Kromě toho, ačkoliv se Alzheimerova choroba manifestuje jako neurologické onemocnění, může být tato manifestace způsobena

mutacemi v presenilinech, které nejprve ovlivňují jiné orgánové tkáně (např. játra), které potom uvolňují faktory, které ovlivňují mozkovou aktivitu a nakonec způsobují Alzheimerovu chorobu. Proto, po zvážení různých terapií uvedených dále, je chápáno, že takové terapie mohou být zaměřeny na tkáně jiné než je mozková, jako je srdce, placenta, plíce, játra, kosterní sval, ledvina a slinivka, kde jsou PS1 a/nebo PS2 také exprimovány.

Bez vazby na jakoukoliv jednotlivou teorii podle vynálezu se účinek mutací spojených Alzheimerovou chorobou zdá být výsledkem získání nové funkce nebo akcelerace normální funkce, což přímo nebo nepřímo způsobuje aberantní zpracování prekursorového proteinu pro amyloid (APP) na A β peptid, abnormální homeostasu fosforylace, a/nebo abnormální apoptosu v mozku. Takové zúzkání funkce nebo akcelerace funkčního modelu bude konsistentní s nástupem symptomů v dospělosti a s dominantní dědičností Alzheimerovy choroby. Nicméně, mechanismus, kterým mohou mutace v presenilinech způsobit tyto účinky zůstává neznámý.

Je známo, že APP může být metabolizován dvěma cestami. V první je APP metabolizován pasáží přes Golgiho síť a potom sekreční dráhou prostřednictvím clathrinem potažených váčků. Zralý APP je potom pasážován do plasmatické membrány, kde je štěpen α -sekretasou za produkce solubilní frakce (Proteasa Nexin II) plus non-amyloidogenního C-terminálního peptidu (Selkoe et al., 1995; Gandy et al., 1993). Alternativně může být zralý APP nasměrován do endosom-lysozomové dráhy, kde podléhá štěpení β a gamma-sekretase za produkce A β peptidu. A β peptidové deriváty APP jsou neurotoxické (Selkoe et al., 1994). Fosforylační stav buňky určuje relativní rovnováhu mezi α -sekretasovou (non-amyloidogenní) a A β dráhou (amyloidogenní dráhou) (Gandy et

al., 1993) a může být modifikován farmakologicky forbololovými estery, agonisty muskarinu a jinými agens. Fosforylační stav buňky se zdá být ovlivněn faktory cytosolu (zejména protein kinasou C) účinkujícími pod jedním nebo více integrálními membránovými proteiny v Golgiho síti.

Bez vazby na jakoukoliv jednotlivou teorii podle vynálezu, preseniliny, zejména hPS1 a hPS2 (které nesou několik konsensuálních sekvencí pro protein kinasu C) mohou být integrální membránové proteiny, jejich fosforylační stav určuje relativní rovnováhu mezi α -sekretasovou a A β dráhou. Tak mutace v PS1 nebo PS2 genech mohou způsobovat alterace ve struktuře a funkci jejich produktů vedoucí k defektním interakcím s regulačními elementy (např. protein kinasou C) nebo s APP, což způsobí, že APP je nasměrován k amyloidogenní endosom-lysozomové dráze. Faktory prostředí (např. viry, toxiny nebo věk) mohou mít také podobný účinek na PS1 nebo na PS2.

Opět bez vazby na jakoukoliv jednotlivou teorii podle vynálezu je také zaznamenáno, že oba PS1 a PS2 proteiny mají významnou homologii sekvence aminokyselin s lidskými proteiny iontových kanálů a receptorů. Například, PS2 protein vykazuje významnou homologii k α -podjednotce lidského sodíkového kanálu (E=0,18, P = 0,16, identity = 22 - 27% ve dvou regionech o alespoň 35 aminokyselinových zbytcích) za použití BLASTP vzorce podle Altschula et al., (1990). Jiná onemocnění (jako je maligní hypertermie a hyperkalemická periodická paralýza u lidí, a degenerace mechanosensorických neuronů u *C. elegans*) vznikají z mutací iontových kanálů nebo receptorových proteinů. Mutace PS1 nebo PS2 genu mohou, proto, postihovat podobné funkce a vést k Alzheimerově chorobě a/nebo jiným psychiatrickým a neurologickým

onemocněním.

Terapie pro léčbu s preseniliny asociovaných onemocnění jako je AD mohou být založeny na:

- 1) podání normálních PS1 nebo PS2 proteinů,
- 2) genové terapii normálními PS1 nebo PS2 geny pro kompenzaci nebo nahrazení mutantních genů,
- 3) genové terapii založené na antisense sekvencích k mutantním PS1 nebo PS2 genům nebo na těch, které "knok-outují" mutantní geny,
- 4) genové terapii založené na sekvencích, které kodují protein, který blokuje nebo napravuje škodlivý účinek PS1 nebo PS2 mutantů,
- 5) imunoterapii založené na protilátkách k normálním a/nebo mutantním PS1 nebo PS2 proteinům, nebo
- 6) na malých molekulách (léčivech), které alterují expresi PS1 nebo PS2, blokují abnormální interakce mezi mutantními formami PS1 nebo PS2 a jinými proteiny a ligandy, nebo které jinak blokují aberantní funkci mutantních PS1 nebo PS2 proteinů alterací struktury mutantních proteinů, zvýšením jejich metabolické clearance nebo inhibicí jejich funkce.

A. Proteinová terapie

Léčba s preseniliny spojené Alzheimerovy choroby, nebo jiných

onemocnění vzniklých z mutací presenilinů. může být provedena nahrazením mutantního proteinu normálním proteinem, modulováním funkce normálního proteinu pro redukci účinku jakékoliv aberantní funkce mutantních proteinů.

Pro provedení tohoto je nezbytné získat, jak je zde popsáno, velká množství v podstatě čistých PS1 proteinu nebo PS2 proteinu ze systémů kultivovaných buněk, které mohou exprimovat tento protein. Dopravení proteinu do postižených oblastí mozku může být provedeno za použití vhodných obalových nebo podávacích systémů včetně, například, liposomy zprostředkovaného podání proteinů cílovým buňkám.

B. Genová terapie

V jedné serii provedení může být využita genová terapie, ve které jsou normální kopie PS1 genu nebo PS2 genu zavedeny pacientovi pro úspěšné kodování normálního proteinu v jednom nebo více typech postižených buněk. Gen musí být těmto buňkám dopraven v takové formě, ve které může být vychytáván a může dostatečně kodovat protein pro poskytnutí efektivní funkce. Tak je preferováno, aby rekombinantní gen byl operativně připojen na silný promotor tak, aby byla poskytnuta vysoká hladina exprese, která bude kompenzovat, nebo převažovat, mutantní proteiny. Jak je uvedeno výše, rekombinantní konstrukty mohou obsahovat endogenní nebo exogenní regulační elementy, indukovatelné nebo reprivovatelné regulační elementy nebo tkáňově specifické regulační elementy.

V jiné serii provedení může být genová terapie využita pro nahrazení mutantního genu homologní rekombinací s rekombinantním

konstruktem. Rekombinantní konstrukt může obsahovat normální kopii cílového genu pro presenilin, a v tom případě je defekt korigován in situ, nebo může obsahovat "knock-out" konstrukt, který zavádí stop kodon, chybnou mutaci nebo delecii, která ruší funkci mutantního genu. S ohledem na toto by mělo být zmíněno, že takový konstrukt může vyřadit jak normální, tak mutantní kopie cílového genu pro presenilin u heterozygotního jedince, ale celková ztráta funkce genu pro presenilin může být méně škodlivá pro jedince než trvalá progresse chorobného stavu.

V jiné serii provedení může být využita antisense genová terapie. Antisense terapie je založena na skutečnosti, že sekvenčně specifická suprese genové exprese může být dosažena intracelulární hybridizací mezi mRNA nebo DNA a komplementárními antisense druhy. Tvorba hybridního duplexu může potom interferovat s transkripcí genu a/nebo se zpracováním, transportem, transací a/nebo stabilitou cílové presenilinové mRNA. Antisense strategie může využívat mnoha přístupů včetně podání antisense oligonukleotidů nebo antisense oligonukleotidových analogů (např. analogů s fosforylovanou kostrou) nebo transfekce s antisense RNA expresními vektory. Opět, takové vektory mohou obsahovat endogenní nebo exogenní regulační elementy, indukovatelné nebo reprivovatelné regulační elementy nebo tkáňově specifické regulační elementy.

V jiné serii provedení může být genová terapie použita pro zavedení rekombinantního konstruktů kodujícího protein nebo peptid, který bokuje nebo jinak koriguje aberantní funkci způsobenou mutantním genem pro presenilin. V jednom provedení může rekombinantní gen kodovat peptid, který koresponduje mutantní doméně presenilinu, o které bylo zjištěno, že abnormálně

interaguje s jiným buněčným proteinem nebo s jiným buněčným ligandem. Tak, například, pokud je o mutantní TM6->7 doméně zjištěno, že interaguje s určitým buněčným proteinem, ale že korespondující normální TM6->7 doména nepodléhá této interakci, může být genová terapie použita pro poskytnutí přebytku mutantní TM6->7 domény, která může soutěžit s mutantním proteinem a inhibovat nebo blokovat aberantní interakci. Alternativně, část proteinu, která interaguje s mutantním, ale nikoliv s normálním, presenilinem, může být kodována a exprimována rekombinantním konstruktem tak, aby soutěžila s, a proto inhibovala nebo blokovala, aberantní interakci. Konečně, v jiném provedení, stejný účinek může být dosažen insercí druhého mutantního proteinu genovou terapií v přístupu podobném korekci "Deg 1(d)" a "Mec 4(d)" mutací u *C. elegans* insercí mutantních transgenů.

Retrovirové vektory mohou být použity pro genovou terapii pro somatické buňky zejména pro jejich vysokou účinnost infekce a stabilní integraci a expresi. Cílová buňka musí být nicméně schopná dělení a hladiny exprese normálního proteinu by měly být vysoké, protože onemocnění je dominantní. Kompletní PS1 nebo PS2 geny, subsekvence kodující funkční domény presenilinů nebo jakékoliv jiné terapeutické peptidy popsané výše mohou být konovány do retrovirového vektoru a řízeny z jeho endogeního promotoru, z retrovirového dlouhého terminálního repeatu, nebo z promotoru specifického pro požadovaný typ cílových buněk (např. neuronů). Jiné virové vektory, které mohou být použity, obsahují adeno-asociované viry, virus vakcinie, hovězí papiloma virus, nebo herpetické viry jako je virus Epsteina-Barrové.

C. Imunoterapie

Imunoterapie je pro Alzheimerovu chorobu také možná. Protilátky jsou namířeny proti mutantním PS1 a PS2 proteinům (nebo jejich části) a jsou pacientovi podány pro vazbu nebo pro blokování mutantního proteinu a pro zabránění jeho škodlivým účinkům. Simultánně, exprese normálního proteinového produktu může být podpořena. Alternativně jsou protilátky namířeny proti specifickým komplexům mezi mutantním nebo divokým typem PS1 nebo PS2 a jejich interakčními partnery.

Daším přístupem je stimulace endogenní produkce protilátek k požadovanému antigenu. Podání může být provedeno ve formě jednorázového imunogeního přípravku nebo vakcinové imunizace. Imunogení kompozice může být připravena jako injikovatelná, jako kapalný roztok nebo jako emulze. PS1 a PS2 protein nebo jiný antigen může být smísen s farmaceuticky akceptovatelným excipients kompatibilním s proteinem. Taková excipients mohou zahrnovat vodu, salinický roztok, dextrosu, glycerol, ethanol a jejich kombinace. Imunogení kompozice a vakciny mohou také dále obsahovat přídatné substance jako jsou emulsifikační agens nebo adjuvans pro zvýšení účinnosti. Imunogení kompozice a vakciny mohou být podány parenterálně injekcí subkutánně nebo intramuskulárně.

Imunogení přípravky a vakciny jsou podány v takovém množství, aby byly terapeuticky účinné, ochranné a imunogení. Dávkování závisí na způsobu podání a bude se velmi lišit podle velikosti pacienta.

D. Terapeutika malých molekul

Jak je zde popsáno, poskytuje předkládaný vynález mnoho metod pro identifikaci malých molekul a jiných sloučenin, které mohou

být užitečné v léčbě Alzheimerovy choroby a jiných onemocnění způsobených preseniliny. Tak, například, předkládaný vynález poskytuje metody pro identifikaci vazebných proteinů pro preseniliny, a zejména, metody pro identifikaci proteinů a jiných buněčných složek, které se váží na nebo jinak interagují s mutantními preseniliny, ale nikoli s normálními preseniliny. Vynález také poskytuje metody pro identifikaci malých molekul, které mohou být použity pro narušení aberantních interakcí mezi mutantními preseniliny a takovými proteiny nebo jinými buněčnými složkami.

Takové interakce, vyžadující mutantní, ale ne normální preseniliny, neposkytují pouze informaci užitečnou v pochopení biochemické dráhy narušené mutací v presenilinech, a kauzální pro Alzheimerovu chorobu, ale také poskytují bezprostřední terapeutický cíl pro intervenci v etiologii onemocnění. Identifikací těchto proteinů a analýzou těchto interakcí je možné vyšetřovat nebo projektovat sloučeniny, které působí proti nebo brání interakcím, což poskytuje možnou léčbu pro abnormální interakce. Tato léčba bude měnit interakce presenilinů s jejich partnery, měnit funkci interagujícího proteinu, měnit množství nebo tkáňovou distribuci exprese interakčních partnerů nebo měnit podobné vlastnosti u presenilinů samotných.

Terapie mohou být projektovány pro modulaci těchto interakcí a tak pro modulaci Alzheimerovy choroby a jiných stavů asociovaných se získanými nebo dědičnými abnormalitami PS1 nebo PS2 genů nebo jejich genových produktů. Potenciální účinnost této terapie může být testována analyzováním afinity a funkce těchto interakcí po expozici terapeutického agens standartnímu farmakokinetickému měření afinity (K_d a V_{max} atd.) za použití syntetických peptidů

nebo rekombinantních proteinů korespondujících funkčním doménám PS1 genu, PS2 genu nebo jiných presenilinových homologů. Jiná metoda pro testování účinku takových interakcí obsahujících funkční domény jako jsou hydrofilní smyčky je monitorování změn v intracelulárním přenosu a posttranslační modifikaci relevantního genu in situ hybridizací, imunohistochemií, Western blotem a metabolickými pulsními radioaktivně značenými studiemi studiemi za přítomnosti nebo za absence terapeutických agens. Další metodou je monitorování účinků "downstream" dějů, jako jsou (i) změny v intracelulárním metabolismu, přenosu a zaměření APP a jeho produktů; (ii) změny v dějích druhého posla, např. cAMP intracelulární Ca^{2+} , aktivity protein kinas atd.

Jak bylo uvedeno výše, mohou být preseniliny zahrnuty v metabolismu APP a fosforylační stav presenilinů může být zásadní pro rovnováhu mezi α -sekretasovou a A β dráhou ve zpracování APP. Za použití transformovaných buněk a zvířecích modelů podle předkládaného vynálezu je možné lépe pochopit tyto dráhy a aberantní děje, které se vyskytují u presenilinových mutantů. Za použití těchto znalostí je možné projektovat terapeutické strategie působící proti škodlivým účinkům presenilinových mutantů.

Pro léčbu Alzheimerovy choroby, například, může být fosforylační stav PS1 pozměněn chemickými biochemickými agens (např. léky, peptidy a jinými sloučeninami), které mění aktivitu protein kinasy C a jiných protein kinas, nebo které mění aktivitu protein fosfatas, nebo které modifikují dostupnost PS1, který má být posttranslačně modifikován. Interakce kinas a fosfatas s presenilinovými proteiny a interakce presenilinových proteinů s jinými proteiny obsaženými v přenosu APP v Golgiho síti, mohou

být modulovány ke snížení Golgiho váčků do endosom-lysozomové dráhy, což inhibuje produkci A β peptidu. Takové sloučeniny budou zahrnovat peptidová analoga APP, PS1, PS2 a jiných homologů presenilinu, stejně jako jiné interagující proteiny, lipidy, cukry a agens, která navozují různou glykosylaci PS1, PS2 a/nebo jejich homologů; agens, která mění biologický poločas presenilinové mRNA nebo proteinů. včetně protilátek a antisense oligonukleotidů; a agens, která působí na PS1 a/nebo PS2 transkripci.

Účinek těchto agens v buněčných liniích a na zvířatech může být monitorován monitorováním transkripce, translace a post-translační modifikace PS1 a/nebo PS2 (např. fosforylace nebo glykosylace), stejně jako monitorováním intracelulárního přenosu PS1 a/nebo PS2 přes různé intracelulární a extracelulární kompartmenty. Metody pro tyto studie zahrnují Western a Northern bloty, imunoprecipitaci po metabolickém značení ("pulse-chase") radioznačeným methioninem a ATP, a imunohistochemii. Účinek těchto agens může být také monitorován za použití studií, které vyšetřují relativní vazebné afinity a relativní množství PS1 a/nebo PS2 proteinů obsažených v interakcích s protein kinasou C a/nebo APP za použití buď standartních testů vazebné afinity nebo ko-precipitace a Western blotů za použití protilátek k protein kinase C, APP, PS1, PS2 nebo jiným presenilinovým homologům. Účinek těchto agens může být také monitorován hodnocením produkce A β peptidů ELISA před a po expozici putativnímu terapeutickému agens (viz např. Huang et al., 1993). Účinek může být také monitorován hodnocením životaschopnosti buněčných linií po expozici solím hliníku a/nebo A β peptidům, o kterých se soudí, že jsou neurotoxické u Alzheimerovy choroby. Konečně, účinek těchto agens může být také monitorován hodnocením kognitivní funkce

zvířat nesoucích normální genotypy v APP a/nebo jejich presenilinových homologách, zvířat nesoucích APP transgeny (s nebo bez mutací), zvířat nesoucích lidské presenilinové transgeny (s nebo bez mutací), nebo nesoucích jakékoliv kombinace výše uvedených.

Podobně, jak bylo uvedeno výše, preseniliny mohou být obsaženy v regulaci Ca^{2+} jako receptory nebo jako iontové kanály. Tato role presenilinů může být také vyšetřována za použití buněčných linií a zvířecích modelů podle předkládaného vynálezu. Vzhledem k těmto výsledkům může být produkován test pro Alzheimerovu chorobu pro detekci abnormální receptorové funkce nebo abnormální funkce iontového kanálu spojenou s abnormalitami, které jsou získány nebo zděděny v genech pro preseniliny nebo jejich produktech, nebo v jednom z homologních genů nebo jejich produktech. Tento test může být proveden jak in vivo, tak in vitro měřením průtoku iontovým kanálem a/nebo transmembránového napětí nebo proudu za použití náplastových svorek, napěťových svorek a fluorescentních barviv sensitivních na intracelulární vápník nebo na transmembránové napětí. Defektní funkce iontového kanálu nebo receptoru může také být měřena aktivací druhého posla jako je cyklický AMP, cGMP tyrosin kinasa, fosfatasa, zvýšení hladin intracelulárního Ca^{2+} , atd. Také mohou být rekonstruovány rekombinantně vyrobené proteiny v arteficiálních membránových systémech pro studium vodivosti iontového kanálu. Terapie, které ovlivňují Alzheimerovu chorobu (způsobenou získanými nebo zděděnými defekty v PS1 genu nebo v PS2 genu; způsobenou defekty v jiné dráze, které vedou k této chorobě, jako jsou mutace v APP; a způsobenou faktory prostředí) mohou být testovány analýzou jejich schopnosti modifikovat abnormální funkci iontového kanálu nebo receptoru indukovanou mutací v genu pro presenilin. Terapie

mohou být také testovány jejich schopnostmi modifikovat normální funkci iontového kanálu nebo kapacity receptoru presenilinových proteinů. Takové testy mohou být provedeny na kultivovaných buňkách exprimujících normální nebo mutantní PS1 geny/ genové produkty nebo PS2 geny/genové produkty. Takové studie mohou také být provedeny na buňkách transfektovaných vektory schopnými exprese presenilinů, nebo funkčních domén jednoho z presenilinů, v normální nebo mutantní formě. Terapie pro Alzheimerovu chorobu mohou být navrženy pro modifikaci abnormální funkce iontového kanálu nebo receptoru PS1 genu nebo PS2 genu. Takovými terapeutickými látkami mohou být běžná léčiva, peptidy, cukry nebo lipidy, stejně jako protilátky nebo jiné ligandy, které ovlivňují vlastnosti PS1 nebo PS2 genového produktu. Takové terapie mohou také být provedeny přímým nahrazením PS1 genu a/nebo PS2 genu genovou terapií. V případě iontového kanálu může být genová terapie provedena za použití buď minigenů (cDNA plus promotoru), nebo genomových konstruktů nesoucích genomové DNA sekvence pro části nebo pro celý gen pro presenilin. Mutantní presenilinové nebo homologní genové sekvence mohou také být použity pro bránění účinku dědičných a získaných abnormalit v genech pro preseniliny jak bylo nedávno provedeno nahrazením Mec 4 a Deg 1 u *C. elegans* (Huang and Chalfie, 1994). Terapie může také být zaměřena na posílení funkce receptoru nebo iontového kanálu jednoho homologu, tak jako je PS2 gen, tak, aby mohl potenciálně převzít funkce mutantní formy jiného homologu (např. PS1 genu, který je defektní díky získaným nebo dědičným defektům). Terapie za použití antisense oligonukleotidů pro blokování exprese mutantního PS1 genu nebo mutantního PS2 genu, koordinovaná s genovým nahrazením normálního PS1 nebo PS2 genu může také být aplikována za použití standartních technik buď genové terapie, nebo terapie proteinové náhrady.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Vývoj genetického, fyzikálního "obsahu" a transkripční mapy minimálního kosegregačního regionu

CEPH MegaYac a RPCI PAC lidské knihovny celkové genomové DNA byly prohledávány na klony, obsahující genomové DNA fragmenty z AD3 regionu chromosomu 14q24.3 za použití oligonukleotidových prob pro každý z 12 SSR makerových lokusů použitých ve studiích genetické vazby, stejně jako za použití dalších markerů (Albertsen et al., 1990; Chumakov et al., 1992; Ioannu et al., 1994). Vzdálenosti v genetické mapě mezi každým markerem jsou znázorněny nad sousedními úseky, a jsou odvozeny od publikovaných dat (NIH/CEPH Colaborative Mapping Group, 1992; Wang, 1992; Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Klony získané pro každý počáteční markerový lokus byly sestaveny do řádných serií částečně se překrývajících klonů ("sousedů") za použití čtyř nezávislých metod. První, sekvence reprezentující konce YAC insertů byly izolovány inversním PCR (Riley et al., 1990) a hybridizovány na Southern blot panely obsahující produkty restričního trávení DNA ze všech YAC klonů získaných pro všechny počáteční lokusy tak, aby se identifikovaly jiné YAC klony nesoucí překrývající se sekvence. Za druhé, byla provedena inter-Alu PCR na každém YAC a vzešlé vzorky proužků byly srovnávány mezi pooly získaných YAC klonů tak, aby se identifikovaly jiné klony nesoucí překrývající se sekvence (Bellamne-Chartelot et al., 1992; Chumakov et al., 1992). Za třetí, pro vylepšení specificity Alu-PCR vyhledávání byla YAC DNA

restrihována HaeIII nebo RsaI, restriční produkty byly amplifikovány jak Alu, tak L1H konsensuálními primery a produkty byly vyšetřovány polyakrylamidovou gelovou elektroforesou. Konečně, protože další STS byly generovány v průběhu vyhledávání transkribovaných sekvencí, byly tyto STS také použity pro identifikaci překrývajících se klonů. Výsledné sousedící úseky byly kompletní kromě jediné diskontinuity mezi YAC932C7 nesoucím D14S53 a YAC746B4 nesoucím D14S61. Fyzikální mapa pořadí STS v sousedních úsecích byla v souladu s mapou genetické vazby pro tento region (NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992; Wang and Weber, 1992; Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Nicméně, stejně jako v genetických mapách, nebylo možné jednoznačně vyřešit relativní řád lokusů v D14S43/D14S71 seskupení a D14S76/D14S273 seskupení. PAC1 klony naznačovaly, že D14S277 je telomerický k D14S268, zatímco genetické mapování naznačovaly opačné pořadí. Dále, několik STS prob selhalo při detekci hybridizačních vzorků u alespoň jednoho YAC klonu, u kterého, na základě nejšetrnější konsensuální fyzikální mapy a z genetické mapy, bylo předpokládáno, že obsahuje tento STS. Například, D14S268 (AFM265) a RSCAT7 STS sou nepřítomné v YAC788H12. Protože tyto výsledky byly reprodukovatelné a vyskytovaly se s několika různými STS markery, odrážejí tyto výsledky s největší pravděpodobností přítomnost malých intersticiálních delecí v jednom z YAC klonů.

Příklad 2

Kumulativní dvoubodové lod skóre pro chromosomové 14q24.3 markery

Genotypy v každém polymorfním mikrosatelitním markerovém

lokusu byly určeny PCR ze 100 ng genomové DNA od všech dostupných postižených nebo nepostižených členů rodokmenu jak bylo popsáno dříve (St. George-Hyslop et al., 1992) za použití sekvencí primerů specifických pro každý mikrosatelitní lokus (Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Normální populační frekvence každé alely byla určena za použití manželů a jiných neurologicky normálních subjektů ze stejné etnické skupiny, ale nelišila se signifikantně od frekvence stanovené pro smíšenou Kavkazskou populaci (Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Maximálně pravděpodobné kalkulace hodnocené ve věku nástupu korekce, frekvence markerové alely odvozené od publikovaných serií smíšených Kavkazských subjektů a stanovené frekvence alel pro AD3 mutaci 1:1000 byly jak bylo dříve popsáno (St. George-Hyslop et al., 1992). Analýzy byly opakovány za použití stejných frekvencí markerových alel a za použití fenotypové informace pouze od postižených členů rodokmenů jak bylo dříve popsáno pro zajištění toho, že nepřesnosti v hodnocených parametrech použitých v kalkulacích maximální pravděpodobnosti nebudou zavádějící pro analýzu (St. George-Hyslop et al., 1992). Tyto doplňkové analýzy nealterovaly signifikantně ani důkazy podporující vazbu, ani objev rekombinantních dějů.

Příklad 3

Haplotypy mezi sousedícími markery segregují s AD3 ve FAD

Haplotypy v rozsahu mezi centromerickými a telomerickými sousedícími markery na původní kopii chromosomu 14 segregující s AD3 u čtrnácti FAD rodokmenů s časným nástupem FAD (rodokmeny NIH2, MGH1, Tor1.1, FAD4, FAD1, MEX1 a FAD2) ukazovaly rodokmenově specifické lod skóre $> +3,00$ s alespoň jedním

markerem mezi D14S258 a D14S53. Identické částečné haplotypy jsou pozorovány ve dvou regionech onemocnění nesoucího chromosomu segregujícího v několika rodokmenech podobného etnického původu. V regionu A jsou podílící se alely pozorovány v D14S268 ("B": velikost alely = 126 bp, frekvence alely u normální Kavkazské populace = 0,04; "C": velikost = 124 bp, frekvence = 0,38); D14S277 ("B": velikost = 156 bp, frekvence = 0,19; "C": velikost = 154 bp, frekvence = 0,33); a RSCAT6 ("D": velikost = 111 bp, frekvence = 0,25; "E": velikost = 109 bp, frekvence = 0,20; "F": velikost = 107 bp, frekvence = 0,47). V regionu B jsou alely identické velikosti pozorovány v D14S43 ("A": velikost = 193 bp, frekvence = 0,01; "D": velikost = 187 bp, frekvence = 0,12; "E": velikost = 185 bp, frekvence = 0,26; "I": velikost = 160 bp, frekvence = 0,38; D14S273 ("3": velikost = 193 bp, frekvence = 0,38; "4": velikost = 191 bp, frekvence = 0,16; "5": velikost = 189 bp, frekvence = 0,34; "6": velikost = 187 bp, frekvence = 0,02) a D14S76 ("1": velikost = bp, frekvence = 0,01); "5": velikost = bp, frekvence = 0,38); "6": velikost = bp, frekvence = 0,07); "9": velikost = bp, frekvence = 0,38). Viz Sherrington et al., (1995) pro podrobnosti.

Příklad 4

Získání transkribovaných sekvencí z AD3 intervalu

Putativní transkribované sekvence kodované v AD3 intervalu byly získány za použití přímé hybridizační metody, ve které byly krátké hybridizační fragmenty generované z lidské mozkové mRNA hybridizovány na imobilizované klonované genomové cDNA fragmenty (Rommens et al., 1993). Vzniklé krátké putativně transkribované sekvence byly použity jako proby pro získání delších transkriptů

z knihoven lidské mozkové cDNA (Stratagene, La Jolla). Fyzikální umístění originálních krátkých klonů a následně získaných delších cDNA klonů bylo stanoveno analýzou hybridizačních vzorků generovaných hybridizací proby na Southern bloty obsahující panel EcoRI trávených celkových DNA vzorků izolovaných od jednotlivých YAC klonů v sousedících úsecích. Sekvence nukleotidů každého z delších cDNA klonů byla určena automatizovaným cyklickým sekvencováním (Applied Biosystems Inc., CA), a byla srovnána s jinými sekvencemi v nukleotidové a proteinové databasy za použití blast algoritmu (Altschul et al., 1990). Přírůstková čísla pro transkribované sekvence jsou: L40391, L40392, L40393, L40394, L40395, L40396, L40397, L40398, L40399, L40340, L40341, L40342 a L40343.

Příklad 5

Lokalizace mutací v PS1 genu za použití restričních enzymů

Přítomnost A246E mutace, která vytváří DdeI restriční místo, byla testována v genomové DNA PCR za použití koncově značených primerů korespondujících v podtatě bp 907 - 925 v SEQ ID NO: 1 a neznačených primerů korespondujících komplementu bp 1010 - 990 v SEQ ID NO: 1, za amplifikace 84 bp genomového exonového fragmentu za použití 100 ng genomového DNA templátu, 2 mM $MgCl_2$, 10 pmol každého primeru, 0,5 U Taq polymerasy, 250 μM dNTP pro 30 cyklů 95 °C x 20 sekund, 60 °C x 20 sekund, 72 °C x 5 sekund. Produkty byly inkubovány s přebytkem DdeI po 2 hodiny podle protokolu výrobce a vzniklé restriční fragmenty byly vyšetřovány na 6% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a vizualizovány autoradiografií. Přítomnost mutací byla odvozena ze štěpení 84 bp fragmentu díky přítomnosti DdeI restričního místa. Všichni

postižení členi FAD1 rodokmenu a několik rizikových členů neslo DdeI místo. Nikdo z obligátně nepostižených (těch jedinců, kteří nemají onemocnění a mají věk vyšší než 70 let) a nikdo z normálních kontrol nenesl DdeI mutaci.

Příklad 6

Přítomnost C410Y mutace byla testována za použití alelově specifických nukleotidů. 100 ng genomové DNA bylo amplifikováno za použití primeru exonové sekvence korespondujícího bp 1451 - 1468 SEQ ID NO: 1 a protějščího primeru intronové sekvence korespondujícího komplementárním bp k bp 719 - 699 SEQ ID NO: 14 za použití výše uvedených reakčních podmínek kromě 2,5 mM $MgCl_2$, a podmínek cyklu 94 °C x 20 sekund, 58 °C x 20 sekund, 72 °C x 10 sekund. Vzniklý 216 bp genomový fragment byl denaturován 10-násobným ředěním v 0,4 M NaOH, 25 mM EDTA a byl vakuově "slot-blotován" na dvojité nylonové membrány. Koncově značený primer údivokého typu" (korespondující bp 1468 - 1486 SEQ ID NO: 1) a koncově značený "mutantní" primer (korespondující stejné sekvenci, ale s G->A substitucí v pozici 1477) byly hybridizovány na separátní kopie slot-blotových filtrů v 5 x SSC, 5 x Denhart, 0,5% SDS po 1 hodinu při 48 °C a potom byly promyty následně v 2 x SSC při 23 °C a 2 x SSC, 0,1% SDS při 50 °C a potom exponovány na rentgenovém filmu. Všichni testovatelní postižení členi stejně jako někteří rizikový členi AD3 a NIH2 rodokmenů měli C410Y mutaci. Pokusy o detekci C410Y mutace SSCP odhalil, že společný polymorfismus intronové sekvence migroval se stejnými SSCP vzorky.

Příklad 7

Northern hybridizace demonstrující expresi PS1 proteinové mRNA v různých tkáních

Celková cytoplasmatická RNA byla izolována ze vzorků různých tkání (včetně srdce, mozku, a různých regionů placenty, plic, jater, kosterního svalu, ledvin a slinivky) získaných od chirurgického patologa za použití standartních postupů jako je CsCl purifikace. RNA byla potom elektroforesována na formaldehydovém gelu pro umožnění frakcionace podle velikosti. Byla připravena nitrocelulosová membrána a RNA byla potom transferována na membránu. ^{32}P -značené cDNA proby byly připraveny a přidány na membránu pro hybridizaci mezi probou a RNA. Po promytí byla membrána obalena v plastovém filmu a umístěna do zobrazovacích kazet obsahujících rentgenový film. Autoradiografy byly potom vyvíjeny po jeden až několik dní. Velikost byla stanovena srovnáním se standartními RNA markery. Analýza autoradiografií odhalila prominentní prouže velikosti 3,0 kb (viz obrázek 2 podle Sherrington et al., 1995). Northern bloty demonstrovaly, že PS1 gen je exprimován ve všech vyšetřovaných tkáních.

Příklad 8

Eukaryotické a prokaryotické expresní vektorové systémy

Konstrukty vhodné pro použití v prokaryotických a eukaryotických expresních systémech byly generovány za použití tří různých tříd insertů PS1 nukleotidové cDNA sekvence. V první třídě, nazývané konstrukty plné délky, je celá PS1 DNA sekvence insertována do expresního plasmidu ve správné orientaci a obsahuje jak přirozený 5' UTR, tak 3' UTR sekvence stejně jako

celý otevřený čtecí rámeček. Otevřený čtecí rámeček nese kazetu nukleotidové sekvence, která umožňuje, aby byl buď otevřený čtecí rámeček divokého typu obsažen v expresním systému, nebo alternativně, aby jedna nebo kombinace dvojitých mutací mohla být insertována do otevřeného čtecího rámečku. Toto bylo provedeno odstraněním restričního fragmentu z divokého typu otevřeného čtecího rámečku za použití enzymů *NarI* a *PflmI* a jeho nahrazením podobným fragmentem generovaným reversní transkriptasovou PCR a nesoucím nukleotidovou sekvencí kodující buď M146L mutaci, nebo H163R mutaci. Druhý restriční fragment byl odstraněn z divokého typu normální nukleotidové sekvence pro otevřený čtecí rámeček štěpením enzymy *PfmlI* a *NcoI* a restričním fragmentem nesoucím nukleotidovou sekvencí kodující A246E mutaci, A260V mutaci, A285V mutaci, L286V mutaci, L392V mutaci nebo C410Y mutaci. Třetí varianta, nesoucí kombinaci buď M146L nebo H163R mutací v tandemu s jednou ze zbývajících mutací, byla provedena vazbou *NarI*-*PflmI* fragmentu nesoucího jednu z dříve uvedených mutací a *PflmI*-*NcoI* fragmentu nesoucího jednu z později uvedených mutací.

Druhá třída cDNA insertů, nazývaná zkrácené konstrukty, byla konstruována odstraněním 5' UTR a části 3' UTR sekvence z kompletní sekvence divokého typu nebo mutantní cDNA sekvence. 5' UTR sekvence byla nahrazena syntetickým oligonukleotidem obsahujícím *KpnI* restriční místo (GGTAC/C) a malou sekvencí (GCCACC) pro vytvoření Kozak iniciačního místa okolo ATG v počátku PS1 ORF (bp 249 - 267 SEQ ID NO: 1). 3' UTR byl nahrazen oligonukleotidem korespondujícím komplementu bp 2568 - 2586 SEQ ID NO: 1 s arteficiálním *EcoRI* místem v 5' konci. Mutantní varianty tohoto konstruktu byly potom vytvořeny insercí mutantních sekvencí popsaných výše v *NarI*-*PflmI* a *PsImI*-*NcoI* místech jak bylo popsáno výše.

Třetí třída konstruktů obsahovala sekvence odvozené od klonu cc44, ve kterém alternativní sestřih Exonu 4 vedl k eliminaci čtyřech zbytků v N-konci (SEQ ID NO: 3).

Pro eukaryotickou expresi byly tyto různé cDNA konstrukty nesoucí sekvence divokého a mutantního typu jak byly popsány výše, klonovány do expresního vektoru pZeoSV, ve kterém byla SV60 promotorová kazeta odstraněna restriční trávěním a byla nahrazena CMV promotorovým elementem pcDNA3 (Invitrogen). Pro prokaryotickou expresi byly konstrukty vyrobeny za použití glutathion S-transferasa (GST) fúsního vektoru pGEX-kg. Inserty, které byly připojeny na GST fúsní nukleotidové sekvence jsou stejné nukleotidové sekvence jako byly popsány výše nesoucí buď normální sekvence nukleotidů otevřeného čtecího rámečku, nebo nesoucí kombinace jednotlivých a dvojitých mutací jak bylo popsáno výše. Tyto GST fúsní konstrukty umožňovaly expresi částečného nebo celého proteinu v systémech prokaryotických buněk jako mutantní nebo divoký typ GST fúsních proteinů, což umožňovalo purifikaci kompletního proteinu následovanou odstraněním GST fúsního produktu trávěním trombinem. Další cDNA konstrukty byly vyrobeny s GST fúsním vektorem pro umožnění produkce aminokyselinové sekvence korespondující hydrofilní acidické smyčkové doméně mezi TM6 a TM7 úplného proteinu, buď jako divoký typ nukleotidové sekvence nebo jako mutantní sekvence nesoucí buď A285V mutaci, L286V mutaci nebo L392V mutaci. Toto bylo provedeno odebráním sekvencí divokého nebo mutantního typu z vhodných zdrojů RNA za použití 5' oligonukleotidového primeru korespondujícího bp 1044 - 1061 SEQ ID NO: 1 s 5' BamHI restričním místem (G/GATCC), a 3' primeru korespondujícího komplementu bp 1476 - 1458 SEQ ID NO: 1 s 5' EcoRI restričním místem (G/AATTC). Toto umožnilo klonování vhodné nukleotidové

sekvence mutantního nebo divokého typu korespondující hydrofilní acidické smyčkové doméně v BamHI a EcoRI místech v pGEX-KG vektoru.

Příklad 9

Lokalizace dalších mutací v PS1 genu

Mutace v PS1 genu mohou být testovány mnoha strategiemi (přímé sekvencování nukleotidů, alelově specifickými oligonukleotidy, ligační polymerasovou řetězovou reakcí, SSCP, RFLP) za použití RT-PCRproduktů reprezentujících zralé mRNA/cDNA sekvence nebo genomovou DNA. Pro A260V a A285V mutace může být genomová DNA nesoucí exon amplifikována za použití stejných PCR primerů a metod jako pro L286V mutaci.

PCR produkty byly potom denaturovány a "slot-blotovány" na dvojité nylonové membrány za použití slot blot protokolu pro C410Y mutaci.

A260V mutace byla odečítána na těchto blotech za použití hybridizace koncově značených alelově specifických oligonukleotidů korespondujících divokému typu sekvence (bp 1017 - 1036 SEQ ID NO: 1) nebo mutantní sekvenci (bp 1017 - 1036 SEQ ID NO: 1 s C->T v bp 1027) hybridizací při 48 °C po které následovalo promytí při 52 °C v 3x SSC pufru obsahujícím 0,1% SDS. A285V mutace byla odečítána na těchto slot blotech jak bylo uvedeno výše, kromě použití alelově specifických oligonukleotidů pro divoký typ sekvence (bp 1093 - 1111 SEQ ID NO: 1) nebo mutantního primeru (bp 1093 - 1111 SEQ ID NO: 1 s C->T v bp 1102) při 48 °C jak bylo uvedeno výše, kromě toho, že promývací roztok

byl 2x SSC.

L392V mutace byla odečítána amplifikací exonu z genomové DNA za použití primerů (5' korespondujících bp 439 - 456 SEQ ID NO: 14 a 3' komplementárních k 719 - 699 SEQ ID NO: 14) za použití standartních PCR pufrovacích podmínek kromě toho, že koncentrace hořčíku byla 2 mM a podmínky cykluy byly 94 °C x 10 sekund, 56 °C x 20 sekund a 72 °C x 10 sekund. Vzniklý genomový fragment o 200 párech bazí byl denaturován jak je popsáno pro C410Y mutaci a slot-blotován na dvojité nylonové membrány. Přítomnost nebo absence mutace byla potom odečítána podle různé hybridizace s buď divokým typem koncově značeného oligonukleotidu (bp 1413 - 1431 SEQ ID NO: 1) nebo s koncově značeným mutantním primerem (bp 1413 - 1431 SEQ ID NO: 1 s C->G v bp 1422) hybridizací při 45 °C a potom následným promytím v 2x SSC při 23 °C a potom při 68 °C.

Příklad 10

Produkce protilátek

Peptidové antigeny korespondující částem ps1 proteinu byly syntetizovány technikou pevné fáze a byly purifikovány reversní fází vysokotlaké kapalinové chromatografie. Peptidy byly kovalentně vázány na "keyhole" přílipkový hemocyanin (KLH) cestou disulfidové vazby, což umožnilo přidání cysteinového zbytku C-konec peptidu presenilinového fragmentu. Tento další zbytek nebyl v proteinové sekvenci normální a byl obsažen pouze pro usnadnění vazby na KLH molekulu. Specifické presenilinové sekvence, proti kterým byly protilátky namířeny, jsou následující:

Polyklonální protilátka č. hPS1 antigen (SEQ ID NO: 2)

1142	30 - 44
519	109 - 123
520	304 - 318
1143	346 - 360

Tyto sekvence jsou obsaženy ve specifických doménách PS1 proteinu. Například, zbytky 30 - 44 jsou v N-konci, zbytky 109 - 123 jsou v TM1->2 smyčce a zbytky 304 - 318 a 346 - 360 jsou ve velké TM6->7 smyčce. Každá z těchto domén je vystavena do vodné media a může být zahrnuta ve vazbě na jiné proteiny zásadní pro vývoj fenotypu onemocnění. Volba peptidů byla založena na analýze proteinové sekvence za použití IBI Pustell algoritmu předpokládané antigenicity.

Celkem tři Novozélandští bílí králíci byly imunizováni peptid-KLH komplexy pro každý peptidový antigen v kombinaci s Freundovým adjuvans a byly jim následně podány dosycovací injekce v sedmidenních intervalech. Antiserum bylo odebráno pro každý peptid a bylo poolováno a IgG byl precipitován se síranem amonným. Protilátky byly potom afinitně purifikovány se Sulfo-link agarosou (Pierce) navázanou na vhodný peptid. Tato konečná purifikace je vyžadována pro odstranění nespecifických interakcí jiných protilátek přítomných v buď pre- nebo post-imunitním séru.

Specifita každé protilátky byla potvrzena třemi testy. Za prvé, každá detekovala eden predominantní proužek přibližné velikosti předpokládané pro presenilin-1 na Western blotech

mozkového homogenátu. Za druhé, každá zkříženě reagovala s rekombinantními fúsními proteiny nesoucími vhodné sekvence. Za třetí, každá může být specificky blokována pre-absorpcí s rekombinantním PS1 nebo imunizujícím peptidem.

Kromě toho, dva různé PS1 peptid glutathion S-transferasa (GST) fúsní proteiny byly použity pro generování PS1 protilátek. První fúsní protein obsahoval aminokyseliny 1 - 81 (N-konec) PS1 fúsované na GST. Druhý fúsní protein obsahoval aminokyseliny 266 - 410 (TM6->7 smyčková doména) PS1 fúsované na GST. Konstrukty kodující tyto fúsní proteiny byly generovány insercí vhodných nukleotidových sekvencí do pGEX-2T expresního plasmidu (Amrad). Vzniklé konstrukty obsahovaly sekvence kodující GST a místo pro trombin sensitive štěpení mezi GST a PS1 peptidem. Expresní konstrukty byly transfektovány do DH5 α E. coli a exprese fúsních proteinů byla indukována za použití IPTG. Bakteriální pelety byly lyzovány a solubilní GST-fúsní proteiny byly purifikovány jedнокrokovou afinitní chromatografií na glutathion sepharosových korálcích (Boehringer Mannheim, Montreal). GST fúsní proteiny byly použity pro imunizaci myši pro generování monoklonálních protilátek za použití standardních postupů. Klony získané od těchto myši byly vyšetřovány s purifikovanými fragmenty presenilinů.

Kromě toho, GST fúsní proteiny byly štěpeny trombinem pro uvolnění PS1 peptidu. Uvolněné peptidy byly purifikovány HPLC s vylučováním podle velikosti a použity pro imunizaci králíků pro generování polyklonálního antiséra.

Podobnými metodami byly vyrobeny GST fúsní proteiny za použití konstruktů obsahujících nukleotidové sekvence pro aminokyseliny

1 - 87 (N konec) nebo 272 až 390 (TM6->TM7 smyčka) presenilinu-2 a byly použity pro generování monoklonálních protilátek k tomuto proteinu. PS2-GST fúsní proteiny byly také štěpeny thrombinem a uvolněné, purifikované peptidy byly použity pro imunizaci králíků pro přípravu polyklonálního antiséra.

Příklad 11

Identifikace mutací v PS2 genu

RT-PCR produkty korespondující PS2 ORF byly generovány z RNA lymfoblastů nebo zmražené mrtvé mozkové tkáně za použití prvního páru oligonukleotidových primerů s 5' primerem korespondujícím bp 478 - 496 SEQ ID NO: 18 a 3' primerem komplementárním k bp 1366 - 1348 SEQ ID NO: 18, za vzniku 888 bp produktu, a s druhým párem primerů s 5' primerem korespondujícím bp 1083 - 1102 SEQ ID NO: 18 a 3' primerem komplementárním k bp 1909 - 1892 SEQ ID NO: 18, za vzniku 826 bp produktu. PCR byla provedena za použití 250 mMol dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 10 pMol oligonukleotidů v 10 ml za cyklování 40 cyklů o 94 °C x 20 sekund, 58 °C x 20 sekund, 72 °C x 45 sekund. PCR produkty byly sekvencovány automatizovaným cyklickým sekvencováním (ABI, Foster City, CA) a fluorescentní chromatogramy byly snímány na heterozygotní nukleotidovou substituci přímou inspekcí a pomocí Factura (ver 1.2.0) a Sequence Navigator (ver 1.0.1b15) softwerových balíčků (data nejsou ukázána).

Detekce N141I mutace: A->T substituce v nukleotidu 787 vytvořila BclI restriční místo. Exon nesoucí tuto mutaci byl amplifikován ze 100 ng genomové DNA za použití 10 pMol každého z oligonukleotidů korespondujících bp 733 - 751 SEQ ID NO: 18

(koncově značený) a komplementu bp 846 - 829 SEQ ID NO: 18 (neznačený) a podmínek PCR reakce podobných podmínkám popsáným dále pro M239V mutaci. 2 ml PCR produktu byly restrihovány BclI (NEBL, Beverly, MA) v 10 ml reakčního objemu podle protokolu výrobce a produkty byly vyšetřovány nedenaturační polyakrylamidovou gelovou elektroforesou. U subjektů s divokým typem sekvencí je 114 bp PCR produkt štěpen na 68 bp a 46 bp fragmenty. Mutantní sekvence způsobují, že je produkt štěpen na 53 bp, 46 bp a 15 bp.

Detekce M239V mutace: A->G substituce v nukleotidu 1080 deletuje NlaIII restriční místo, což umožňuje, že M239V mutace je detekována amplifikací ze 100 ng genomové DNA za použití 10 pMol každého z oligonukleotidů korespondujících p 1009 - 1026 SEQ ID NO: 18 a komplementu bp 1118 - 1101 SEQ ID NO: 18. PCR podmínky byly: 0,5 U Taq polymerasy, 250 mM dNTPS, 1 mCi α^{32} P-dCTP, 1,5 mM $MgCl_2$, objem 10 ml; 30 cyklů o 94 °C x 30 sekund, 72 °C x 20 sekund, 72 °C x 20 sekund, za generování produktu o 110 bp. 2 ml PCR reakce byly ředěny do 10 ml a restrihovány 3 U NlaIII (NebL, beverly, MA) po 3 hodiny. Restriční produkty byly vyšetřovány nedenaturační polyakrylamidovou gelovou elektroforesou a vizualizovány autoradiografií. Normální subjekty vykazovaly štěpení produktů o 55, 35, 15 a 6 bp, zatímco mutantní sekvence dávaly fragmenty o 55, 50 a 6 bp.

Detekce I420T mutace: Podobně jako ve výše popsané proceduře může být I420T mutace vyšetřována na PCR amplifikaci genomové DNA za použití primerů korespondujících bp 1576 - 1593 SEQ ID NO: 18 a komplementu bp 1721 - 1701 SEQ ID NO: 18 za generování produktu o 146 párech bazí. Tento produkt může potom být probován alelově

specifickými oligonukleotidy pro divoký typ (např. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18) a mutantní (např. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18 s T->C substitucí v bp 1624) sekvence.

Příklad 12

Transgení myši

Serie PS1 a PS2 genů divokého a mutantního typu byly konstruovány pro použití v přípravě transgeních myší. Mutantní verze PS1 a PS2 byly generovány místně řízenou mutagenesí klonované cDNA cc33 (PS1) a cc32 (PS2) za použití standartních technik.

cDNA cc33 a cc32 a jejich mutantní verze byly použity pro přípravu dvou tříd PS1 a PS2 cDNA - mutantní a divokého typu, jak je popsáno v příkladu 8. První třída, označovaná jako "kompletní" cDNA, byla připravena odstraněním přibližně 200 bp 3' netranslatovaného regionu ihned po poly a místě trávením EcoRI (PS1) a PvuII (PS2). Druhá třída, označovaná jako "zkrácená" cDNA, byla připravena nahrazením 5' netranslatovaného regionu vazebným místem pro ribosom (Kozak konsensuální sekvencí) umístěnou ihned 5' k ATG start kodonu.

Různé kompletní a zkrácené PS1 a PS2 cDNA divokého a mutantního typu, připravené jak bylo popsáno výše, byly zavedeny do jednoho nebo více z následujících vektorů a vzniklé konstrukty byly použity jako zdroj genů pro produkci transgeních myší.

cos.TET expresní vektor:

Tento vektor byl odvozen od kosmidového klonu obsahujícího PrP gen syrského křečka. Podrobně ho popsal Scott et al. (1992) a Hsiao et al., (1995). PS1 a PS2 cDNA (kompletní nebo zkrácené) byly insertovány do tohoto vektoru v jeho SalI místě. Konečné konstrukty obsahovaly 20 kb 5' sekvenční sousedící s insertovanou cDNA. Tato 5' sousedící sekvenční obsahovala PrP genový promotor, 50 bp PrP genového 5' netranslatovaného exonu, sestřihové donor místo, 1 kb intron, a sestřihové akceptorové místo umístěné ihned sousedně k SalI místu, do kterého byla PS1 nebo PS2 cDNA insertována. 3' sekvenční sousedící s insertovanou DNA obsahovala přibližně 8 kb segment PrP 3' netranslatovaného regionu obsahujícího polyadenylační signál. Trávení tohoto konstruktu NotI (PS1) nebo FseI (PS2) uvolnilo fragment obsahující mutantní nebo divoký typ PS genu pod kontrolou PrP promotoru. Uvolněný fragment byl purifikován na gelu a injikován do pronukleolu fertilizovaného myšího vajíčka za použití metody popsané Hsiao et al., (1995).

Konstrukty β -podjednotky receptoru pro růstový faktor odvozený od destiček.

PS cDNA byly také zavedeny mezi SalI (kompletní PS1 cDNA) nebo HindIII (zkrácená PS1 cDNA, kompletní PS2 cDNA a zkrácená PS2 cDNA) ve 3' konci lidského promotoru β -podjednotky receptoru pro růstový faktor odvozený od destiček a EcoRI místo v 5' konci SV40 poly A sekvenční a celá kazeta byla klonována do pZeoSV vektoru (Invitrogen, San Diego, CA). Fragmenty uvolněné ScaI/BamHI trávením byly purifikovány na gelu a injikovány do pronukleolu fertilizovaného myšího vajíčka za použití metody, kterou popsal Hsiao et al., (1995).

Konstrukty lidského β -aktinu

PS1 a PS2 cDNA byly insertovány do SalI místa pBACGH. Konstrukt produkovaný touto insercí obsahoval 3,4 kb lidské β aktinové 5' sousední sekvence (lidský β aktinový promotor, sestřižený 78 bp lidský β aktinový 5' netranslatovaný exon a intron) a PS1 a PS2 insert následovaný 2,2 kb genomové sekvence lidského růstového hormonu obsahujícího několik intronů a exonů, stejně jako polyadenylační signál. SfiI byl použit pro uvolnění PS-obsahujícího fragmentu, který byl purifikován na gelu a injikován do pronukleolu fertilizovaného myšího vajíčka za použití metody, kterou popsal Hsiao et al., (1995).

Konstrukty fosfoglycerát kinasy:

PS1 a PS2 cDNA byly insertovány do pkJ90 vektoru. cDNA byla insertována mezi KpnI místo downstream od promotoru lidské fosfoglycerát kinasy a XbaI místa upstream od 3' netranslatovaného regionu lidského genu pro fosfoglycerát kinasu. PvuII/HindIII (PS1 cDNA) nebo PvuII (PS2 cDNA) trávení bylo použito pro uvolnění PS-obsahujícího fragmentu, který byl purifikován na gelu a injikován do pronukleolu fertilizovaného myšího vajíčka za použití metody popsané výše.

Příklad 13

Exprese rekombinantního PS1 a PS2 v eukaryotických buňkách

Rekombinantní PS1 a PS2 byly exprimovány v mnoha typech buněk (např. PC12, neuroblastomových, ovariálních čínského křečka, a

lidských embryonálních ledviných 293 buňkách) za použití pcDNA 3 vektoru (Invitrogen, San Diego, CA). PS1 a PS2 cDNA insertované do tohoto vektoru byly stejné kompletní a zkrácené cDNA jako byly popsány v příkladu 8.

Tyto cDNA byly insertovány mezi CMV promotor a polyadenylační místo hovězího růstového hormonu pcDNA3. Transgeny byly exprivovány ve vysokých hladinách.

Kromě toho, PS1 a PS2 byly exprivovány v COS buňkách za použití pCMX vektoru. Pro usnadnění zapojení a rozpoznání intracelulární lokalizace presenilinových proteinů byly oligonukleotidy kodující sekvenci o 11 aminokyselinách odvozenou od lidského c-myc antigenu (viz např. Evan et al., 1985) a rozpoznávané monoklonální anti-myc protilátkou MYC-1-9E10.2 (produkt CRL 1729, ATCC, Rockville, Md.) ligovány v rámečku buď ihned před nebo ihned po otevření čtecím rámečku PS1 a PS2 cDNA. Byly také připraveny nezapojené pCMX konstrukty. c-myc spojené konstrukty byly také zavedeny do pcDNA3 pro transfekci v CHO buňkách.

Transientní a stabilní transfekce těchto konstruktů byla dosažena za použití Lipofectaminu (Gibco/BRL) podle návodu výrobce. Kultury byly testovány na transientní expresi po 48 hodinách. Stabilně transfektované linie byly selektovány za použití 0,5 mg/ml Geneticinu (Gibco/BRL).

Expres transfektovaných PS proteinů byla testována Western blottingem za použití anti-presenilinových protilátek 1142, 519 a 520 popsaných výše. Stručně, kultivované transfektované buňky byly solubilizovány (2% SDS, 5 mM EDTA, 1 mg/ml leupeptin a

aprotinin) a koncentrace proteinu byla určena podle Lowry. Proteiny byly separovány na sds_PAGE gradientových gelech (4-20% Novex) a byly transferovány na PVDF (10 mM CAPS) po 2 hodiny při konstantním napětí (50 V). Nespecifická vazba byla blokována odstředěným mlékem (5%) po 1 hodinu. Proteiny byly potom probovány dvěma králičími polyklonálními protilátkami (1 mg/ml v TBS, pH 7,4) po 12 hodin. Presenilin zkříženě reaktivní druhy byly identifikovány za použití biotinylované kozí anti-králičí sekundární protilátky, která byla vizualizována za použití křenová peroxidasa-konjugované streptavidin terciární, 4-chloro-naftolu a peroxidu vodíku. S c-myc spojené presenilinové peptidy byly testovány Western blottingem za použití obou anti-presenilinových protilátek popsaných výše (pro detekci presenilinového peptidového antigenu), a supernatantu kultury z hybridomu MYC 1-9E10.2 ředěného 1:10 pro Western bloty a 1:3 pro imunocytochemii (pro detekci myc-epitopu). Byl identifikován hlavní proužek imunoreaktivity o 50 - 60 kDa každou různých presenilinových protilátek a protilátkami pro myc-epitop (pro buněčné linie transfektované myc-obsahujícími plasmidy).

Některými presenilinovými protilátkami byly identifikovány menší proužky o asi 10 - 19 kDa a asi 70 kDa.

Pro imunocytochemii byly transfektované buňky fixovány 4% formaldehydem v Tris pufovaném salinickém roztoku (TBS), byly extensivně promyty TBS plus 0,1% triton a nespecificky blokovány 3% BSA. Fixované buňky byly probovány presenilinovými protilátkami (např. protilátkami 520 a 1142, výše; typicky 5 - 10 mg/ml), promyty a vizualizovány FITC- nebo rhodamin- konjugovanou ozí nebo králičí sekundární protilátkou. Pro c-myc připojené presenilinové konstrukty byl použit hybridomní MYC 1 - 9E10.2 supernatant ředěný 1:3 spolu s anti-myší sekundární protilátkou.

Slidy byly umístěny v 90% glycerolu s 0,1% fenylendiaminem (ICN) pro zachování fluorescence. Anti-BIP (nebo anti-calnexin) StressGen, Victoria, B.C.) a aglutinin pšeničných klíčků (EY Labs, San Mateo, CA) byly použity jako markery endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, v příslušném pořadí. Dvojitě imunoznačení bylo také provedeno anti-actinem (Sigma, St. Louis, Mo.), anti-amyloid prekursorový protein (22C11, boehringer Mannheim) a anti-neurofilamenta (NF-M specifické, Sigma) v neuronální linii NSC34. Tyto imunofluorescenční studie demonstrovaly, že produkt transfekce je rozsáhle distribuován v buňce, s určitým zvýrazněním perinukleární lokalizace naznačujícím endoplasmatické reticulum a Golgiho aparát, které je podobné jako u netransfektovaných buněk, ale výraznější, někdy přesahující přes adernou membránu. Ko-imunolokalizace c-myc a S epitopů byla pozorována u CHO a COS buněk transientně transfektovaných myc-připojenými presenilinovými konstrukty. Robustní exprese transfektovaného presenilinového genu v transfektovaných buňkách byla tak prokázána imunocytochemií, Northern blotem, Western bloty (za použití protilátek k presenilinům jak byly popsány výše a za použití monoklonální protilátky MYC 1-9E10.2 pro myc připojení v konstruktech s 3' nebo 5' c-myc přípojkách).

Příklad 14

Izolace presenilinových vazebných proteinů afinitní chromatografií

Pro identifikaci proteinů, které mohou být zahrnuty v biochemické funkci presenilinů byly PS1 vazebné proteiny izolovány za použití afinitní chromatografie. GST fúzní protein

obsahující PS1 TM6->7 smyčku, připravený jak je popsáno v příkladu 8, byl použit k probování lidských mozkových extraktů, připravených homogenizací lidské mozkové tkáně na Polytronu ve fyziologickém roztoku. Nespecifická vazba byla eliminována předčištěním mozkových homogenátů endogenních GST vazebných složek inkubací s glutathion-Sepharosovými korálky. GST prosté homogenáty byly potom inkubovány s GST fúsními proteiny za produkce požadovaných komplexů s funkčními vazebnými proteiny. Tyto komplexy byly potom odebrány za použití afinitních glutathion-Sepharosových korálek. Po extensivním promytí fosfátem pufrovaným salinickým roztokem byl izolovaný soubor proteinů separován SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforesou (SDS-PAGE; Tris-tricin gradientový gel 4 - 20%). Byly pozorovány dva hlavní proužky v 14 a 20 kD spolu s několika slabšími proužky od 50 do 60 kD.

Farmakologická modifikace interakcí mezi těmito proteiny a TM6->7 smyčkou může být využita v léčbě Alzheimerovy choroby. Kromě toho, tyto proteiny, které pravděpodobně účinkují v presenilinové biochemické dráze, mohou být novými místy mutací způsobujících Alzheimerovu chorobu.

Příklad 15

Izolace presenilinových vazebných proteinů dvouhybridovým kvasinkovým systémem

Pro identifikaci proteinů interagujících s presenilinovými proteiny byl generován kvasinkový expresní plasmidový vektor (pAS-1, Clontech) ligací v rámečku částečné cDNA sekvence kodující buď zbytky 266 - 409 PS1 proteinu nebo zbytky 272 - 390

PS2 proteinu do EcoRI a BamHI míst vektoru. Vzniklý fúsní protein obsahoval GAL4 DNA vazebnou doménu navázanou v rámečku buď na TM6->7 smyčku PS1 proteinu nebo na TM6->7 smyčku PS2 proteinu. Tyto expresní plasmidy byly kotransformovány, spolu s purifikovanou plasmidovou DNA z lidské mozkové cDNA:pACT knihovny, do kvasinek za použití protokolu Clontech Matchmaker kvasinkového dvouhybridového kitu (Clontech). Kvasinkové klony nesoucí lidskou mozkovou cDNA interagující s TM6->7 smyčkovou doménou byly selektovány HIS resistencí a β gal+ aktivací. Klony byly dále selektovány sensitivitou na cyklohexamin a inserty lidských mozkových cDNA byly izolovány PCR a sekvencovány. Ze 6 milionů počátečních transformantů bylo získáno 200 pozitivních konů po HIS selekci a 42 po β gal+ barevné selekci, provedených podle návodu výrobce pro selekci pozitivních kolonií. Z těchto 42 klonů bylo několik (5 - 8) nezávislých klonů reprezentujících stejné geny. Toto ukazuje, že tyto interakce jsou biologicky reálné a reprodukovatelné.

Příklad 16

Transgení *C. elegans*

Transgení *C. elegans* byly získány mikroinjikováním oocytů. Vektory pPD49.3 hsp 16 - 41 a pPD49.78 hsp 16 - 2 byly vybrány pro tento účel. Za použití prvního z těchto vektorů byly produkovány transgení *C. elegans*, ve kterých byl zaveden normální hPS1 gen nebo mutantní gen (L392V). Transformovaná zvířata byla detekována testováním exprese lidské cDNA na northern blotech nebo na western blotech za použití lidské cDNA proby cc32 a protilátek 519, 520 a 1142, jak je popsáno výše. Byly také připraveny a/nebo injikovány vektory nesoucí cis dvojité mutanty

hPS1 genu (M146L a L392V), normální hPS2 gen a mutantní (N141I) hPS2 gen.

Příklad 17

Klonování Drosophilího homologu pro presenilin, DmPS

Redundantní oligonukleotidy 5'ctn ccn gar tgg acn gyc tgg (SEQ ID NO: 22) a 5' rca ngc (agt)at ngd ngd rtt cca (SEQ ID NO: 23) byly projektovány z publikovaných dat nukleotidové sekvence pro vysoce konzervované regiony presenilin/sel-12 proteinů končících/začínajících Trp (např. zbytky Trp247 a Trp404 v PS1; Trp253 a Trp385 v PS2). Tyto primery byly použity pro RT-PCR (50 ml objem, 2 mM MgCl₂, 30 cyklů 94 °C x 30'', 57 °C x 20'', 72 °C x 20'') z mRNA od dospělých a embryonálních *D. melanogaster*. Produkty byly potom reamplifikovány za použití podmíne cyklu 94 °C x 1', 59 °C x 0,5' a 72 °C x 1' a vnitřního konzervovaného redundantního primeru 5' ttt ttt ctc gag acn gcn gar gar aga aay ga (SEQ ID NO: 24) a 5' ttt ttt gga tcc tar aa(agt) atr aar tcn cc (SEQ ID NO: 25). 600 bp produkt byl klonován do BamHI a XhoI míst pBS. tyto produkty byly sekvencovány a ukázalo se, že obsahují otevřený čtecí rámeček s putativní aminokyselinovou sekvencí vysoce homologní k sekvenci presenilinů. Tyto fragmenty byly potom použity pro vyšetření konvenční *D. melanogaster* cDNA/Zap knihovny (Stratagene, CA) pro získání šesti nezávislých cDNA klonů velikosti 2 - 2,5 kb (klony pds8, pds13, pds3, pds7 a pds14), které byly sekvencovány. Nejdelší ORF kodoval polypeptid o 541 aminokyselinách s 52% identitou k lidským presenilinům.

Příklad 18

Testy pro dlouhé izoformy A β peptidů

A β peptidy byly extrahovány 99% kyselinou mravenčí po dobu 60 minut (20 °C) ze zmrazené mozkové kůry histopatologicky potvrzených případů FAD s PS1 nebo β APP₇₁₇ mutacemi; sporadických případů AD bez pozitivní rodinné anamnesy choroby; jých neurodegenerativních onemocnění s nástupem v dospělosti (HD = Huntingtonova chorea; ALS = Amyotrofická laterální sklerosa); Downova syndromu; a kontrolních subjektů bez neurologických symptomů. po centrifugaci při 200000 x g po 20 minut byl supernatant separován z pelet, ředěn, neutralizován a vyšetřován ELISA. Pro kvantifikaci různých druhů A β byly použity čtyři monoklonální protilátky. Protilátka BNT-77 (která detekuje epitopy z centra A β) a protilátka BAN-50 (která detekuje N-terminální zbytky) byly použity pro prvotní vazbu všech typů A β včetně heterologních forem s nebo bez N-terminálního zkrácení (BNT-77) nebo pouze bez N-terminálního zkrácení (BAN-50). Dvě další monoklonální protilátky, které specificky detekují krátké A β končící ve zbytku 40 (protilátka BA-27) nebo dlouhé A β končící ve zbytku 42/43 (protilátka BC-05) byly potom použity pro odlišení různých C-terminálních forem A β . Dvumístná ELISA byla provedena jak bylo již popsáno (Tamaoka et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Stručně, 100 μ g standartních peptidů nebo supernatantů z mozkové tkáně bylo aplikováno na mikroplotnu potaženou BNT-77 protilátkou, inkubováno při 4 °C po 2 hodin, promyto fosfátem pufrovaným salinickým roztokem a potom inkubováno s HRP-značenou BA-27 a BC-05 protilátkou při 4 °C po 24 hodin. HRP aktivity byly testovány vývojem barvy za použití TNB mikrojamkového

peroxidasového systému jak bylo popsáno dříve. Kortikální A β hladiny byly porovnávány mezi diagnostikovanými skupinami za použití párových Student-t testů. Společné hodnocení dat všech A β izoform, za použití Student-Newman-Keuls průměrů testů ukázalo, že A β 1-42 hladiny od β APP₇₁₇ a sporadických AD subjektů byly odlišné od případů PS1 mutace, ale že byly podobné jako u kontrol. Oproti tomu, tři skupiny byly odlišitelné, když byly srovnávány A β x-42 hladiny: vysoká (PS1 a β APP₇₁₇ AD), střední (sporadická AD) a nízká (kontrola).

Přesněji, měření koncentrace různých A β izoform v mozkové kůře 14 kontrolních subjektů, včetně pěti subjektů s jinými neurodegenerativními onemocněními s nástupem ve čtvrté a páté dekádě života ukázalo pouze nízké koncentrace jak krátkých A β (A β 1-40: $0,06 \pm 0,02$ nMol/g čerstvé tkáně $\pm$ SEM; A β x-40: $0,17 \pm 0,40$) a dlouhých A β (A β 1-42/43: $0,35 \pm 0,17$; A β x-42/43: $1,17 \pm 0,80$). Oproti tomu, A β peptidy s dlouhým koncem byly signifikantně elevovány v mozkové kůře všech čtyřech subjektů s PS1 mutací (A β 1-42/43: $6,54 \pm 2,00$, $p = 0,05$; A β x-42/43: $23,91 \pm 4,00$, $p > 0,01$). Podobná zvýšení v koncentracích A β peptidů byla detekována v kůře obou subjektů s β APP₇₁₇ mutacemi (A β 1-42/43: $2,03 \pm 1,04$; A β x-42/43: $25,15 \pm 5,74$) a subjektů se sporadickou AD (A β 1-42/43: $1,21 \pm 0,40$, $p = 0,008$; A β x-42/43: $14,45 \pm 2,81$, $p = 0,001$). U subjektů s PS1 nebo β APP₇₁₇ mutacemi bylo toto zvýšení dlouhých izoform A β spojeno s malým, ale ne-signifikantním zvýšením krátkých A β izoform (např. A β x-40: $3,08 \pm 1,31$ u PS1 mutantů; $1,56 \pm 0,07$ u β APP₇₁₇ mutantů). Tak poměr dlouhých a krátkých izoform byl také signifikantně zvýšen. Nicméně, u sporadických AD bylo pozorované zvýšení dlouhých A β typicky spojeno s mnohem vyšším zvýšením krátkých A β izoform (A β 1-40: $3,92 \pm 1,42$; A β x-40: $16,60 \pm 5,88$). Toto zvýšení

krátkých Aß bylo statisticky signifikantní ve srovnání s kontrolami ($p > 0,03$ pro oba Aß1-40 a Aßx-40), ale bylo hraničně statisticky signifikantní ve srovnání s PS1 a ŠAPP₇₁₇ případy ($p_{0,05}$). Analýza korových vzorků od dospělých jedinců s Downovým syndromem odhalila vzorky podobné těm, které byly pozorovány pro sporadickou AD.

Ačkoliv preferovaná provedení zde byla popsána podrobně bude odborníkům jasné, že mohou být provedeny variace k těmto provedením bez překročení rozsahu myšlenky vynálezu a bez narušení rozsahu připojených nároků.

Tabulka 1

element	umístění	element	umístění	
STAT1 (GAS)	34-46	611-619	CAT box	895-900
	278-286	631-639		975-982
	431-439	1582-1590	TATA box	925-933
	443-451	1965-1973		978-988
	495-503	2125-2133	TFIID	578-581
	533-541			982-985
STAT3	36-43	737-744	TRXN (CAP) start	1002-1007
	124-131	811-898		1038-1043
	429-436	1063-1070	GC box (SP1)	1453-1460
	496-503	1686-1693		1454-1452
	533-540	1966-1973	AP2, AP2-like	numerous occurrences
	537-544	2104-2111		throughout sequence
	632-639	2407-2414	NFIL6	611-620 1567-1576
MED1, MED1-like	1121-1126	1235-1240		890-899 1945-1954
	1126-1131	1716-1721		1062-1071

Tabulka 2

PS1 doména	přibližná pozice
N-terminus	1-81
TM1	82-100
TM1→2	101-132
TM2	133-154
TM2→3	155-163
TM3	164-183
TM3→4	184-194
TM4	195-212
TM4→5	213-220
TM5	221-238
TM5→6	239-243
TM6	244-262
TM6→7	263-407
TM7	408-428
C-terminus	429-467

Tabulka 3

PS2 doména

přibližná pozice

N-terminus	1-87
TM1	88-106
TM1→2	107-134
TM2	135-160
TM2→3	161-169
TM3	170-189
TM3→4	190-200
TM4	201-218
TM4→5	219-224
TM5	225-244
TM5→6	245-249
TM6	250-268
TM6→7	269-387
TM7	388-409
C-terminus	410-448

Tabulka 4

	Pozice v SEQ ID NO:1	Nukleotidová změna	Aminokyselinová změna	Funkční doména	Věk nástupu FAD
	SEQ ID NO:1				FAD
1.	NA	NA	A79?	N-terminus	64
2.	492	G→C	V82L	TM1	55
3.	NA	NA	V96F	TM1	NA
45	591	T→C	Y115H	TM1→2	37
5.	664	T→C	M139T	TM2	49
6.	NA	NA	M139V	TM2	40
7.	676	T→C	I143T	TM2	35
8.	684	A→C	M146L	TM2	45
90	NA	NA	M146V	TM2	38
10.	736	A→G	H163R	TM2→3	50
11.	NA	NA	H163Y	TM2→3	47
12.	NA	NA	L171P	TM3	35
13.	NA	NA	G209V	TM4	NA
1145.	NA	NA	I211T	TM4	NA
15.	939	G→A	A231T	TM5	52
16.	985	C→A	A246E	TM6	55
17.	1027	C→T	A260V	TM6	40
18.	NA	NA	C263R	TM6→7	47
120.	1039	C→T	P264L	TM6→7	45
20.	NA	NA	P267S	TM6→7	35
21.	NA	NA	E280A	TM6→7	47
22.	NA	NA	E280G	TM6→7	42
23.	1102	C→T	A285V	TM6→7	50
225.	1104	C→G	L286V	TM6→7	50
25.	NA	deletion	Δ291-319	TM6→7	NA
26.	1399	G→C	G384A	TM6→7	35
27.	1422	C→G	L392V	TM6→7	25-40
28.	1477	G→A	C410Y	TM7	48

Tabulka 5

	Pozice v SEQ ID NO:18	Nukleotidová změna	Aminokyselinová změna	Funkční doména	Věk nástupu FAD
1.	787	A→T	N141I	TM2	50-65
2.	1080	A→G	M239V	TM5	50-70
3.	1624	T→C	I420T	C-terminus	45

5

Tabulka 6

28-61	302-310
65-71	311-325
109-112	332-342
120-122	346-359
218-221	372-382
241-243	400-410
267-269	

Tabulka 7

25-45	282-290
50-63	310-314
70-75	321-338
114-120	345-352
127-132	380-390
162-167	430-435
221-226	

Odkazy:

- Albertsen et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:4256-4260.
- Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Bellamne-Chartelot et al. (1992) Cell 70:1059-1068.
- Bergamini et al. (1991) Acta Neurol. 13:534-538.
- Brand and Perrimon (1993) Development 118:401-415.
- Bueler et al. (1996) Nature 356:577-582.
- Campion et al., (1995) Hum. Molec. Genet. 4:2373-2377.
- Campos-Ortega and Jan (1991) Ann. Rev. Neurosci. 14:399.
- Canadian Patent Application No. 2,096,911
- Canadian Patent Application No. 2,071,105
- Chartier-Harlin et al. (1991) Nature 353:844-846.
- Chumakov et al. (1992) Nature 359:380-387.
- Cruts et al. (1995) Hum. Molec. Genet. 4:2363-2371.
- Davis (1996) Physiol. Reviews (in press).
- Evan et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3610-3616.
- Fischer and Lerman (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80:1579-1583.
- Foncin et al. (1985) Rev. Neurol. (Paris) 141:194-202.
- Frommelt et al. (1991) Alzheimer Dis. Assoc. Disorders 5:36-43.
- Games et al. (1995) Nature 373:523-527.
- Gandy et al. (1993)
- Gavrieli et al. (1992) J. Cell Biol. 119:493-501.
- Goate et al. (1991) Nature 349:704-706.
- Goudsmit et al. (1981) J. Neurol. Sci. 49:79-87.
- Gravina et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:7013-7016.
- Gyapay et al. (1994) Nature Genetics 7:246-339.
- Hilbich et al. (1991) J. Mol. Biol. 218:149-163.
- Hogan et al. (1986) Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor, New York.
- Hsiao et al. (1995) Neuron. (in press).
- Huang and Chalfie (1994)
- Huang et al. (1993)
- Ince and Scotto (1995) J. Biol. Chem. 270:30249-30252.
- International Patent Application No. WO 94/23049
- International Patent Application No. WO 94/00569
- Ioannu et al. (1994) Nature Genetics 6:84-89.

- Iwatsubo et al. (1995) Ann. Neurol. 37:294-299.
- Jacobson et al. (1993) Nature 361:365.
- Kahn (1995) Science 270:369-370.
- Karlinsky et al. (1992) Neurology 42:1445-1453.
- Katzman (1986) N. Eng. J. Med. 314:964-973.
- Kollmar and Farnham (1993) Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 203:127-137.
- Krause and Aaronson (1991) Methods in Enzymology, 200:546-556.
- Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105
- Lamb et al. (1993) Nature Genetics 5:22-29
- Lassmann et al. (1995) Acta Neuropathol. 89:35.
- Levesque et al. (1996) in press.
- Levitan and Greenwald (1995) Nature 377:351-354.
- Liu and Sommer (1995) Biotechniques 18:470-477.
- Martin et al. (1995) NeuroReport (in press).
- Mullan et al. (1992) Nature Genetics 1:345-347.
- Murrell et al. (1991) Science 254:97-99.
- Nee et al. (1983) Arc. Neurol. 40:203-208.
- NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992) Science 258:67-86.
- Nowak (1995) Science 270:368-371.
- Obermeir et al. (1994) Embo J. 7:1585-1590.
- Pericak-Vance et al. (1988) Exp. Neurol. 102:271-279.
- Phizicky and Fields (1994) Microbiol. Reviews 59:94-123.
- Pike et al. (1993) J. Neurosci. 13:1676-1678.
- Podlisny et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:9564-9570.
- Pollen (1993) Hannah's Heirs: The Quest for the Genetic Origins of Alzheimer's

Disease, Oxford University Press, Oxford.

- Querfurth et al. (1995) Molec. Brain Res. 28:319-337.
- Riley et al. (1990) Nucl. Acid Res. 18:2887-2890.
- Rogaev et al. (1993) Neurology 43:2275-2279.
- Rogaev et al. (1995) Nature 376:775-778.
- Rommens et al. (1993) Hum. Molec. Genet. 2:901-907.
- Saleeba and Cotton (1993) Methods in Enzymology 217:286-295.
- Saunders et al. (1993) Neurology 43:1467-1472/
- Schellenberg et al. (1993) Am. J. Hum. Genet. 53:619-628.
- Schellenberg et al. (1992) Science 258:668-670.
- Scheuner et al. (1995) Soc. Neurosci. Abstr. 21:1500.
- Schindler and Darnell (1995) Annu. Rev. Biochem. 64:621-651.
- Scott et al. (1992)

- Selkoe et al. (1995)
Selkoe et al. (1994)
Sherrington et al. (1995) Nature 375:754-760.
St. George-Hyslop et al. (1990) Nature 347:194-197.
St. George-Hyslop et al. (1994) Science 263:537.
Strittmatter et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:1977-1981.
Suzuki et al. (1994) Science 264:1336-1340.
Tamaoka et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:32721-32724.
Tamaoka et al. (1995) Brain Res. 679:151-156.
United States Patent No. 5,297,562
Van Broeckhoven et al. (1992) Nature Genetics 2:335-339.
Vito et al. (1996) Science 271:521-525.
Wang (1992) Genomics 13: 532-536.
Weissenbach et al. (1992) Nature 359:794-798.
Wong et al. (1993) Neurosci. Lett. 152:96-98.
Zheng et al. (1995) Cell 81:525-531

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel:

(A) Jméno: HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED
PARTNERSHIP

(B) Ulice: 555 University Avenue

(C) Město: Toronto

(D) Stát: Ontario

(E) Země: Canada

(F) Poštovní kod (ZIP): M5G 1X8

(G) Telefon: (416) 813-5982

(H) Telefax: (416) 813- 5085

(A) Jméno: THE GOVERING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF
TORONTO

(B) Ulice: 106, Simcoe Hall, 27 King's College Circle

(C) Město: Toronto

(D) Stát: Ontario

(E) Země: Canada

(F) Poštovní kod (ZIP): M5S 1A1

(G) Telefon: (416) 978-7461

(H) Telefax: (416) 978-1878

(A) Jméno: ST. GEORGE-HYSLOP, Peter H.

(B) Ulice: 210 Richview Avenue

(C) Město: Toronto

(D) Stát: Ontario

(E) Země: Canada

(F) Poštovní kód (ZIP): M5P 3G3
(A) Jméno: FRASER, Paul E.
(B) Ulice: 611 Windermere Avenue
(C) Město: Toronto
(D) Stát: Ontario
(E) Země: Canada
(F) Poštovní kód (ZIP): M6S 3L9

(A) Jméno: ROMMENS, Johanna M.
(B) Ulice: 105 McCaul Streetenue
(C) Město: Toronto
(D) Stát: Ontario
(E) Země: Canada
(F) Poštovní kód (ZIP): M5T 2XT

(ii) Název vynálezu: Genetické sekvence a proteiny týkající
se Alzheimerovy choroby a jejich použití

(iii) Počet sekvencí: 25

(iv) Adresa pro korespondenci

(A) Adresa: Sim & McBurney
(B) Ulice: 330 University Avenue, 6th floor
(C) Město: Toronto
(D) Stát: Ontario
(E) Země: Canada
(F) ZIP: M5G 1R7

(v) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ media: Floppy disk
(B) Počítač: IBM PC kompatibilní

(C) Operační system: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, verse #1.30

(vi) Údaje o současné přihlášce:

(A) Číslo přihlášky: PCT/CA96/00263

(B) Datum podání: 29.5.1996

(C) Klasifikace:

(vii) Předchozí data přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: US 08/509359

(B) Datum podání: 31.7.1995

(vii) Předchozí data přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: US 08/496841

(B) Datum podání: 28.7.1995

(vii) Předchozí data přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: US 08/431048

(B) Datum podání: 28.5.1995

(viii) Zástupce/agent informace

(A) Jméno: RAE, Patricia A.

(C) Reference/číslo rejstříku: 7425-16

(ix) Telekomunikační informace:

(A) Telefon: (416) 595-1155

(B) Telefax: (416) 595 - 1163

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 2765 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 249...1649

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...2675
- (D) Jiné informace: /note = "hPS1-1"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 1:

```

TGGGACAGGC AGCTCCGGGG TCCGCGGTTT CACATCGGAA ACAAACAGC GGCTGGTCTG      60
GAAGGAACCT GAGCTACGAG CCGCGGCGGC AGCGGGGCGG CGGGGAAGCG TATACCTAAT      120
CTGGGAGCCT GCAAGTGACA ACAGCCTTTG CGGTCCTTAG ACAGCTTGGC CTGGAGGAGA      180
ACACATGAAA GAAAGAACCT CAAGAGGCTT TGTTTTCTGT GAAACAGTAT TTCTATACAG      240
TTGCTCCA ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA      290
      Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala
           1             5             10

CAG ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT      338
Gln Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn
      15             20             25             30

GAC AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC      386
Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His
           35             40             45

CCT GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG      434
Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val
           50             55             60

GTG GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC      482
Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly
           65             70             75

GCC AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG      530
Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val
           80             85             90

```

GTG GTC GTG GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp 95 100 105 110	578
GGG CAG CTA ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly 115 120 125	626
CAG AGA GCC CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val 130 135 140	674
ATT GTT GTC ATG ACT ATC CTC CTG GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC Ile Val Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys 145 150 155	722
TAT AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG Tyr Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu 160 165 170	770
TTC TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC Phe Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn 175 180 185 190	818
GTT GCT GTG GAC TAC ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTT GGT Val Ala Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly 195 200 205	866
GTG GTG GGA ATG ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG Val Val Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln 210 215 220	914
CAG GCA TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile 225 230 235	962
AAG TAC CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser 240 245 250	1010
GTA TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 255 260 265 270	1058
CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT CTC Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu 275 280 285	1106
ATT TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp 290 295 300	1154
CCG GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT AAT GCA GAA Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu 305 310 315	1202
AGC ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT GAT GAT GGC Ser Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly 320 325 330	1250
GGG TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCT Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro 335 340 345 350	1298
CAT CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser 355 360 365	1346
AGT ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGA Ser Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly 370 375 380	1394

TTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA GCA Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala 385 390 395	1442
ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC ATA Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile 400 405 410	1490
TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC AAG AAA Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys 415 420 425 430	1538
GCA TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr 435 440 445	1586
TTT GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC Phe Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe 450 455 460	1634
CAT CAA TTT TAT ATC TAGCATATTT GCGGTTAGAA TCCCATGGAT GTTTCTTCTT His Gln Phe Tyr Ile 465	1689
TGACTATAAC CAAATCTGGG GAGGACAAAG GTGATTTTCC TGTGTCCACA TCTAACAAAG	1749
TCAAGATTCC CGGCTGGACT TTTGCAGCTT CCTTCCAAGT CTTCCTGACC ACCTTGCACT	1809
ATTGGACTTT GGAAGGAGGT GCCTATAGAA AACGATTTTG AACATACTTC ATCGCAGTGG	1869
ACTGTGTCCC TCGGTGCAGA AACTACCAGA TTTGAGGGAC GAGGTCAAGG AGATATGATA	1929
GGCCCGGAAG TTGCTGTGCC CCATCAGCAG CTTGACGCGT GGTCACAGGA CGATTTCACT	1989
GACACTGCGA ACTCTCAGGA CTACCGGTTA CCAAGAGGTT AGGTGAAGTG GTTTAAACCA	2049
AACGGAAGTC TTCATCTTAA ACTACACGTT GAAAAATCAAC CCAATAATTC TGTATTAAC	2109
GAATTCTGAA CTTTTCAGGA GGTACTGTGA GGAAGAGCAG GCACCAGCAG CAGAATGGGG	2169
AATGGAGAGG TGGGCAGGGG TTCCAGCTTC CCTTTGATTT TTTGCTGCAG ACTCATCCTT	2229
TTTAAATGAG ACTTGTTTTT CCCTCTCTTT GAGTCAAGTC AAATATGTAG ATTGCCTTTG	2289
GCAATTCTTC TTCTCAAGCA CTGACACTCA TTACCGTCTG TGATTGCCAT TTCTTCCCAA	2349
GGCCAGTCTG AACCTGAGGT TGCTTTATCC TAAAGATTTT AACCTCAGGT TCCAAATTCA	2409
GTAAATTTTG GAAACAGTAC AGCTATTTCT CATCAATTCT CTATCATGTT GAAGTCAAAT	2469
TTGGATTTTC CACCAAATTC TGAATTTGTA GACATACTTG TACGCTCACT TGCCCCCAGA	2529
TGCCTCCTCT GTCCTCATTC TTCTCTCCCA CACAAGCAGT CTTTTTCTAC AGCCAGTAAG	2589
GCAGCTCTGT CRTGGTAGCA GATGGTCCCA TTATTCTAGG GTCTTACTCT TTGTATGATG	2649
AAAAGAATGT GTTATGAATC GGTGCTGTCA GCCCTGCTGT CAGACCTTCT TCCACAGCAA	2709
ATGAGATGTA TGCCCAAAGC GGTAGAATTA AAGAAGAGTA AAATGGCTGT TGAAGC	2765

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2 :

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 467 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

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

```

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
 1           5           10           15
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn
 20           25           30
Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu
 35           40           45
Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu
 50           55           60
Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys
 65           70           75           80
His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val
 85           90           95
Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln
100          105          110
Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg
115          120          125
Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val
130          135          140
Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys
145          150          155          160
Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe
165          170          175
Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala
180          185          190
Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val
195          200          205
Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala
210          215          220
Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr
225          230          235          240
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr
245          250          255
Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val
260          265          270
Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr
275          280          285
Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu
290          295          300
Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr
305          310          315          320
Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe
325          330          335

```

Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg
 340 345 350
 Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile
 355 360 365
 Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly
 370 375 380
 Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala
 385 390 395 400
 Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile
 405 410 415
 Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu
 420 425 430
 Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala
 435 440 445
 Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln
 450 460
 Phe Tyr Ile
 465

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 3086 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 557...1945

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...3086
- (D) Jiné informace: /note = "hPS1-2"

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

GAATTCGGCA CGAGGGAAAT GCTGTTTGCT CGAAGACGTC TCAGGGCGCA GGTGCCTTGG	60
GCCGGGATTA GTAGCCGTCT GAACTGGAGT GGAGTAGGAG AAAGAGGAAG CGTCTTGGGC	120
TGGGTCTGCT TGAGCAACTG GTGAAACTCC GCGCCTCACG CCCCGGGTGT GTCCTTGTCC	180
AGGGGCGACG AGCATTCTGG GCGAAGTCCG CACSCCTCTT GTTCGAGGCG GAAGACGGGG	240
TCTGATSCTT TCTCCTTGGT CGGGMCTGTC TCGAGGCATG CATGTCCAGT GACTCTTGTG	300
TTTGCTGCTG CTTCCCTCTC AGATTCTTCT CACCGTTGTG GTCAGCTCTG CTTTAGGCAT	360
ATTAATCCAT AGTGGAGGCT GGGATGGGTG AGAGAATTGA GGTGACTTTT CCATAATTCA	420
GACCTAATCT GGGAGCCTGC AAGTGACAAC AGCCTTTGCG GTCCTTAGAC AGCTTGGCCT	480
GGAGGAGAAC ACATGAAAGA AAGAACCTCA AGAGGCTTTG TTTTCTGTGA AACAGTATTT	540
CTATACAGTT GCTCCA ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC	589
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe	
1 5 10	
CAG AAT GCA CAG ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT AAT GAC	637
Gln Asn Ala Gln Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Asn Asp	
15 20 25	
AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT	685
Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro	
30 35 40	
GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG	733
Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val	
45 50 55	

GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala 60 65 70 75	781
AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG GTG Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val 80 85 90	829
GTC GTG GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly 95 100 105	877
CAG CTA ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC CAG Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln 110 115 120	925
AGA GCC CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile 125 130 135	973
GTT GTC ATG ACT ATC CTC CTG GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT Val Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr 140 145 150 155	1021
AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG TTC Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe 160 165 170	1069
TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC GTT Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val 175 180 185	1117
GCT GTG GAC TAC ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTG GGT GTG Ala Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Leu Gly Val 190 195 200	1165
GTG GGA ATG ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG CAG Val Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln 205 210 215	1213
GCA TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC AAG Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys 220 225 230 235	1261
TAC CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 240 245 250	1309
TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG CTG Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu 255 260 265	1357
GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT CTC ATT Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile 270 275 280	1405
TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC CCG Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro 285 290 295	1453
GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT AAT GCA GAA AGC Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser 300 305 310 315	1501
ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT GAT GAT GGC GGG Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly 320 325 330	1549
TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCT CAT Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His 335 340 345	1597

CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC AGT Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser 350 355 360	1645
ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGA TTG Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu 365 370 375	1693
GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA GCA ACA Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr 380 385 390 395	1741
GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC ATA TTA Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu 400 405 410	1789
ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC AAG AAA GCA Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala 415 420 425	1837
TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC TTT Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe 430 435 440	1885
GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC CAT Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His 445 450 455	1933
CAA TTT TAT ATC TAGCATATTT GCGGTTAGAA TCCCATGGAT GTTTCTTCTT Gln Phe Tyr Ile 460	1985
TGACTATAAC CAAATCTGGG GAGGACAAAG GTGATTTTCC TGTGTCCACA TCTAACAAAG	2045
TCAAGATTCC CGGCTGGACT TTTGCAGCTT CCTTCCAAGT CTTCTGACC ACCTTGCACT	2105
ATTGGACTTT GGAAGGAGGT GCCTATAGAA AACGATTTTG AACATACTTC ATCGCAGTGG	2165
ACTGTGTCCT CGGTGCAGAA ACTACCAGAT TTGAGGGACG AGGTCAAGGA GATATGATAG	2225
GCCCGGAAGT TGCTGTGCCC CATCAGCAGC TTGACGCGTG GTCACAGGAC GATTTCACTG	2285
ACACTGCGAA CTCTCAGGAC TACCGGTTAC CAAGAGGTTA GGTGAAGTGG TTAAACCAA	2345
ACGGAACCTCT TCATCTTAA CTAACGTTG AAAATCAACC CAATAATTCT GTATTAACTG	2405
AATTCTGAAC TTTTCAGGAG GACTGTGAG GAAGAGCAGG CACCAGCAGC AGAATGGGGA	2465
ATGGAGAGGT GGGCAGGGGT TCCAGCTTCC CTTTGATTTT TTGCTGCAGA CTCATCCTTT	2525
TTAAATGAGA CTTGTTTTCC CCTCTCTTTG AGTCAAGTCA AATATGTAGA TGCCTTTGGC	2585
AATTCTTCTT CTCAAGCACT GACACTCATT ACCGTCTGTG ATTGCCATTT CTTCCCAAGG	2645
CCAGTCTGAA CCTGAGGTTG CTTTATCCTA AAAGTTTTAA CCTCAGGTTT CAAATTCAGT	2705
AAATTTTGGA AACAGTACAG CTATTTCTCA TCAATTCTCT ATCATGTTGA AGTCAAATTT	2765
GGATTTTCCA CCAAATTCTG AATTTGTAGA CATACTTGTA CGCTCACTTG CCCCAGATGC	2825
CTCCTCTGTC CTCATTCTTC TCTCCACAC AAGCAGTCTT TTTCTACAGC CAGTAAGGCA	2885
GCTCTGTCGT GGTAGCAGAT GGTCCCACTT ATTCTAGGGT CTTACTCTTT GTATGATGAA	2945
AAGAATGTGT TATGAATCGG TGCTGTCAGC CCTGCTGTCA GACCTTCTTC CACAGCAAAT	3005
GAGATGTATG CCCAAAGCGG TAGAATTAAA GAAGAGTAAA ATGGCTGTTG AAGCAAAAAA	3065
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	3086

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 463 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

```

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
 1          5          10          15
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Asn Asp Asn Arg Glu Arg Gln
          20          25          30
Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu Pro Leu Ser Asn
          35          40          45
Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu
          50          55          60
Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met
          65          70          75          80
Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile
          85          90          95
Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr
          100          105          110
Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser
          115          120          125
Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile
          130          135          140
Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala
          145          150          155          160
Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile
          165          170          175
Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr Ile
          180          185          190
Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Leu Gly Val Val Gly Met Ile Ser
          195          200          205
Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met
          210          215          220
Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp
          225          230          235          240
Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala
          245          250          255
Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln
          260          265          270
Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met
          275          280          285

```

```

Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg
290                               295                 300

Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr Glu Arg Glu Ser
305                               310                 315                 320

Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp
                               325                 330                 335

Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu
                               340                 345                 350

Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile Leu Ala Gly Glu
355                               360                 365

Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe
370                               375                 380

Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp
385                               390                 395                 400

Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu
                               405                 410                 415

Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu Pro
420                               425                 430

Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp Tyr Leu
435                               440                 445

Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe Tyr Ile
450                               455                 460

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 2494 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...2494
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex1n2"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

AAGCTTTTGT GTGTAAAAAG TATTAGAATC TCATGTTTTT GAACAAGGTT GGCAGTGGGT	60
TGGGAGGAGG GATTGGAGAT TGATGCGATA GGAATGTGAA GGGATAGCTT GGGGTGGATT	120
TTATTTTTTA ATTTAATTTT TTATTTKTTG AGATGGAGTC TTGCTCTGTC TCCCAGGCTG	180
GAGTGCACTG GTGTGATCTC AGCTCACGGG TTCAAGCGAT TCTCCTGCTG CAGCCTCCCG	240
AGTAGCTGGG ATTACAGGAG CGCGCCACCA CACCCGNTA ATTTNNTTGT ATTTTTAGTA	300
GAGACGGGGT TTCACCATGT TGGGTTAGGC TGGTCTAGAA CTCCCAACCT CATGATCCGC	360
CTGCTTCGGC CTCCCAAAGT GCCGGAATTA CAGGCGTGAG CGACTGCACC CGGCCGCTTG	420
GGGGTGGATT TTAAAGAAA CTTTAGAAGA ATGTAAGTTG SCCAGATACC ATGTACCGTT	480
AATTTCAATTT TCGGTTTTTK GAATACCCAT GTTTGACATT TMTCCGTTCA CCTTGATTAA	540
ATAAGGTAGT ATTCATTTTT TAGTTTTAGC TTTTGGATAT ATGTGTAAGT GTGGTATGCT	600
GTCTAATGAA TTAAGACAAT TGGTNCTKTC TTTACCCMAM ANCTGGACMA AGAGCAGGCA	660
AGATGCAAAA ATCAAGTGAC CCAGCAAACC AGACACATTT TCTGCTCTCA GCTAGCTTGC	720
CACCTAGAAA GACTGGTTGT CAAAGTTGGA GTCCAAGAAT CGCGGAGGAT GTTTAAAATG	780
CAGTTTCTCA GGTTCNCNC ACCCACCAGA AGTTTGTATT CATTGAGTGG TGGGAGAGGG	840
CAGAGATATT TGCATTTTA ACAGCATTCT CTTGATTGTG ATGCAGCTGG TTCSCAAATA	900
GGTACCCTAA AGAAATGACA GGTGTTAAAT TTAGGATGGC CATCGCTTGT ATGCCGGGAG	960

AAGCACACGC TGGGCCCAAT TTATATAGGG GCTTTCGTCC TCAGCTCGAG CARCCTCAGA	1020
ACCCCGACAA CCYACGCCAG CKCTCTGGGC GGATTCCRTC AGKTGGGGAA GSCCAGGTGG	1080
AGCTCTGGKT TCTCCCCGCA ATCGTTTCTC CAGGCCGGAG GCCCCGCCCC CTTCTCCTG	1140
GCTCCTCCCC TCCTCCGTGG GCCGNCCGCC AACGACGCCA GAGCCGGAAA TGACGACAAC	1200
GGTGAGGGTT CTCGGGCGGG GCCTGGGACA GGCAGCTCCG GGGTCCGCGG TTTTCACATC	1260
GGAAACAAAA CAGCGGCTGG TCTGGAAGGA ACCTGAGCTA CGACCCGCGG CGGCAGCGGG	1320
GCGGCGGGGA AGCGTATGTG CGTGATGGGG AGTCCGGGCA AGCCAGGAAG GCACCGCGGA	1380
CATGGGCGGC CGCGGCGAGG GNCCGNCCT TTGTGGCCGC CCGGGCCGCG AAGCCGGTGT	1440
CCTAAAAGAT GAGGGGCGGG GCGCGGCCGG TTGGGGCTGG GGAACCCCGT GTGGGAAACC	1500
AGGAGGGGCG GCCCGTTTCT CGGGCTTCGG GCGCGGCCGG GTGGAGAGAG ATTCCGGGGA	1560
GCCTTGGTCC GGAAATGCTG TTTGCTCGAA GACGTCTCAG GGCGCAGGTG CCTTGGGCCG	1620
GGATTAGTAG CCGTCTGAAC TGGAGTGGAG TAGGAGAAAG AGGAAGCGTC TTGGGCTGGG	1680

TCTGCTTGAG CAACTGGTGA AACTCCGCGC CTCACGCCCC GGGTGTGTCC TTGTCCAGGG	1740
GCGACGAGCA TTCTGGGCGA AGTCCGCACG CCTCTTGTTT GAGGCGGAAG ACGGGGTCTT	1800
GATGCTTTCT CCTTGGTCGG GACTGTCTCG AGGCATGCAT GTCCAGTGAC TCTTGTGTTT	1860
GCTGCTGCTT CCCTCTCAGA TTCTTCTCAC CGTTGTGGTC AGCTCTGCTT TAGGCATATT	1920
AATCCATAGT GGAGGCTGGG ATGGGTGAGA GAATTGAGGT GACTTTTCCA TAATTCAGGT	1980
GAGATGTGAT TAGAGTYCGG ATCCTNCGGT GGTGGCAGAG GCTTACCAAG AAACACTAAC	2040
GGGACATGGG AACCAATTGA GGATCCAGGG AATAAAGTGT GAAGTTGACT AGGAGGTTTT	2100
CAGTTTAAGA ACATGGCAGA GACATTCTCA GAAATAAGGA AGTTAGGAAG AAAGACCTGG	2160
TTTAGAGAGG AGGGCGAGGA AGTGGTTTGG AAGTGTCCTT TTGGAAGTGC CAGCAGGTGA	2220
AAATGCCCTG TGAACAGGAC TGGAGCTGAA AACAGGAATC AATTCCATAG ATTTCAGTT	2280
GATGTTGGAG CAGTGGAGAA GTCTAANCTA AGGAAGGGGA AGAGGAGGCC AAGCCAAACA	2340
CTTAGGAACA CTTNCNACGA GGGGGTGGAA GAAGAGCAAG GAGCCAGCTG AGGAGAATGA	2400
GTGTGGTTGG AGAACCACCA CAGCNCAGGG TCGCCAGANC TGAGGAAGGG GAGGGAAGCT	2460
TATCGAGKAM SGWCRACMKC GAGTTGGCAG GGAT	2494

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1117 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1117
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex3n4"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 6:

GGATCCGCCC GCCTTGGCCT CCCAAAGTGC TGGGATTACA GGCATGAGCC ACCGCTCCTG	60
GCTGAGTCTG CGATTTCTTG CCAGCTCTAC CCAGTTGTGT CATCTTAAGC AAGTCACTGA	120
ACTTCTCTGG ATTCCCTTCT CCTNNWGTA AATAAGNATG TTATCTGNCC NNCCTGCCTT	180
GGGCATTGTG ATAAGGATAA GATGACATTA TAGAATNTNG CAAAATTAAA AGCGCTAGAC	240
AAATGATTTT ATGAAAATAT AAAGATTAGN TTGAGTTTGG GCCAGCATAG AAAAAGGAAT	300
GTTGAGAACA TTCCNTTAAG GATTACTCAA GCYCCCCTTT TGSTGKNWAA TCAGANNGTC	360
ATNNAMNTAT CNTNTGTGGG YTGAAAATGT TTGGTTGTCT CAGGCGGTTC CTA CTATTATTG	420
CTAAAGAGTC CTACCTTGAG CTTATAGTAA ATTTGTCAGT TAGTTGAAAG TCGTGACAAA	480
TTAATACATT CCTGGTTTAC AAATTGGTCT TATAAGTATT TGATTGGTNT AAATGNATTT	540
ACTAGGATTT AACTAACAAT GGATGACCTG GTGAAATCCT ATTCAGACC TAATCTGGGA	600
GCCTGCAAGT GACAACAGCC TTTGCGGTCC TTAGACAGCT TGGCCTGGAG GAGAACACAT	660
GAAAGAAAGG TTTGWNTCTG NTTAWTGTA TCTATGRAAG TGTTTTWTAT MACAGTATAA	720
TTGTMTGMAC AAAGTTCTGT TTTTCTTTCC CTTTNCAGAA CCTCAAGAGG CTTTGTTTTC	780
TGTGAAACAG TATTTCTATA CAGTTGCTCC AATGACAGAG TTACCTGCAC CGTTGTCCTA	840
CTTCCAGAAT GCACAGATGT CTGAGGACAA CCACCTGAGC AATACTGTAC GTAGCCAGGT	900
ACAGCGTCAG TYTCTNAAAC TGCCTYYGNC AGACTGGATT CACTTATCAT CTCCCCTCAC	960
CTCTGAGAAA TGCTGAGGGG GSTAGGNAGG GCTTTCTCTA CTTNACCACA TTTNATAATT	1020
ATTTTTGGGT GACCTTCAGC TGATCGCTGG GAGGGACACA GGGCTNTTT AACACATAGG	1080
GTGTTGGATA CAGNCCCTCC CTAATTCACA TTTCANC	1117

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1727 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1727
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex5"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

```

GGATCCCTCC CCTTTT TAGA CCATACAAGG TAACTTCCGG ACGTTGCCAT GGCATCTGTA      60
AACTGTCATG GTGTTGGCGG GGAGTGTCTT TTAGCATGCT AATGTATTAT AATTAGCGTA      120
TAGTGAGCAG TGAGGATAAC CAGAGGTCAC TCTCCTCACC ATCTTGTTTT TGGTGGGTTT      180
TGGCCAGCTT CTTTATTGCA ACCAGTTTTA TCAGCAAGAT CTTTATGAGC TGTATCTTGT      240
GCTGACTTCC TATCTCATCC CGNAACTAAG AGTACCTAAC CTCCTGCAAA TTGMAGNCCA      300
GNAGGTCTTG GNCTTATTTN ACCCAGCCCC TATTCAARAT AGAGTNGYTC TTGGNCCAAA      360
CGCCYCTGAC ACAAGGATTT TAAAGTCTTA TTAATTAAGG TAAGATAGKT CCTTGSATAT      420
GTGGTCTGAA ATCACAGAAA GCTGAATTTG GAAAAAGGTG CTTGGASCTG CAGCCAGTAA      480
ACAAGTTTTC ATGCAGGTGT CAGTATTTAA GGTACATCTC AAAGGATAAG TACAATTGTG      540
TATGTTGGGA TGAACAGAGA GAATGGAGCA ANCCAAGACC CAGGTAAAAG AGAGGACCTG      600
AATGCCTTCA GTGAACAATG ATAGATAATC TAGACTTTTA AACTGCATAC TTCCTGTACA      660
TTGTTTTTTC TTGCTTCAGG TTTT TAGAAC TCATAGTGAC GGGTCTGTG TTAATCCCAG      720
GTCTAACCGT TACCTTGATT CTGCTGAGAA TCTGATTTAC TGAAAATGTT TTTCTTGTGC      780

```

TTATAGAATG ACAATAGAGA ACGGCAGGAG CACAACGACA GACGGAGCCT TGGCCACCCT	840
GAGCCATTAT CTAATGGACG ACCCCAGGGT AACTCCCGGC AGGTGGTGGA GCAAGATGAG	900
GAAGAAGATG AGGAGCTGAC ATTGAAATAT GGCGCCAAGC ATGTGATCAT GCTCTTTGTC	960
CCTGTGACTC TCTGCATGGT GGTGGTCGTG GCTACCATTA AGTCAGTCAG CTTTTATACC	1020
CGGAAGGATG GGCAGCTGTA CGTATGAGTT TKGTTTTATT ATTCTCAAAS CCAGTGTGGC	1080
TTTTCTTTAC AGCATGTCAT CATCACCTTG AAGGCCTCTN CATTGAAGGG GCATGACTTA	1140
GCTGGAGAGC CCATCCTCTG TGATGGTCAG GAGCAGTTGA GAGANCGAGG GGTATTACT	1200
TCATGTTTTA AGTGGAGAAA AGGAACACTG CAGAAGTATG TTTCTGTAT GGTATTACTG	1260
GATAGGGCTG AAGTTATGCT GAATTGAACA CATAAATTCT TTTCCACCTC AGGGNCATTG	1320
GGCGCCCATT GNTCTTCTGC CTAGAATATT CTTTCCTTN CTNACTTKGG NGGATTAAAT	1380
TCCTGTCATC CCCCTCCTCT TGGTGTTATA TATAAAGTNT TGGTGCCGCA AAAGAAGTAG	1440
CACTCGAATA TAAAATTTTC CTTTAAATTC TCAGCAAGGN AAGTTACTTC TATATAGAAG	1500
GGTGCACCCN TACAGATGGA ACAATGGCAA GCGCACATTT GGGACAAGGG AGGGGAAAGG	1560
GTTCTTATCC CTGACACACG TGGTCCCNGC TGNTGTGTNC TNCCCCACT GANTAGGGTT	1620
AGACTGGACA GGCTTAAACT AATTCCAATT GGNTAATTTA AAGAGAATNA TGGGGTGAAT	1680
GCTTTGGGAG GAGTCAAGGA AGAGNAGGTA GNAGGTAAC TGAATGA	1727

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1883 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1883
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex6"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

CNCGTATAAA AGACCAACAT TGCCANCNAC AACCACAGGC AAGATCTTCT CCTACCTTCC	60
CCCNNGGTGT AATACCAAGT ATTCNCCAAT TTGTGATAAA CTTTCATTGG AAAGTGACCA	120
CCCTCCTTGG TTAATACATT GTCTGTGCCT GCTTTCACAC TACAGTAGCA CAGTTGAGTG	180
TTTGCCCTGG AGACCATATG ACCCATAGAG CTTAAATAT TCAGTCTGGC TTTTACAGA	240
GATGTTTCTG ACTTTGTAA TAGAAAATCA ACCCAACTGG TTAAATAAT GCACATACTT	300
TCTCTCTCAT AGAGTAGTGC AGAGGTAGNC AGTCCAGATT AGTASGGTGG CTTACGTTT	360
ATCCAAGGAC TCAATCTCCT TCTTTCTTCT TTAGCTTCTA ACCTCTAGCT TACTTCAGGG	420
TCCAGGCTGG AGCCCTASCC TTCATTTCTG ACAGTAGGAA GGAGTAGGGG AGAAAAGAAC	480
ATAGGACATG TCAGCAGAAT TCTCTCCTTA GAAGTTCCAT ACACAACACA TCTCCCTAGA	540
AGTCATTGCC CTTACTTGTT CTCATAGCCA TCCTAAATAT AAGGGAGTCA GAAGTAAAGT	600
CTKKNTGGCT GGGAATATTG GCACCTGGAA TAAAAATGTT TTTCTGTGAA TGAGAAACAA	660
GGGGAAGATG GATATGTGAC ATTATCTTAA GACAACCTCA GTTGCAATTA CTCTGCAGAT	720
GAGAGGCACT AATTATAAGC CATATTACCT TTCTTCTGAC AACCCTTGT CAGCCNCGT	780
GGTTTCTGTG GCAGAATCTG GTTCYATAMC AAGTTCCTAA TAANCTGTAS CCNAAAAAT	840
TTGATGAGGT ATTATAATTA TTTCAATATA AAGCACCCAC TAGATGGAGC CAGTGTCTGC	900

TTCACATGTT AAGTCCTTCT TTCCATATGT TAGACATTTT CTTTGAAGCA ATTTTAGAGT	960
GTAGCTGTTT TTCTCAGGTT AAAAATTCTT AGCTAGGATT GGTGAGTTGG GGAAAAGTGA	1020
CTTATAAGAT NCGAATTGAA TTAAGAAAAA GAAAATTCTG TGTGGAGGT GGTAATGTGG	1080
KTGGTGATCT YCATTAACAC TGANCTAGGG CTTTKGKGT TGKTTTATTG TAGAATCTAT	1140
ACCCCATTC AAGAAGATAC CGAGACTGTG GGCCAGAGAG CCCTGCACTC AATTCTGAAT	1200
GCTGCCATCA TGATCAGTGT CATTGTTGTC ATGACTATCC TCCTGGTGGT TCTGTATAAA	1260
TACAGGTGCT ATAAGGTGAG CATGAGACAC AGATCTTTGN TTTCCACCCT GTTCTTCTTA	1320
TGGTTGGGTA TTCTTGTCAC AGTAACTTAA CTGATCTAGG AAAGAAAAAA TGTTTTGTCT	1380
TCTAGAGATA AGTTAATTTT TAGTTTTCTT CCTCCTCACT GTGGAACATT CAAAAAATAC	1440
AAAAAGGAAG CCAGGTGCAT GTGTAATGCC AGGCTCAGAG GCTGAGGCAG GAGGATCGCT	1500
TGGGCCCAGG AGTTCACAAG CAGCTTGGGC AACGTAGCAA GACCCTGCCT CTATTAAAGA	1560
AAACAAAAAA CAAATATTGG AAGTATTTTA TATGCATGGA ATCTATATGT CATGAAAAAA	1620
TTAGTGTAAG ATATATATAT TATGATTAGN TATCAAGATT TAGTGATAAT TTATGTTATT	1680
TTGGGATTTT AATGCCTTTT TAGGCCATTG TCTCAAMAAA TAAAAGCAGA AAACAAAAAA	1740
AGTTGTAAGT GAAAAATAAA CATTTCCATA TAATAGCACA ATCTAAGTGG GTTTTTGNTT	1800
GTTTGTGTTG TTGTGAAGC AGGCGCTTGC CCTNYCACCC AGGNTGGAGT GAAGTGCAGT	1860
GGCACGATTT TGGCTCACTG CAG	1883

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 823 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...823
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex7"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

CAGGAGTGGA CTAGGTAAAT GNAAGNTGTT TTAAAGAGAG ATGNGGNCNG GGACATAGTG	60
GTACACANCT GTAATGCTCA NCACTKATGG GGAGTACTGA AGGNGGNSGG ATCACTTGNG	120
GGTCNGGAAT NTGAGANCAG CCTGGGCAAN ATGGCGAAAC CCTGTCTCTA CTAAAAATAG	180
CCANAAWNWA GCCTAGCGTG GTGGCGCRCA CGCGTGGTTC CACCTACTCA GGAGGCNTAA	240
GCACGAGNAN TNCTTGAACC CAGGAGGCAG AGGNTGTGGT GARCTGAGAT CGTGCCACTG	300
CACTCCAGTC TGGGCGACMA AGTGAGACCC TGTCTCCNNN AAGAAAAAAA AAATCTGTAC	360
TTTTTAAGGG TTGTGGGACC TGTTAATTAT ATTGAAATGC TTCTYTTCTA GGTCATCCAT	420
GCCTGGCTTA TTATATCATC TCTATTGTTG CTGTTCTTTT TTTCATTCAT TTAATTGGGG	480
TAAGTTGTGA AATTTGGGGT CTGTCTTTCA GAATTAACCT CCTNNGTGCT GTGTAGCTAT	540

CATTTAAAGC CATGTACTTT GNTGATGAAT TACTCTGAAG TTTTAATTGT NTCCACATAT	600
AGGTCATACT TGGTATATAA AAGACTAGNC AGTATTACTA ATTGAGACAT TCTTCTGTNG	660
CTCCTNGCTT ATAATAAGTA GAACTGAAAG NAACTTAAGA CTACAGTTAA TTCTAAGCCT	720
TTGGGGAAGG ATTATATAGC CTTCTAGTAG GAAGTCTTGT GCNATCAGAA TGTTTNTAAA	780
GAAAGGGTNT CAAGGAATNG TATAAANACC AAAAATAATT GAT	823

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 945 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...945
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex8"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 10:

GTTNTCCNAA CCAACTTAGG AGNTTGGACC TGGGRAAGAC CNACNTGATC TCCGGGAGGN	60
AAAGACTNCA GTTGAGCCGT GATTGCACCC ACTTTACTCC AAGCCTGGGC AACCAAAATG	120
AGACACTGGC TCCAAACACA AAAACAAAAA CAAAAAAGA GTAAATTAAT TTANAGGGAA	180
GNATTAAATA AATAATAGCA CAGTTGATAT AGGTTATGGT AAAATTATAA AGGTGGGANA	240
TTAATATCTA ATGTTTGGGA GCCATCACAT TATTCTAAAT AATGTTTTGG TGGAAATTAT	300
TGTACATCTT TAAAAATCTG TGTAATTTTT TTTCAAGGAA GTGTTTAAAA CCTATAACGT	360
TGCTGTGGAC TACATTACTG TTGCACTCCT GATCTGGAAT TTTGGTGTGG TGGGAATGAT	420
TTCCATTAC TGGAAAGGTC CACTTCGACT CCAGCAGGCA TATCTCATTG TGATTAGTGC	480
CCTCATGGCC CTGGTGTTTA TCAAGTACCT CCCTGAATGG ACTGCGTGGC TCATCTTGGC	540
TGTGATTTCA GTATATGGTA AAACCCAAGA CTGATAATTT GTTTGTCACA GGAATGCCCC	600
ACTGGAGTGT TTTCTTTCCT CATCTCTTTA TCTTGATTTA GAGAAAATGG TAACGTGTAC	660
ATCCCATAAC TCTTCAGTAA ATCATTAAAT AGCTATAGTA ACTTTTTCAT TTGAAGATTT	720
CGGCTGGGCA TGGTAGCTCA TGCCTGTAAT CTTAGCACTT TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG	780
ATCACCTAAG CCCAGAGTTC AAGACCAGCC TGGGCAACAT GGCAAAACCT CGTATCTACA	840
GAAAATACAA AAATTAGCCG GGCATGGTGG TGCACACCTG TAGTTCAGC TACTTAGGAG	900
GCTGAGGTGG GAGGATCGAT TGATCCCAGG AGGTCAAGNC TGCAG	945

(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 540 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

CTGCAGCTTT CCTTTAACT AGGAAGACTT GTTCCTATAC CCCAGTAACG ATACACTGTA	60
CACTAAGCAA ATAGCAGTCA AACCCAAATG AAATTTNTAC AGATGTTCTG TGTCATTTTA	120
TNTTGTTTAT GTTGTCTCCC CCACCCCCAC CAGTTCACCT GCCATTTATT TCATATTGAT	180
TCAACGTCTN NNTGTGTAAA AAGAGACAAA AACATTAAA CTTTTTTCCT TCGTTAATTC	240
CTCCCTACCA CCCATTTACA AGTTTAGCCC ATACATTTTA TTAGATGTCT TTTATGTTTT	300
TCTTTTNTCA GATTTAGTGG CTGTTTGTG TCCGAAAGGT CCACTTCGTA TGCTGGTTGA	360
AACAGCTCAG GAGAGAAATG AAACGCTTTT TCCAGCTCTC ATTTACTCCT GTAAGTATTT	420
GGAGAATGAT ATTGAATTAG TAATCAGNGT AGAATTTATC GGGAACCTGA AGANATGTNA	480
CTATGGCAAT TTCANGNAC TTGTCTCATC TTAAATGANA GNATCCCTGG ACTCCTGNAG	540

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 509 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...509
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex10"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 12:

CCCCGTCNAT GCATACTTTG TGTGTCCAGT GCTTACCTGG AATCCNGTCT TTCCCAACAG	60
CAACAATGGT GTGGTTGGTG AATATGGCAG AAGGAGACCC GGAAGCTCAA AGGAGAGTAT	120
CCAAAAATTC CAAGTATAAT GCAGAAAGTA GGTAAGTYYY NTTAGATAMN ATCTTGATTT	180
TNCAGGGTCA CTGTTATAAG CTAACAGTAT AGNAATGTTT TTATCGTCTT TCTNKGGNCA	240
TAGACTCCTN KGAGAATCTC TTGAGAACTA TGATAATGCC CAGTAAATAC NCAGATAAGT	300
ATTTAAGGAG TNCAGATACT CAAANCCCCA CAATACNGTC AAAGCATCCT AGGTTAAGAC	360
AMCNCCCATT AAATACAGAA TACCAGCATG GAAAGGTTCA GGCTGAGGTT ATGATTGGGT	420
TTGGGTTTTG GGNNGGTTTT TTATAAGTCA TGATTTTAAA AAGAAAAAAT AACTCTCTC	480
CAAACATGTA AAAGTAAGAA TCTCCTAAA	509

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1092 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1092
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex11"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

GTCTAGATAA GNCAACATTC AGGGGTAGAA GGGGACTGTT TATTTTTTCC TTTAGTCTCT

60

```

CTTAAAGAGT GAGAAAAATT TTCCCAGGAA TCCCGGTGGA CTTTGCTTCA CCACTCATAG      120
GTTCATACCA AGTTACAACC CCACAACCTT AGAGCTTTTG TTAGGAAGAG GCTTGGTGGG      180
ATTACCGTGC TTGGCTTGGC TTGGTCAGGA TTCACCACCA GAGTCATGTG GGAGGGGGTG      240
GGAACCCAAA CAATTCAGGA TTCTGCCCTC AGGAAATAAA GGAGAAAATA GCTGTTGGAT      300
AAACTACCAG CAGGCACTGC TACAGCCCAT GCTTTGTGGT TTAAGGGCCA GCTAGTTACA      360
ATGACAGCTA GTTACTGTTT CCATGTAATT TTCTTAAAGG TATTAAATTT TTCTAAATAT      420
TAGAGCTGTA ACTTCCACTT TCTCTTGAAG GCACAGAAAG GGAGTCACAA GACACTGTTG      480
CAGAGAATGA TGATGGCGGG TTCAGTGAGG AATGGGAAGC CCAGAGGGAC AGTCATCTAG      540
GGCCTCATCG CTCTACACCT GAGTCACGAG CTGCTGTCCA GGAAC TTCC AGCAGTATCC      600
TCGCTGGTGA AGACCCAGAG GAAAGTATGT TCANTTCTCC ATNTTTCAAA GTCATGGATT      660
CCTTTAGGTA GCTACATTAT CAACCTTTTT GAGAATAAAA TGAATTGAGA GTGTTACAGT      720
CTAATTCTAT ATCACATGTA ACTTTTATTT GGATATATCA GTAATAGTGC TTTTNTTTT      780
TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTNGGNGA NAGAGTCTCG CTCTGTCGCC AGGTTGGAGT      840
GCAATGGTGC GATCTTGGCT CACTGAAAGC TCCACCNCCC GGGTTCAAGT GATTCTCCTG      900
CCTCAGCCNC CCAAGTAGNT GGGACTACAG GGGTGCGCCA CCACGCCTGG GATAATTTTG      960
GGNTTTTTAG TAGAGATGGC GTTTCACCAN CTTGGNGCAG GCTGGTCTTG GAACTCCTGA     1020
NATCATGATC TGCCTGCCTT AGCCTCCCCA AAGTGCTGGG ATTNCAAGGG TGAGCCACTG     1080
TTCCTGGGCC TC                                                                1092

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1003 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1003

(D) Jiné informace: /note = "1Ex12"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

CTGCAGTGAG CCGAGATCAT GCTGCTGTAC TCCAGCCTGG GCCACAGAGC CAAACTCCAT	60
CTCCCCAAAA AAAAAAATAT TAATTAATAT GATNAAATGA TGCCTATCTC AGAATTCTTG	120
TAAGGATTTT TTAGKACAAG TGCTGGGTAT AAACATATANA TTCRATAGAT GNCGATTATT	180
ACTTAYTATT GTTATTGATA AATAACAGCA GCATCTACAG TTAAGACTCC AGAGTCAGTC	240
ACATAGAATC TGGNACTCCT ATTGTAGNAA ACCCCNMMAG AAAGAAAACA CAGCTGAAGC	300
CTAATTTTGT ATATCATTTA CTGACTTCTC TCATTCATTG TGGGGTTGAG TAGGGCAGTG	360
ATATTTTGA ATTGTGAAAT CATANCAAAG AGTGACCAAC TTTTAAATAT TTGTAACTT	420
TCCTTTTGTAG GGGGAGTAAA ACTTGGATTG GGAGATTTC TTTTCTACAG TGTTCTGGTT	480
GGTAAAGCCT CAGCAACAGC CAGTGGAGAC TGGAACACAA CCATAGCCTG TTTCGTAGCC	540
ATATTAATTG TMMSTATACA CTAATAAGAA TGTGTCAGAG CTCTTAATGT CMAAACTTTG	600
ATTACACAGT CCCTTTAAGG CAGTTCTGTT TTAACCCAG GTGGGTAAA TATTCCAGCT	660
ATCTGAGGAG CTTTNGATA ATTGGACCTC ACCTTAGTAG TTCTCTACCC TGGCCACACA	720
TTAGAATCAC TTGGGAGCTT TAAAACTGT AAGCTCTGCC CTGAGATATT CTTACTCAAT	780
TTAATTGTGT AGTTTTTAAA ATTCCCCAGG AAATTCTGGT ATTTCTGTTT AGGAACCGCT	840
GCCTCAAGCC TAGCAGCACA GATATGTAGG AAATTAGCTC TGTAAGGTTG GTCTTACAGG	900
GATAAACAGA TCCTTCCTTA GTCCTGGAC TTAATCACTG AGAGTTTGGG TGGTGGTTTT	960
GGATTTAATG ACACAACCTG TAGCATGCAG TGTTACTTAA GAC	1003

(2) Informace pro SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 736 párů basí

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...736
- (D) Jiné informace: /note = "1Ex13"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 15:

```

GTCTTTCCCA TCTTCTCCAC AGGGTTTGTG CCTTACATTA TTA CTCTTG CCATTTTCAA      60
GAAAGCATTG CCAGCTCTTC CAATCTCCAT CACCTTTGGG CTGTGTTTCT ACTTTGCCAC      120
AGATTATCTT GTACAGCCTT TTATGGACCA ATTAGCATTG CATCAATTTT ATATCTAGCA      180
TATTTGCGGT TAGAATCCCA TGGATGTTTC TTCTTTGACT ATAACAAAAT CTGGGGAGGA      240
CAAAGGTGAT TTCCTGTGTC CACATCTAAC AAATCAAGAT CCCC GGCTGG ACTTTTGGAG      300
GTTCTTTCCA AGTCTTCCTG ACCACCTTGC ACTATTGGAC TTTGGAAGGA GGTGCCTATA      360
GAAAACGATT TTGAACATAC TTCATCGCAG TGGACTGTGT CCTCGGTGCA GAAACTACCA      420
GATTTGAGGG ACGAGGTCAA GGAGATATGA TAGGCCCCGA AGTTGCTGTG CCCCATCAGC      480
AGCTTGACGC GTGGTCACAG GACGATTTTC ACTGACACTG CGAACTCTCA GGACTACCGT      540
TACCAAGAGG TTAGGTGAAG TGGTTTAAAC CAAACGGAAC TCTTCATCTT AACTACACG      600
TTGAAAATCA ACCCAATAAT TCTGTATTAA CTGAATTCTG AACTTTTCAG GAGGTACTGT      660
GAGGAAGAGC AGGCACCACC AGCAGAATGG GGAATGGAGA GGTGGGCAGG GGTTCAGCT      720
TCCCTTTGAT TTTTGG                                     736

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1964 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 188...1588

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...1964
- (D) Jiné informace: /note = "mPS1"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 16:

```

ACCANACANC GGCAGCTGAG GCGGAAACCT AGGCTGCGAG CCGGCCGCCC GGGCGCGGAG      60
AGAGAAGGAA CCAACACAAG ACAGCAGCCC TTCGAGGTCT TTAGGCAGCT TGGAGGAGAA      120
CACATGAGAG AAAGAATCCC AAGAGGTTTT GTTTTCTTTG AGAAGGTATT TCTGTCCAGC      180
TGCTCCA ATG ACA GAG ATA CCT GCA CCT TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCC      229
      Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala
           1             5             10
CAG ATG TCT GAG GAC AGC CAC TCC AGC AGC GCC ATC CGG AGC CAG AAT      277
Gln Met Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn
      15             20             25             30
GAC AGC CAA GAA CGG CAG CAG CAG CAT GAC AGG CAG AGA CTT GAC AAC      325
Asp Ser Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp Asn
           35             40             45
CCT GAG CCA ATA TCT AAT GGG CGG CCC CAG AGT AAC TCA AGA CAG GTG      373
Pro Glu Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg Gln Val
           50             55             60
GTG GAA CAA GAT GAG GAG GAA GAC GAA GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGA      421
Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Lys Tyr Gly
           65             70             75
GCC AAG CAT GTC ATC ATG CTC TTT GTC CCC GTG ACC CTC TGC ATG GTC      469
Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val
           80             85             90
GTC GTC GTG GCC ACC ATC AAA TCA GTC AGC TTC TAT ACC CGG AAG GAC      517
Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp
           95             100             105             110
GGT CAG CTA ATC TAC ACC CCA TTC ACA GAA GAC ACT GAG ACT GTA GGC      565
Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly
           115             120             125

```

CAA AGA GCC CTG CAC TCG ATC CTG AAT GCG GCC ATC ATG ATC AGT GTC Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val 130 135 140	613
ATT GTC ATT ATG ACC ATC CTC CTG GTG GTC CTG TAT AAA TAC AGG TGC Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys 145 150 155	661
TAC AAG GTC ATC CAC GCC TGG CTT ATT ATT TCA TCT CTG TTG TTG CTG Tyr Lys Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu 160 165 170	709
TTC TTT TTT TCG TTC ATT TAC TTA GGG GAA GTA TTT AAG ACC TAC AAT Phe Phe Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn 175 180 185 190	757
GTC GCC GTG GAC TAC GTT ACA GTA GCA CTC CTA ATC TGG AAT TTT GGT Val Ala Val Asp Tyr Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly 195 200 205	805
GTG GTC GGG ATG ATT GCC ATC CAC TGG AAA GGC CCC CTT CGA CTG CAG Val Val Gly Met Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln 210 215 220	853
CAG GCG TAT CTC ATT ATG ATC AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTA TTT ATC Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile 225 230 235	901
AAG TAC CTC CCC GAA TGG ACC GCA TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser 240 245 250	949
GTA TAT GAT TTG GTG GCT GTT TTA TGT CCC AAA GGC CCA CTT CGT ATG Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 255 260 265 270	997
CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAA AGA AAT GAG ACT CTC TTT CCA GCT CTT Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu 275 280 285	1045
ATC TAT TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCT GAA GGA GAC Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp 290 295 300	1093
CCA GAA GCC CAA AGG AGG GTA CCC AAG AAC CCC AAG TAT AAC ACA CAA Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr Asn Thr Gln 305 310 315	1141
AGA GCG GAG AGA GAG ACA CAG GAC AGT GGT TCT GGG AAC GAT GAT GGT Arg Ala Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly Asn Asp Asp Gly 320 325 330	1189
GGC TTC AGT GAG GAG TGG GAG GCC CAA AGA GAC AGT CAC CTG GGG CCT Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro 335 340 345 350	1237
CAT CGC TCC ACT CCC GAG TCA AGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCT GGG His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Gly 355 360 365	1285

AGC ATT CTA ACG AGT GAA GAC CCG GAG GAA AGA GGA GTA AAA CTT GGA Ser Ile Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly 370 375 380	1333
CTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAG GCC TCA GCA Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala 385 390 395	1381
ACC GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGC TTT GTA GCC ATA Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile 400 405 410	1429
CTG ATC GGC CTG TGC CTT ACA TTA CTC CTG CTC GCC ATT TTC AAG AAA Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys 415 420 425 430	1477
GCG TTG CCA GCC CTC CCC ATC TCC ATC ACC TTC GGG CTC GTG TTC TAC Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr 435 440 445	1525
TTC GCC ACG GAT TAC CTT GTG CAG CCC TTC ATG GAC CAA CTT GCA TTC Phe Ala Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe 450 455 460	1573
CAT CAG TTT TAT ATC TAGCCTTTCT GCAGTTAGAA CATGGATGTT TCTTCTTTGA His Gln Phe Tyr Ile 465	1628
TTATCAAAAA CACAAAAACA GAGAGCAAGC CCGAGGAGGA GACTGGTGAC TTCCTGTGT	1688
CCTCAGCTAA CAAAGGCAGG ACTCCAGCTG GACTTCTGCA GCTTCCTTCC GAGTCTCCCT	1748
AGCCACCCGC ACTACTGGAC TGTGGAAGGA AGCGTCTACA GAGGAACGGT TTCCAACATC	1808
CATCGCTGCA GCAGACGGTG TCCCTCAGTG ACTTGAGAGA CAAGGACAAG GAAATGTGCT	1868
GGGCCAAGGA GCTGCCGTGC TCTGCTAGCT TTGACCGTGG GCATGGAGAT TTACCCGCAC	1928
TGTGAACTCT CTAAGGTAAA CAAAGTGAGG TGAACC	1964

(2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 467 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
 1 5 10 15
 Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn Asp Ser
 20 25 30
 Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp Asn Pro Glu
 35 40 45
 Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg Gln Val Val Glu
 50 55 60
 Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys
 65 70 75 80
 His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val
 85 90 95
 Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln
 100 105 110
 Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg
 115 120 125
 Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val
 130 135 140
 Ile Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys
 145 150 155 160
 Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe
 165 170 175
 Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala
 180 185 190
 Val Asp Tyr Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val
 195 200 205
 Gly Met Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala
 210 215 220
 Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr
 245 250 255
 Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val
 260 265 270
 Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr
 275 280 285
 Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu
 290 295 300
 Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr Asn Thr Gln Arg Ala
 305 310 315 320
 Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly Asn Asp Asp Gly Gly Phe
 325 330 335

```

Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg
      340                      345                      350
Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Gly Ser Ile
      355                      360                      365
Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly
      370                      375                      380
Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala
      385                      390                      395                      400
Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile
      405                      410                      415
Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu
      420                      425                      430
Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala
      435                      440                      445
Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln
      450                      455                      460
Phe Tyr Ile
      465

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 2229 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 366...1712

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature
- (B) Umístění: 1...2226
- (D) Jiné informace: /note = "hPS2"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

GAATTCGGCA CGAGGGCATT TCCAGCAGTG AGGAGACAGC CAGAAGCAAG CTTTTGGAGC 60
 TGAAGGAACC TGAGACAGAA GCTAGTCCCC CCTCTGAATT TTACTGATGA AGAAACTGAG 120
 GCCACAGAGC TAAAGTGA CT TTTCCCAAGG TCGCCAGCG AGGACGTGGG ACTTCTCAGA 180
 CGTCAGGAGA GTGATGTGAG GGAGCTGTGT GACCATAGAA AGTGACGTGT TAAAAACCAG 240
 CGCTGCCCTC TTTGAAAGCC AGGGAGCATC ATTCATTTAG CCTGCTGAGA AGAAGAAACC 300
 AAGTGTCGGG GATTCAAGAC CTCTCTGCGG CCCCAGTGT TCGTGGTGCT TCCAGAGGCA 360
 GGGCT ATG CTC ACA TTC ATG GCC TCT GAC AGC GAG GAA GAA GTG TGT 407
 Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys
 1 5 10
 GAT GAG CGG ACG TCC CTA ATG TCG GCC GAG AGC CCC ACG CCG CGC TCC 455
 Asp Glu Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser
 15 20 25 30
 TGC CAG GAG GGC AGG CAG GGC CCA GAG GAT GGA GAG AAT ACT GCC CAG 503
 Cys Gln Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln
 35 40 45
 TGG AGA AGC CAG GAG AAC GAG GAG GAC GGT GAG GAG GAC CCT GAC CGC 551
 Trp Arg Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg
 50 55 60
 TAT GTC TGT AGT GGG GTT CCC GGG CGG CCG CCA GGC CTG GAG GAA GAG 599
 Tyr Val Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu
 65 70 75
 CTG ACC CTC AAA TAC GGA GCG AAG CAT GTG ATC ATG CTG TTT GTG CCT 647
 Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro
 80 85 90
 GTC ACT CTG TGC ATG ATC GTG GTG GTA GCC ACC ATC AAG TCT GTG CGC 695
 Val Thr Leu Cys Met Ile Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Arg
 95 100 105 110
 TTC TAC ACA GAG AAG AAT GGA CAG CTC ATC TAC ACG CCA TTC ACT GAG 743
 Phe Tyr Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu
 115 120 125
 GAC ACA CCC TCG GTG GGC CAG CGC CTC CTC AAC TCC GTG CTG AAC ACC 791
 Asp Thr Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn Ser Val Leu Asn Thr
 130 135 140
 CTC ATC ATG ATC AGC GTC ATC GTG GTT ATG ACC ATC TTC TTG GTG GTG 839
 Leu Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Phe Leu Val Val
 145 150 155
 CTC TAC AAG TAC CGC TGC TAC AAG TTC ATC CAT GGC TGG TTG ATC ATG 887
 Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Phe Ile His Gly Trp Leu Ile Met
 160 165 170
 TCT TCA CTG ATG CTG CTG TTC CTC TTC ACC TAT ATC TAC CTT GGG GAA 935
 Ser Ser Leu Met Leu Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Ile Tyr Leu Gly Glu
 175 180 185 190
 GTG CTC AAG ACC TAC AAT GTG GCC ATG GAC TAC CCC ACC CTC TTG CTG 983
 Val Leu Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu
 195 200 205
 ACT GTC TGG AAC TTC GGG GCA GTG GGC ATG GTG TGC ATC CAC TGG AAG 1031
 Thr Val Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys
 210 215 220
 GGC CCT CTG GTG CTG CAG CAG GCC TAC CTC ATC ATG ATC AGT GCG CTC 1079
 Gly Pro Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu
 225 230 235

ATG GCC CTA GTG TTC ATC AAG TAC CTC CCA GAG TGG TCC GCG TGG GTC Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val 240 245 250	1127
ATC CTG GGC GCC ATC TCT GTG TAT GAT CTC GTG GCT GTG CTG TGT CCC Ile Leu Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro 255 260 265 270	1175
AAA GGG CCT CTG AGA ATG CTG GTA GAA ACT GCC CAG GAG AGA AAT GAG Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu 275 280 285	1223
CCC ATA TTC CCT GCC CTG ATA TAC TCA TCT GCC ATG GTG TGG ACG GTT Pro Ile Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Met Val Trp Thr Val 290 295 300	1271
GGC ATG GCG AAG CTG GAC CCC TCC TCT CAG GGT GCC CTC CAG CTC CCC Gly Met Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro 305 310 315	1319
TAC GAC CCG GAG ATG GAA GAA GAC TCC TAT GAC AGT TTT GGG GAG CCT Tyr Asp Pro Glu Met Glu Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro 320 325 330	1367
TCA TAC CCC GAA GTC TTT GAG CCT CCC TTG ACT GGC TAC CCA GGG GAG Ser Tyr Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu 335 340 345 350	1415
GAG CTG GAG GAA GAG GAG GAA AGG GGC GTG AAG CTT GGC CTC GGG GAC Glu Leu Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp 355 360 365	1463
TTC ATC TTC TAC AGT GTG CTG GTG GGC AAG GCG GCT GCC ACG GGC AGC Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser 370 375 380	1511
GGG GAC TGG AAT ACC ACG CTG GCC TGC TTC GTG GCC ATC CTC ATT GGC Gly Asp Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly 385 390 395	1559
TTG TGT CTG ACC CTC CTG CTG CTT GCT GTG TTC AAG AAG GCG CTG CCC Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro 400 405 410	1607
GCC CTC CCC ATC TCC ATC ACG TTC GGG CTC ATC TTT TAC TTC TCC ACG Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr 415 420 425 430	1655
GAC AAC CTG GTG CGG CCG TTC ATG GAC ACC CTG GCC TCC CAT CAG CTC Asp Asn Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu 435 440 445	1703
TAC ATC TGA GGGACATGGT GTGCCACAGG CTGCAAGCTG CAGGGAATTT Tyr Ile *	1752
TCATTGGATG CAGTTGTATA GTTTTACACT CTAGTGCCAT ATATTTTAA GACTTTTCTT	1812
TCCTTAAAAA ATAAAGTACG TGTTTACTTG GTGAGGAGGA GGCAGAACCA GCTCTTTGGT	1872
GCCAGCTGTT TCATCACCAG ACTTTGGCTC CCGCTTTGGG GAGCGCCTCG CTTCACGGAC	1932
AGGAAGCACA GCAGGTTTAT CCAGATGAAC TGAGAAGGTC AGATTAGGGT GGGGAGAAGA	1992
GCATCCGGCA TGAGGGCTGA GATGCCCAA GAGTGTGCTC GGGAGTGGCC CCTGGCACCT	2052
GGGTGCTCTG GCTGGAGAGG AAAAGCCAGT TCCCTACGAG GAGTGTTCCT AATGCTTTGT	2112
CCATGATGTC CTTGTTATTT TATTNCCYTT ANAACTGAN TCCTNTNTTT NTDCGGCAG	2172
TCACMCTNCT GGGRAGTGGC TTAATAGTAA NATCAATAAA NAGNTGAGTC CTNTTAG	2229

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 449 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 19:

```

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

```

```

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

```

```

Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys Gly Pro
210                215                220

Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala
225                230                235                240

Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val Ile Leu
                245                250                255

Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly
                260                265                270

Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Pro Ile
                275                280                285

Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ala Met Val Trp Thr Val Gly Met
290                295                300

Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro Tyr Asp
305                310                315                320

Pro Glu Met Glu Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro Ser Tyr
                325                330                335

Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Glu Leu
                340                345                350

Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile
355                360                365

Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp
370                375                380

Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys
385                390                395                400

Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu
                405                410                415

Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr Asp Asn
                420                425                430

Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu Tyr Ile
435                440                445

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 1895 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

(A) Jméno/klíč: CDS

(B) Umístění: 140...1762

(ix) Vlastosti:

(A) Jméno/klíč: misc_feature

(B) Umístění: 1...1895

(D) Jiné informace: /note = "DmPS"

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

TATATGAGTC GCTTTAAAAC AAAAGAAAGT TTTTACCAGC TACATTCCTT TGGTTTCCTT	60
AACTAAATCC CATCACACAA CTACGGCTTC GCAGGGGGAG GCGTCCAGCG CTACGGAGGC	120
GAACGAACGC ACACCACTG ATG GCT GCT GTC AAT CTC CAG GCT TCG TGC TCC	172
Met Ala Ala Val Asn Leu Gln Ala Ser Cys Ser	
1 5 10	
TCC GGG CTC GCC TCT GAG GAT GAC GCC AAT GTG GGC AGC CAG ATA GGC	220
Ser Gly Leu Ala Ser Glu Asp Asp Ala Asn Val Gly Ser Gln Ile Gly	
15 20 25	
GCG GCG GAG CGT TTG GAA CGA CCT CCA AGG CGG CAA CAG CAG CGG AAC	268
Ala Ala Glu Arg Leu Glu Arg Pro Pro Arg Arg Gln Gln Gln Arg Asn	
30 35 40	
AAC TAC GGC TCC AGC AAT CAG GAT CAA CCG GAT GCT GCC ATA CTT GCT	316
Asn Tyr Gly Ser Ser Asn Gln Asp Gln Pro Asp Ala Ala Ile Leu Ala	
45 50 55	
GTG CCC AAT GTG GTG ATG CGT GAA CCT TGT GGC TCG CGC CCT TCA AGA	364
Val Pro Asn Val Val Met Arg Glu Pro Cys Gly Ser Arg Pro Ser Arg	
60 65 70 75	
CTG ACC GGT GGA GGA GGC GGC AGT GGT GGT CCG CCC ACA AAT GAA ATG	412
Leu Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Pro Thr Asn Glu Met	
80 85 90	
GAG GAA GAG CAG GGC CTG AAA TAC GGG GCC CAG CAT GTG ATC AAG TTA	460
Glu Glu Glu Gln Gly Leu Lys Tyr Gly Ala Gln His Val Ile Lys Leu	
95 100 105	
TTC GTC CCC GTC TCC CTT TGC ATG CTG GTA GTG GTG GCT ACC ATC AAC	508
Phe Val Pro Val Ser Leu Cys Met Leu Val Val Val Ala Thr Ile Asn	
110 115 120	
TCC ATC AGC TTC TAC AAC AGC ACG GAT GTC TAT CTC CTC TAC ACA CCT	556
Ser Ile Ser Phe Tyr Asn Ser Thr Asp Val Tyr Leu Leu Tyr Thr Pro	
125 130 135	
TTC CAT GAA CAA TCG CCC GAG CCT AGT GTT AAG TTC TGG AGT GCC TTG	604
Phe His Glu Gln Ser Pro Glu Pro Ser Val Lys Phe Trp Ser Ala Leu	
140 145 150 155	
GCG AAC TCC CTG ATC CTG ATG AGC GTG GTG GTG GTG ATG ACC TTT TTG	652
Ala Asn Ser Leu Ile Leu Met Ser Val Val Val Val Met Thr Phe Leu	
160 165 170	
CTG ATT GTT TTG TAC AAG AAG CGT TGC TAT CGC ATC ATT CAC GGC TGG	700
Leu Ile Val Leu Tyr Lys Lys Arg Cys Tyr Arg Ile Ile His Gly Trp	
175 180 185	

CTG ATT CTC TCC TCC TTC ATG TTG TTG TTC ATT TTT ACG TAC TTA TAT Leu Ile Leu Ser Ser Phe Met Leu Leu Phe Ile Phe Thr Tyr Leu Tyr 190 195 200	748
TTG GAA GAG CTT CTT CGC GCC TAT AAC ATA CCG ATG GAC TAC CCT ACT Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ala Tyr Asn Ile Pro Met Asp Tyr Pro Thr 205 210 215	796
GCA CTA CTG ATT ATG TGG AAC TTT GGA GTG GTC GGA ATG ATG TCC ATC Ala Leu Leu Ile Met Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met Met Ser Ile 220 225 230 235	844
CAT TGG CAG GGA CCT CTG CGG TTG CAG CAA GGA TAT CTC ATT TTC GTG His Trp Gln Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Gly Tyr Leu Ile Phe Val 240 245 250	892
GCA GCC TTG ATG GCC TTG GTG TTC ATT AAA TAC CTG CCT GAA TGG ACT Ala Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr 255 260 265	940
GCC TGG GCT GTA TTG GCT GCC ATT TCT ATT TGG GAT CTT ATT GCT GTC Ala Trp Ala Val Leu Ala Ala Ile Ser Ile Trp Asp Leu Ile Ala Val 270 275 280	988
CTT TCG CCA AGA GGA CCC CTC CGC ATT CTG GTG GAA ACG GCT CAG GAG Leu Ser Pro Arg Gly Pro Leu Arg Ile Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu 285 290 295	1036
CGA AAT GAG CAA ATC TTC CCC GCT CTG ATT TAT TCA TCC ACT GTC GTT Arg Asn Glu Gln Ile Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Val Val 300 305 310 315	1084
TAC GCA CTT GTA AAC ACT GTT ACG CCG CAG CAA TCG CAG GCC ACA GCT Tyr Ala Leu Val Asn Thr Val Thr Pro Gln Gln Ser Gln Ala Thr Ala 320 325 330	1132
TCC TCC TCG CCG TCG TCC AGC AAC TCC ACC ACA ACC ACG AGG GCC ACG Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Asn Ser Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr 335 340 345	1180
CAG AAC TCG CTG GCT TCG CCA GAG GCA GCA GCG GCT AGT GGC CAA CGC Gln Asn Ser Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Ala Ala Ser Gly Gln Arg 350 355 360	1228
ACA GGT AAC TCC CAT CCT CGA CAG AAT CAG CGG GAT GAC GGC AGT GTA Thr Gly Asn Ser His Pro Arg Gln Asn Gln Arg Asp Asp Gly Ser Val 365 370 375	1276
CTG GCA ACT GAA GGT ATG CCA CTT GTG ACT TTT AAA AGC AAT TTG CGC Leu Ala Thr Glu Gly Met Pro Leu Val Thr Phe Lys Ser Asn Leu Arg 380 385 390 395	1324
GGA AAC GCT GAG GCT GCG GGT TTC ACG CAA GAG TGG TCA GCT AAC TTG Gly Asn Ala Glu Ala Ala Gly Phe Thr Gln Glu Trp Ser Ala Asn Leu 400 405 410	1372
AGC GAA CGT GTG GCT CGT CGC CAG ATT GAA GTT CAA AGT ACT CAG AGT Ser Glu Arg Val Ala Arg Arg Gln Ile Glu Val Gln Ser Thr Gln Ser 415 420 425	1420
GGA AAC GCT CAG CGC TCC AAC GAG TAT AGG ACA GTA ACA GCT CCG GAT Gly Asn Ala Gln Arg Ser Asn Glu Tyr Arg Thr Val Thr Ala Pro Asp 430 435 440	1468
CAG AAT CAT CCG GAT GGG CAA GAA GAA CGT GGC ATA AAG CTT GGC CTC Gln Asn His Pro Asp Gly Gln Glu Glu Arg Gly Ile Lys Leu Gly Leu 445 450 455	1516
GGC GAC TTC ATC TTC TAC TCG GTA TTA GTG GGC AAG GCC TCC AGC TAC Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ser Tyr 460 465 470 475	1564

```

GGC GAC TGG ACG ACC ACA ATC GCT TGC TTT GTG GCC ATC CTC ATT GGA      1612
Gly Asp Trp Thr Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly
                                480                                485                                490

CTC TGC CTC ACT CTT CTG CTT CTG GCC ATT TGG CGC AAG GCG CTA CCC      1660
Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Trp Arg Lys Ala Leu Pro
                                495                                500                                505

GCC CTG CCC ATC TCA ATA ACG TTC GGA TTG ATA TTT TGC TTC GCC ACT      1708
Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Cys Phe Ala Thr
                                510                                515                                520

AGT GCG GTG GTC AAG CCG TTC ATG GAG GAT CTA TCG GCC AAG CAG GTG      1756
Ser Ala Val Val Lys Pro Phe Met Glu Asp Leu Ser Ala Lys Gln Val
                                525                                530                                535

TTT ATA TAAACTTGAA AAGACAAGGA CACATCAAGT GTCTTACAGT ATCATAGTCT      1812
Phe Ile
540

AACAAAGCTT TTTGTAATCC AATTCTTTAT TTAACCAAAT GCATAGTAAC AACCTCGACT      1872

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA                                             1895

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 541 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

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

```

Met Ala Ala Val Asn Leu Gln Ala Ser Cys Ser Ser Gly Leu Ala Ser
 1          5          10          15

Glu Asp Asp Ala Asn Val Gly Ser Gln Ile Gly Ala Ala Glu Arg Leu
 20          25          30

Glu Arg Pro Pro Arg Arg Gln Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Gly Ser Ser
 35          40          45

Asn Gln Asp Gln Pro Asp Ala Ala Ile Leu Ala Val Pro Asn Val Val
 50          55          60

Met Arg Glu Pro Cys Gly Ser Arg Pro Ser Arg Leu Thr Gly Gly Gly
 65          70          75          80

```

Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Pro	Pro	Thr	Asn	Glu	Met	Glu	Glu	Glu	Gln	Gly	85	90	95
Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Gln	His	Val	Ile	Lys	Leu	Phe	Val	Pro	Val	Ser	100	105	110
Leu	Cys	Met	Leu	Val	Val	Val	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Phe	Tyr	115	120	125
Asn	Ser	Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Pro	Phe	His	Glu	Gln	Ser	130	135	140
Pro	Glu	Pro	Ser	Val	Lys	Phe	Trp	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Ser	Leu	Ile	145	150	160
Leu	Met	Ser	Val	Val	Val	Val	Met	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Tyr	165	170	175
Lys	Lys	Arg	Cys	Tyr	Arg	Ile	Ile	His	Gly	Trp	Leu	Ile	Leu	Ser	Ser	180	185	190
Phe	Met	Leu	Leu	Phe	Ile	Phe	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	195	200	205
Arg	Ala	Tyr	Asn	Ile	Pro	Met	Asp	Tyr	Pro	Thr	Ala	Leu	Leu	Ile	Met	210	215	220
Trp	Asn	Phe	Gly	Val	Val	Gly	Met	Met	Ser	Ile	His	Trp	Gln	Gly	Pro	225	230	235
Leu	Arg	Leu	Gln	Gln	Gly	Tyr	Leu	Ile	Phe	Val	Ala	Ala	Leu	Met	Ala	245	250	255
Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Tyr	Leu	Pro	Glu	Trp	Thr	Ala	Trp	Ala	Val	Leu	260	265	270
Ala	Ala	Ile	Ser	Ile	Trp	Asp	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	275	280	285
Pro	Leu	Arg	Ile	Leu	Val	Glu	Thr	Ala	Gln	Glu	Arg	Asn	Glu	Gln	Ile	290	295	300
Phe	Pro	Ala	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ser	Thr	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Val	Asn	305	310	315
Thr	Val	Thr	Pro	Gln	Gln	Ser	Gln	Ala	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	325	330	335
Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Gln	Asn	Ser	Leu	Ala	340	345	350
Ser	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Gln	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	His	355	360	365
Pro	Arg	Gln	Asn	Gln	Arg	Asp	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	370	375	380
Met	Pro	Leu	Val	Thr	Phe	Lys	Ser	Asn	Leu	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Ala	385	390	395
Ala	Gly	Phe	Thr	Gln	Glu	Trp	Ser	Ala	Asn	Leu	Ser	Glu	Arg	Val	Ala	405	410	415
Arg	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Gly	Asn	Ala	Gln	Arg	420	425	430

```

Ser Asn Glu Tyr Arg Thr Val Thr Ala Pro Asp Gln Asn His Pro Asp
      435                      440                      445
Gly Gln Glu Glu Arg Gly Ile Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe
      450                      455                      460
Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ser Tyr Gly Asp Trp Thr Thr
465                      470                      475                      480
Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu Thr Leu
      485                      490                      495
Leu Leu Leu Ala Ile Trp Arg Lys Ala Leu Pro Ala Leu Pro Ile Ser
      500                      505                      510
Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Cys Phe Ala Thr Ser Ala Val Val Lys
      515                      520                      525
Pro Phe Met Glu Asp Leu Ser Ala Lys Gln Val Phe Ile
      530                      535                      540

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 21 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

CTNCCNGART GGACNGYCTG G

(2) Informace pro SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 21 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 23:

RCANGCDANT GTNGTRTTCC A

(2) Informace pro SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 32 párů basí

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 24:

TTTTTCTCG AGACNCNCA RGARAGAAAY GA

(2) Informace pro SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 29 párů basí

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 25:

TTTTTTGGAT CCTARAADAT RAARTCNCC

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kodující protein vybraný ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

2. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje normální presenilin-1 protein a kde je uvedená nukleotidová sekvence vybrána ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 2;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 4;

(3) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro myší presenilin-1 podle SEQ ID NO: 17;

(4) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 2, kde je zbytek 257 nahrazen alaninem a zbytky 258 - 290 jsou vynechány;

(5) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 4, kde je zbytek 253 nahrazen alaninem a zbytky 254 - 286 jsou vynechány; a

(6) sekvence kodující normální presenilin-1 protein a schopné

hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) - (5) za podmínek přísné hybridizace.

3. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje mutantní presenilin-1 protein, kde uvedená sekvence nukleotidů koduje alespoň jednu mutaci korespondující mutaci SEQ ID NO: 2 vybrané ze skupiny skládající se z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163R, H163Y, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280A, E280G, A285V, L286V, _291-319, G384A, L392V A C410Y; a kde uvedená nukleotidová sekvence jinak koresponduje nukleotidové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 2;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 4;

(3) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro myší presenilin-1 podle SEQ ID NO: 17;

(4) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 2, kde je zbytek 257 nahrazen alaninem a zbytky 258 - 290 jsou vynechány;

(5) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 4, kde je zbytek 253 nahrazen alaninem a zbytky 254 - 286 jsou vynechány; a

(6) sekvence kodující normální presenilin-1 protein a schopné hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) - (5) za podmínek přísné hybridizace.

4. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje mutantní presenilin-1 protein, kde uvedená sekvence nukleotidů koduje alespoň jednu mutaci korespondující mutaci SEQ ID NO: 19 vybrané ze skupiny skládající se z M239V, N141I a I420T; a kde uvedené nukleotidová sekvence jinak korespondují nukleotidové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 2;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-1 podle SEQ ID NO: 4;

(3) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro myší presenilin-1 podle SEQ ID NO: 17;

(4) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 2, kde je zbytek 257 nahrazen alaninem a zbytky 258 - 290 jsou vynechány;

(5) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO: 4, kde je zbytek 253 nahrazen alaninem a zbytky 254 - 286 jsou vynechány; a

(6) sekvence kodující normální presenilin-1 protein a schopné hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) -

(5) za podmínek přísné hybridizace.

5. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje normální presenilin-2 protein a kde je uvedená nukleotidová sekvence vybrána ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19, kde jsou zbytky 263 - 296 vynechány;

(3) sekvence kodující normální presenilin-2 protein a schopné hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) - (2) za podmínek přísné hybridizace.

6. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje mutantní presenilin-2 protein, kde uvedená sekvence nukleotidů koduje alespoň jednu mutaci korespondující mutaci SEQ ID NO: 19 vybrané ze skupiny skládající se z M239V, N141I a I420T; a kde uvedená nukleotidová sekvence jinak koresponduje nukleotidové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19, kde jsou zbytky 263 - 296 vynechány;

(3) sekvence kodující normální presenilin-2 protein a schopné hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) - (2) za podmínek přísné hybridizace.

7. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina koduje mutantní presenilin-2 protein, kde uvedená sekvence nukleotidů koduje alespoň jednu mutaci korespondující mutaci SEQ ID NO: 2 vybrané ze skupiny skládající se z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163R, H163Y, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280A, E280G, A285V, L286V, _291-319, G384A, L392V A C410Y; a kde uvedená nukleotidová sekvence jinak koresponduje nukleotidové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19;

(2) sekvence kodující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci pro lidský presenilin-2 podle SEQ ID NO: 19, kde jsou zbytky 263 - 296 vynechány;

(3) sekvence kodující normální presenilin-2 protein a schopné hybridizace na sekvenci komplementární k jakékoliv sekvenci (1) - (2) za podmínek přísné hybridizace.

8. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci o alespoň 10 sousedních nukleotidech vybranou ze skupiny

skládající se z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencí komplementárních k jakékoliv z těchto sekvencí.

9. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci o alespoň 15 sousedních nukleotidech vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencí komplementárních k jakékoliv z těchto sekvencí.

10. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci o alespoň 20 sousedních nukleotidech vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencí komplementárních k jakékoliv z těchto sekvencí.

11. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň 10 sousedních nukleotidů z presenilinového insertu v plasmidu vybraném ze skupiny skládající se z ATCC přírůstkové č. 97214, ATCC přírůstkové č. 97508, ATCC přírůstkové č. 97124 a ATCC přírůstkové č. 97428.

12. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kodující alespoň jednu funkční doménu presenilinového proteinu vybraného ze skupiny skládající se z normálního

presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

13. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 12, kde uvedená funkční doména je presenilin-1 funkční doména korespondující doméně vybrané ze skupiny skládající se z presenilin-1 N-koncové, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncové domény.

14. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 12, kde uvedená funkční doména je presenilin-2 funkční doména korespondující doméně vybrané ze skupiny skládající se z presenilin-2 N-koncové, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncové domény.

15. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kodující antigení determinantu presenilinového proteinu vybraného ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

16. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 15, kde uvedená sekvence koduje presenilin-1 antigení determinantu korespondující presenilin-1 antigení determinantě vybrané ze skupiny skládající se z aminokyselinových zbytků 27 - 44, 28 - 61, 46 - 48, 50 - 60, 65 - 71, 66 - 67, 107 - 111, 109 - 112, 120 - 121, 120 - 122, 125 - 126, 155 - 160, 185 - 189, 214 - 223, 218 - 221, 220 - 230, 240 - 245, 241 - 243, 267 - 269, 273 - 282, 300 - 370, 302 - 310, 311 - 325, 332 - 342, 346 - 359, 372 - 382, 400 - 410 a 400 - 420 SEQ

ID NO: 2.

17. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 15, kde uvedená sekvence koduje presenilin-2 antigení determinantu korespondující presenilin-2 antigení determinantě vybrané ze skupiny skládající se z aminokyselinových zbytků 25 - 45, 50 - 63, 70 - 75, 114 - 120, 127 - 132, 162 - 167, 221 - 226, 282 - 290, 310 - 314, 321 - 338, 345 - 352, 380 - 390 a 430 - 435 SEQ ID NO: 19.

18. Způsob pro identifikaci alelických variant nebo heterospecifických homologů lidského presenilinového genu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

vybrání nukleokyselinové proby nebo primeru schopného hybridizace na sekvenci lidského genu pro presenilin za přísných hybridizačních podmínek;

smísení uvedené proby nebo primeru se vzorkem nukleové kyseliny, který může obsahovat nukleovou kyselinu korespondující uvedené variantě nebo homologu;

detekci hybridizace uvedené proby nebo primeru na nukleovou kyselinu korespondující uvedené variantě nebo homologu.

19. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek nukleové kyseliny vybraný ze skupiny skládající se z lidské genomové DNA, lidské mRNA a lidské cDNA.

20. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek nukleové kyseliny vybraný ze

skupiny skládající se ze savčí genomové DNA, savčí mRNA a savčí cDNA.

21. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek nukleové kyseliny vybraný ze skupiny skládající se z genomové DNA, mRNA a cDNA od bezobratlých.

22. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok izolace uvedené nukleové kyseliny korespondující uvedené variantě nebo homologu.

23. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená nukleová kyselina je identifikována hybridizací.

24. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená nukleová kyselina je identifikována PCR amplifikací.

25. Způsob pro identifikaci alelických variant nebo heterospecifických homologů lidského presenilinového genu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

vybrání protilátky schopné selektivní vazby na lidský presenilinový protein;

smísení uvedené protilátky se vzorkem proteinů , který může obsahovat proteiny korespondující uvedené variantě nebo homologu;

detekci vazby uvedené protilátky ne uvedený protein korespondující uvedené variantě nebo homologu.

26. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek proteinů vybraných ze skupiny skládající se z lidských proteinů, lidských fúsních proteinů a jejich proteolytických fragmentů.

27. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek nukleových kyselin vybraných ze skupiny skládající se z savčích proteinů, savčích fúsních proteinů a jejich proteolytických fragmentů.

28. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vzorek obsahuje vzorek nukleových kyselin vybraný ze skupiny skládající se proteinů od bezobratlých, fúsních proteinů od bezobratlých a jejich proteolytických fragmentů.

29. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje podstatného čištění uvedeného proteinu korespondujícího variantě nebo homologu.

30. Izolovaná nukleová kyselina obsahující alelickou variantu nebo heterospecifický homolog lidského genu pro presenilin.

31. Izolovaná nukleová kyselina kodující alelickou variantu nebo heterospecifický homolog lidského presenilinového proteinu.

32. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 31, kde uvedená nukleová kyselina koduje *Drosophila melanogaster* homolog lidského genu pro presenilin.

33. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 32, kde uvedená nukleová kyselina obsahuje nukleotidovou sekvenci vybranou ze

skupiny skládající se z:

(1) sekvence kodující protein obsahující DmPS aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 21;

(2) sekvence kodující presenilinový homologní protein a schopné hybridizace k sekvenci komplementární k sekvenci (1) za přísných hybridizačních podmínek.

34. Izolovaná nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci alespoň 10 sousedních nukleotidů vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 21 a sekvence komplementární k SEQ ID NO: 21.

35. Izolovaná nukleová kyselina obsahující rekombinantní vektor obsahující nukleotidovou sekvenci podle jakéhokoliv z nároků 1 - 34.

36. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 35, kde uvedený vektor je expresní vektor a uvedená presenilinová nukleotidová sekvence e operativně připojena na regulační region.

37. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 36, kde uvedený expresní vektor může exprimovat uvedenou presenilinovou sekvenci v savčích buňkách.

38. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 37, kde jsou uvedené buňky vybrány ze skupiny skládající se z fibroblastových, jaterních, ledviných, sleziných neurologických buněk a buněk kostní dřeně.

39. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 37, kde uvedený vektor je vybrán ze skupiny skládající se z viru vakcinie, adenoviru, retroviru, neurotrofních virů a Herpes simplex viru.

40. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 36, kde uvedený expresní vektor koduje alespoň funkční doménu presenilinového proteinu vybranou ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1, mutantního presenilin-1, normálního presenilin-2 a mutantního presenilin-2.

41. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 36, kde uvedený vektor dále obsahuje sekvence kodující exogení protein operativně připojený na uvedenou presenilinovou sekvenci a kde uvedený vektor koduje presenilinový fúsní protein.

42. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 41, kde uvedený exogení protein je vybrán ze skupiny skládající se z lacZ, trpE, maltosového vazebného proteinu, poly-His smyček nebo glutathion-S-transferasy.

43. Izolovaná nukleová kyselina obsahující rekombinantní expresní vektor obsahující nukleotidové sekvence korespondující endogenímu regulačnímu regionu presenilinového genu.

44. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 43, kde je uvedený endogení regulační region operativně připojen na markerový gen.

45. Hostitelská buňka transformovaná expresním vektorem podle jakéhokoliv z nároků 36 - 44, nebo jejich potomstva.

46. Hostitelská buňka podle nároku 45, kde je uvedená hostitelská buňka vybrána ze skupiny skládající se z bakteriálních buněk a buněk kvasinek.

47. Hostitelská buňka podle nároku 45, kde je uvedená hostitelská buňka vybrána ze skupiny skládající se z fetálních buněk, emryonálních kmenových buněk, zygot, gamet a buněk zárodečné linie.

48. Hostitelská buňka podle nároku 45, kde je uvedená hostitelská buňka vybrána ze skupiny skládající se z fibroblastových, jaterních, ledviných, sleziných, neurologických buněk a buněk kostní dřeně.

49. Hostitelská buňka podle nároku 45, kde je uvedená buňka buňkou od bezobratlých.

50. Non-lidský zvířecí model pro Alzheimerovu chorobu, kde genom uvedeného zvířete, nebo jeho předchůdce, byl modifikován alespoň jedním rekombinantním konstruktem, a kde uvedený rekombinantní konstrukt obsahoval modifikace vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) inserce nukleotidových sekvencí kodujících alespoň funkční doménu heterospecifického normálního genu pro presenilin,

(2) inserce nukleotidových sekvencí kodujících alespoň funkční doménu heterospecifického mutantního genu pro presenilin,

(3) inserce nukleotidových sekvencí kodujících alespoň funkční doménu konspecifického homologu heterospecifického mutantního

genu pro presenilin, a

(4) inaktivace endogeního genu pro presenilin.

51. Zvíře podle nároku 50, kde uvedená modifikace je inserce nukleotidové sekvence kodující alespoň funkční doménu normální lidského genu pro presenilin-1.

52. Zvíře podle nároku 50, kde uvedená modifikace je inserce nukleotidové sekvence kodující alespoň funkční doménu mutantního lidského genu pro presenilin-1.

53. Zvíře podle nároku 50, kde uvedená modifikace je inserce nukleotidové sekvence kodující alespoň funkční doménu normální lidského genu pro presenilin-2.

54. Zvíře podle nároku 50, kde uvedená modifikace je inserce nukleotidové sekvence kodující alespoň funkční doménu mutantního lidského genu pro presenilin-2.

55. Zvíře podle nároku 50, kde uvedená modifikace je inserce nukleotidové sekvence kodující alespoň funkční doménu normálního nebo mutantního presenilinového proteinu.

56. Zvíře podle nároku 50, kde uvedené zvíře je vybráno ze skupiny skládající se z krys, myší, křečků, morčat, králíků, psů, koček, koz, ovcí, prasat, a non-lidských primátů.

57. Zvíře podle nároku 50, kde uvedené zvíře je bezobratlý.

58. Způsob pro produkci alespoň funkční domény presenilinového

proteinu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitelské buňky podle jakéhokoliv z nároků 45 - 49 za vhodných podmínek pro produkci uvedeného presenilinu prostřednictvím exprese uvedené nukleové kyseliny.

59. V podstatě čistý přípravek proteinu vybraný ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

60. V podstatě čistý přípravek podle nároku 59, kde uvedený protein obsahuje normální presenilin-1 protein vybraný ze skupiny skládající se z:

(1) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2;

(2) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4;

(3) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 17;

(4) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2, kde je zbytek 257 nahrazen alaninem a zbytky 258 - 290 jsou vynechány;

(5) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, kde je zbytek 253 nahrazen alaninem a zbytky 254 - 286 jsou vynechány.

61. V podstatě čistý přípravek podle nároku 59, kde uvedený protein obsahuje mutantní presenilin-1 protein obsahující alespoň jednu mutaci, která koresponduje mutaci SEQ ID NO: 2 vybrané ze skupiny skládající se z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163R, H163Y, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280A, E280G, A285V, L286V, 291-319, G384A, L392V A C410Y; a kde uvedený protein jinak koresponduje aminokyselinové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

- (1) aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 2;
- (2) aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 4;
- (3) aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 17;
- (4) aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 2, kde je zbytek 257 nahrazen alaninem a zbytky 258 - 290 jsou vynechány;
- (5) aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 4, kde je zbytek 253 nahrazen alaninem a zbytky 254 - 286 jsou vynechány.

62. V podstatě čistý přípravek podle nároku 59, kde uvedený protein obsahuje normální presenilin-2 protein vybraný ze skupiny skládající se z:

- (1) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 19; a
- (2) proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 19, kde jsou zbytky 263 - 296 vynechány.

63. V podstatě čistý přípravek podle nároku 59, kde uvedený protein obsahuje mutantní presenilin-2 protein obsahující alespoň jednu mutaci, která koresponduje mutaci SEQ ID NO: 19 vybrané ze skupiny skládající se z M239V, N141I a I420T; a kde uvedený protein jinak koresponduje aminokyselinové sekvenci vybrané ze skupiny skládající se z:

(1) aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 19; a

(2) aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 19, kde jsou zbytky 263 - 296 vynechány.

64. V podstatě čistý přípravek polypeptidu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci alespoň 5 sousedících aminokyselinových zbytků vybraných ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

65. V podstatě čistý přípravek polypeptidu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci alespoň 10 sousedících aminokyselinových zbytků vybraných ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

66. V podstatě čistý přípravek polypeptidu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci alespoň 15 sousedících aminokyselinových zbytků vybraných ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

67. V podstatě čistý přípravek polypeptidu obsahujícího alespoň jednu funkční doménu presenilinového proteinu vybraného

ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

68. V podstatě čistý přípravek podle nároku 67, kde uvedená funkční doména je presenilin-1 funkční doména korespondující doméně vybrané ze skupiny skládající se z presenilin-1 N-koncové, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncové domény.

69. V podstatě čistý přípravek podle nároku 67, kde uvedená funkční doména je presenilin-2 funkční doména korespondující doméně vybrané ze skupiny skládající se z presenilin-2 N-koncové, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncové domény.

70. V podstatě čistý přípravek polypeptidu obsahujícího antigení determinantu presenilinového proteinu vybraného ze skupiny skládající se z normálního presenilin-1 proteinu, mutantního presenilin-1 proteinu, normálního presenilin-2 proteinu a mutantního presenilin-2 proteinu.

71. V podstatě čistý přípravek podle nároku 70, kde uvedený polypeptid obsahuje presenilin-1 antigení determinantu korespondující presenilin-1 antigení determinantě vybrané ze skupiny nukleotidů skládající se z aminokyselinových zbytků 27 - 44, 28 - 61, 46 - 48, 50 - 60, 65 - 71, 66 - 67, 107 - 111, 109 - 112, 120 - 121, 120 - 122, 125 - 126, 155 - 160, 185 - 189, 214 - 223, 218 - 221, 220 - 230, 240 - 245, 241 - 243, 267 - 269, 273 - 282, 300 - 370, 302 - 310, 311 - 325, 332 - 342, 346 - 359, 372 - 382, 400 - 410 a 400 - 420 SEQ ID NO: 2.

72. V podstatě čistý přípravek podle nároku 70, kde uvedený polypeptid obsahuje presenilin-1 antigení determinantu korespondující presenilin-1 antigení determinantě vybrané ze skupiny nukleotidů skládající se z aminokyselinových zbytků 25 - 45, 50 - 63, 70 - 75, 114 - 120, 127 - 132, 162 - 167, 221 - 226, 282 - 290, 310 - 314, 321 - 338, 345 - 352, 380 - 390 a 430 - 435 SEQ ID NO: 19.

73. Způsob pro produkci protilátek, které se selektivně váží na presenilin v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

podání imunogenicky účinného množství presenilinového imunogenu zvířeti;

umožně produkce protilátek uvedeným zvířetem k uvedenému imunogenu; a

získání uvedených protilátek od uvedeného zvířete nebo z buněčné kultury od něj odvozené.

74. V podstatě čistý přípravek protilátky, která se selektivně váže na antigení determinanty presenilinového proteinu vybraného ze skupiny skládající se z normálního presenilinu-1, mutantního presenilinu-1, normálního presenilinu-2 a mutantního presenilinu-2.

75. V podstatě čistý přípravek protilátky podle nároku 74, kde uvedená protilátka se selektivně váže na antigení determinanty mutantního presenilinu-1 a selhává ve vazbě na normální

presenilin-1 protein.

76. V podstatě čistý přípravek protilátky podle nároku 74, kde uvedená protilátka se selektivně váže na antigení determinanty mutantního presenilinu-2 a selhává ve vazbě na normální presenilin-2 protein.

77. Buněčná linie produkující protilátky podle jakéhokoliv z nároků 74 - 76.

78. Způsob pro identifikování sloučenin, které mohou modulovat expresi genu pro presenilin v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

kontaktování buněk s testovaným kandidátem, kde uvedené buňky obsahují regulační region genu pro presenilin operativně připojený na kodující region; a

detekování změn v expresi uvedeného kodujícího regionu.

79. Způsob podle nároku 78 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna zahrnuje změnu na úrovni mRNA transkriptu kodovaného uvedeným kodujícím regionem.

80. Způsob podle nároku 78 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna zahrnuje změnu na úrovni proteinu kodovaného uvedeným kodujícím regionem.

81. Způsob podle nároku 78 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna je výsledkem aktivity proteinu kodovaného uvedeným kodujícím regionem.

82. Způsob podle nároku 78 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený kodující region koduje markerový protein vybraný ze skupiny skládající se z β -galaktosidasy, alkalické fosfatasy, zeleného fluorescentního proteinu a luciferasy.

83. Způsob pro identifikaci sloučenin, které se mohou selektivně vázat na presenilinový protein v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

poskytnutí přípravku obsahujícího alespoň jednu presenilinovou složku;

kontaktování uvedeného přípravku se vzorkem obsahujícím alespoň jednu kandidátovou sloučeninu; a

detekování vazby uvedené presenilinové složky na uvedenou kandidátovou sloučeninu.

84. Způsob podle nároku 83 v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazba na uvedenou presenilinovou složku je detekována testem vybraným ze skupiny skládající se z: afinitní chromatografie, ko-imunoprecipitace, Biomoecular Interaction Assay a kvasinkového dvouhybridového systému.

85. Způsob pro identifikování sloučenin, které mohou modulovat aktivitu presenilinu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky

poskytnutí buněk exprimujících normální nebo mutantní gen pro presenilin;

kontaktování buněk s alespoň jednou testovanou kandidátovou sloučeninou; a

detekování změn v markeru uvedené aktivity.

86. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že měření uvedeného markeru ukazuje rozdíl mezi buňkami nesoucími exprivovaný mutantní gen pro presenilin a jinak identickými buňkami bez exprivovaného mutantního genu pro presenilin.

87. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna obsahuje změnu v nespecifickém markeru buněčné fyziologie vybraném ze skupiny skládající se z pH, intracelulárního vápníku, hladin cyklického AMP, poměrů GTP/DP, aktivity fosfatidylinositolu, a proteinové fosforylace.

88. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna obsahuje změnu v expresi uvedeného presenilinu.

89. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna obsahuje změnu v intracelulární koncentraci nebo proudu iontů vybraných ze skupiny skládající se z Ca^{2+} , Na^+ a K^+ .

90. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna obsahuje změnu ve výskytu nebo stupni apoptosy nebo buněčné smrti.

91. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená změna obsahuje změnu v produkci A β peptidů.

92. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m,

že uvedená změna obsahuje změnu ve fosforylaci alespoň jednoho s mikrotubuly asociovaného proteinu.

93. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je buňka kultivovaná in vitro.

94. Způsob podle nároku 93 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je transformovaná hostitelská buňka podle jakéhokoliv z nároků 45 - 49.

95. Způsob podle nároku 93 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je explantována z hostitele nesoucího alespoň jeden mutantní gen pro presenilin.

96. Způsob podle nároku 93 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je explantována z transgeního zvířete podle jakéhokoliv z nároků 50 - 57.

97. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je buňka v živém zvířeti.

98. Způsob podle nároku 97 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je buňka transgeního zvířete podle jakéhokoliv z nároků 50 - 57.

99. Způsob podle nároku 85 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je v lidském subjektu v klinickém pokusu.

100. Diagnostická metoda pro určení toho, zda subjekt nese mutantní gen pro presenilin, která obsahuje kroky:

poskytnutí biologického vzorku od uvedeného subjektu;

detekování v uvedeném vzorku mutantní nukleové kyseliny pro presenilin, mutantního presenilinového proteinu, nebo aktivity mutantního presenilinu.

101. Způsob podle nároku 100 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mutantní presenilinová nukleová kyselina je detekována testem vybraným ze skupiny skládající se z přímého sekvencování nukleotidů, probové specifické hybridizace, trávení restrikcčními enzymy a mapování, PCR mapování, ligasou mediaované PCR detekce, RNAsové protekce, detekcí posunu elektroforetické mobility a chemickým chybným štěpením.

102. Způsob podle nároku 100 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mutantní presenilinový protein je detekován testem vybraným ze skupiny skládající se z imunotestu, proteasového testu a testu elektroforetické mobility.

103. Farmaceutický přípravek obsahující v podstatě čistý presenilinový protein a farmaceuticky akceptovatelný nosič.

104. Farmaceutický přípravek obsahující expresní vektor operativně kodující presenilinový protein, kde uvedený expresní vektor může exprimovat uvedený presenilinový protein v lidských subjektech, a farmaceuticky akceptovatelný nosič.

105. Farmaceutický přípravek obsahující expresní vektor operativně kodující presenilinovou antisense sekvenci, kde uvedený expresní vektor může exprimovat uvedenou presenilinovou antisense sekvenci v lidských subjektech, a farmaceuticky

akceptovatelný nosič.

106. Farmaceutický přípravek obsahující v podstatě čistou protilátku, kde se uvedená protilátka selektivně váže na mutantní presenilinový protein, a farmaceuticky akceptovatelný nosič.

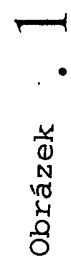
107. Farmaceutický přípravek podle nároku 106, kde je uvedený přípravek v podstatě bez protilátky, která se selektivně váže na normální presenilinový protein.

108. Farmaceutický přípravek obsahující v podstatě čistý přípravek antigeních determinant mutantního presenilinového proteinu.

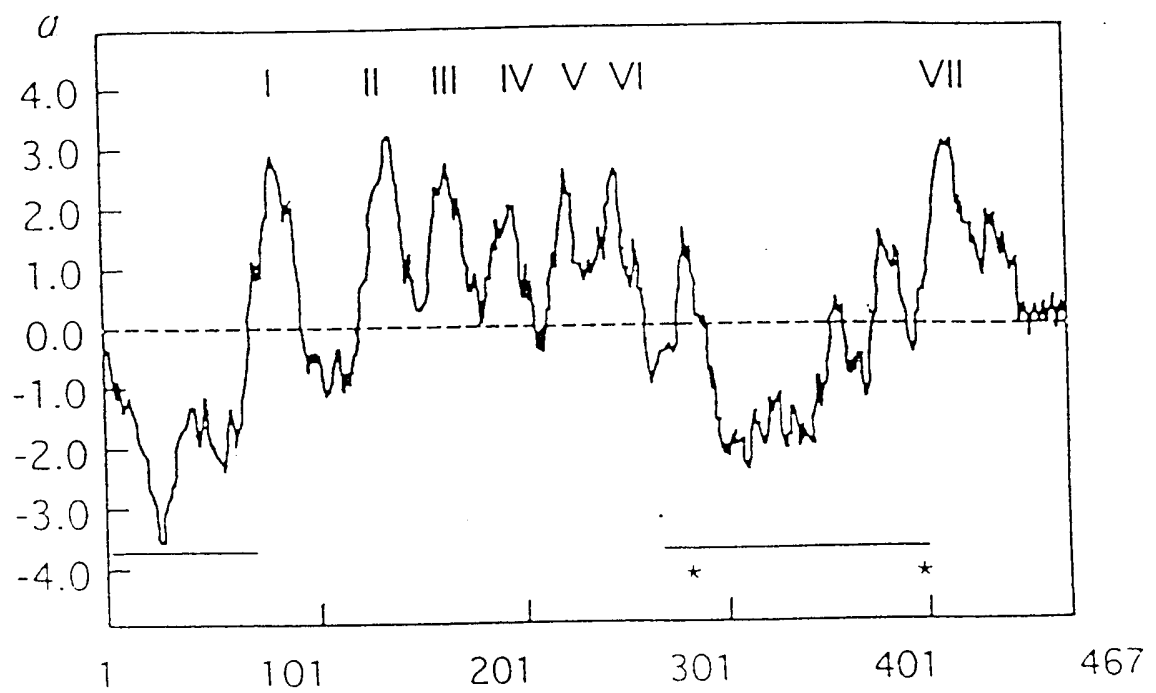
109. Farmaceutický přípravek podle nároku 108, kde je uvedený přípravek v podstatě bez antigeních determinant normálního presenilinového proteinu.

110. Způsob pro léčbu pacientů majících mutantní gen pro presenilin v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok podání terapeuticky účinného množství farmaceutického přípravku podle jakéhokoliv z nároků 103 - 109 uvedenému pacientovi.

111. Způsob podle nároku 110 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený farmaceutický přípravek je zaměřena na typ buněk vybraný ze srdečních, mozkových, plicních, jaterních buněk, buněk kosterního svalu, ledviny slinivky a neurologických buněk.

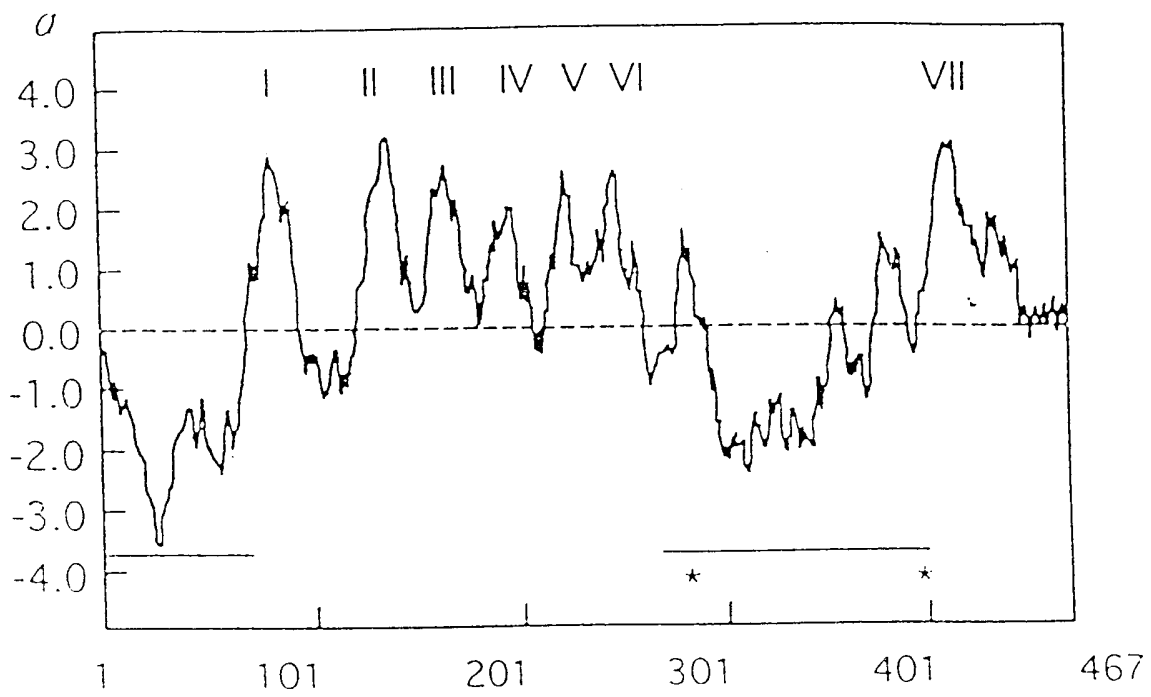


19.11.97



Obrázek 2

19.11.97

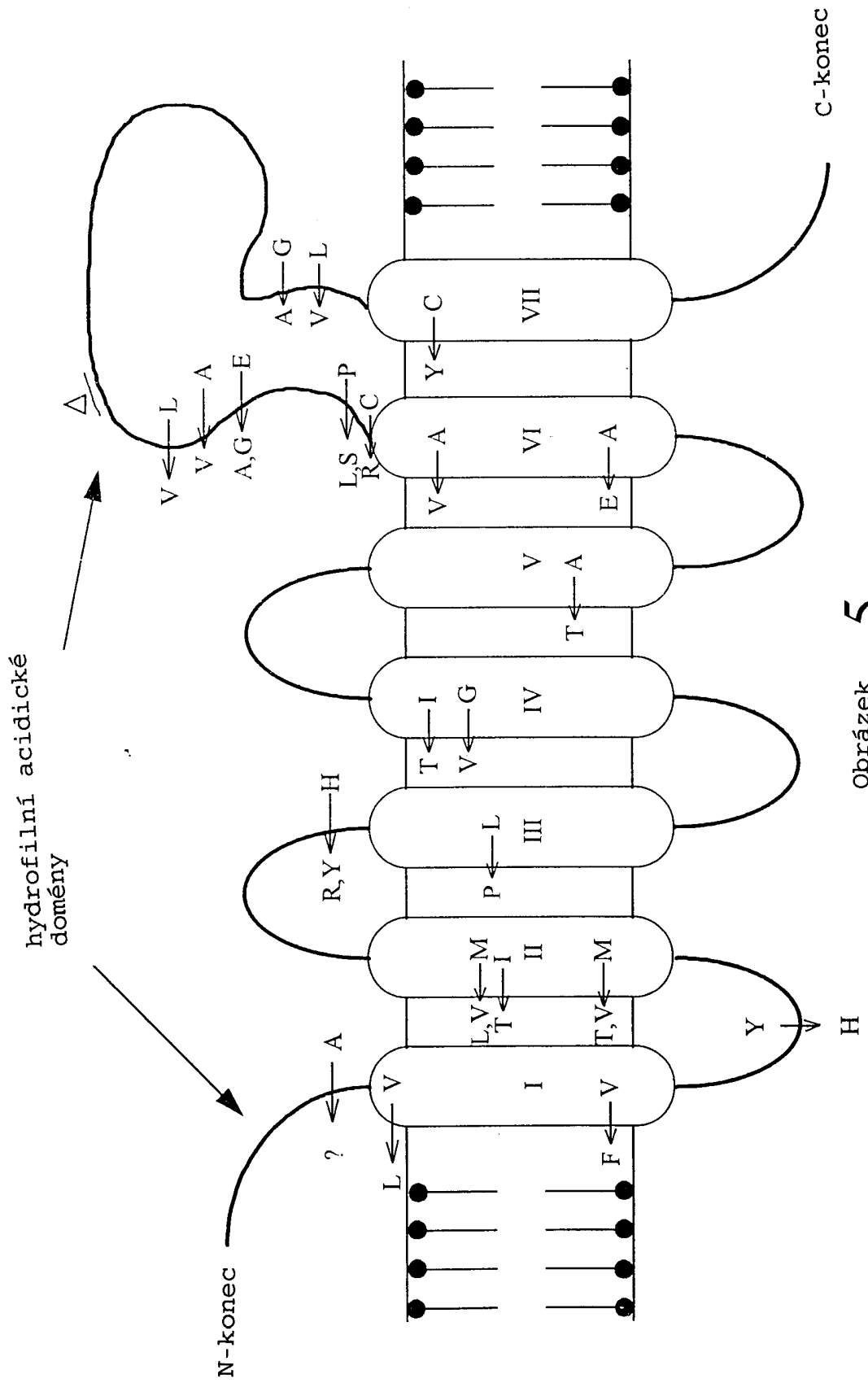


obrázek 2

hPS1	MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSENTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPE	48
mPS1	MTEIPAPLSYFQNAQMSEDSHSSSAIRSQND SQERQQQHDRQLDNPE	48
hPS1	PLSNGRPQGNSRQVVEQDEEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVV	96
mPS1	PISNGRPQNSRQVVEQDEEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVV	96
hPS1	VATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIV	144
mPS1	<u>VATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIV</u>	144
hPS1	VMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLGEVFKTYNVA	192
mPS1	<u>IMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLGEVFKTYNVA</u>	192
hPS1	VDYITVALLIWNFGVVGMI SIHWKGPLRLQOAYLIMISALMALVFIKY	240
mPS1	<u>VDYVTVALLIWNFGVVGMI AIHWKGPLRLQOAYLIMISALMALVFIKY</u>	240
hPS1	LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIY	288
mPS1	<u>LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIY</u>	288
hPS1	SSTMVWLVNMAEGDPEAQR RVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGF	336
mPS1	SS'TMVWLVNMAEGDPEAQR RVKPNPKYNTQRAERETQDSGSGNDDGGF	336
hPS1	SEEWEAQRD SHLGPHRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERG VKLGLG	384
mPS1	SEEWEAQRD SHLGPHRSTPESRAAVQELSGSILTS EDPEERG VKLGLG	384
hPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDWNTT IACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKAL	432
mPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDWNTT <u>IACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKAL</u>	432
hPS1	PALPISITFGLVFYFATDYL VQPFMDQLAFHQFYI	467
mPS1	PALPISITFGLVFYFATDYL VQPFMDQLAFHQFYI	467

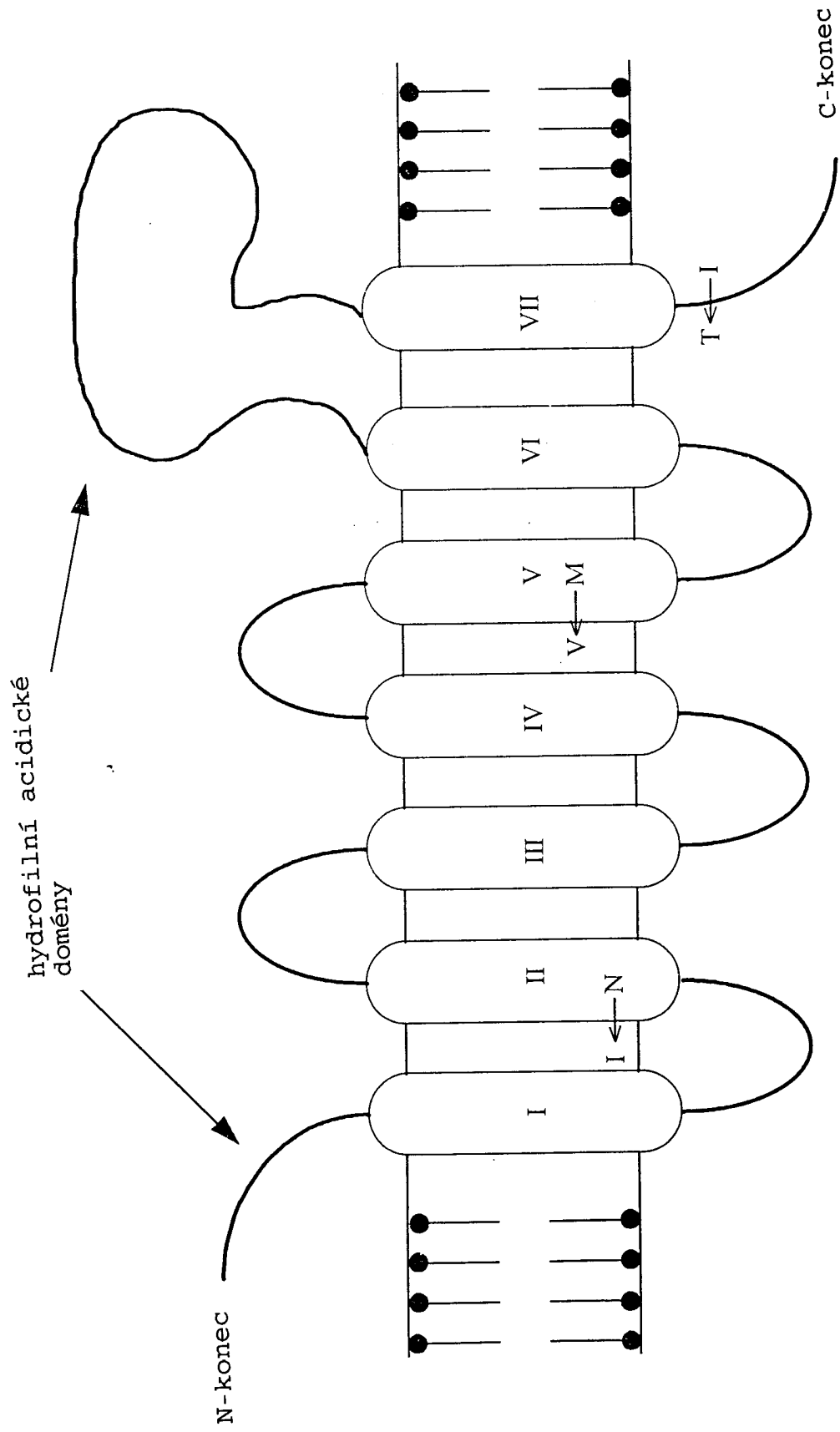
hPS1	-----MT-ELPAPLSYFQNA-QMSEDNHLSTV	26
hPS2	MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSC-QEGRQGPEDGE--NTA	45
hPS1	--RSQ-N--DNRRERQEHNDRR--SLGHPEPLSNGRPQGNSRQVVEQDE	67
hPS2	QWRSQENEEDG-E--EDPDRYVCS-GVP-----GRPPGL-----E---	76
hPS1	EEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIY	115
hPS2	---EELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMIVVVATIKSVRFYTEKNGQLIY	121
hPS1	TPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVVLYKYRCYKVIH	163
hPS2	TPFTEDTPSVGQRLNLSVLNTLIMISVIVVMTIELVVLYKYRCYKFIH	169
hPS1	AWLIISLLLLFFFSFIYLGEVFKTYNVAVDYITVALLI-WNFGVVGM	210
hPS2	<u>GWLIMSSLMLLFLFTYIYLGVLKTYNVAMDYPTL-LLTVWNFGAVGM</u>	216
hPS1	ISIHWKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWTAWLIL-AVISVYD	257
hPS2	<u>VCIHWKGPLVLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWSAWVILGA-ISVYD</u>	263
hPS1	LVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYSSTMVWLVNMAEGDPEA	305
hPS2	<u>LVAVLCPKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMVWTVGMAKLPD--</u>	309
hPS1	QRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSE-EWEAQRDShLG-PH	351
hPS2	----S--SQGAL-----QLPY---DP----EME-EDSYDSF-GEP-	334
hPS1	RSTPESRAAVQE--LSSSILAGEDP---EERGVLGLGDFIFYSVLVG	394
hPS2	-SYPE----VFEPPLTGYP--GEELEEEERGVKLGLGDFIFYSVLVG	375
hPS1	KASATASGDWNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFG	442
hPS2	KAAATGSGDWNTTLACFVAILIGLCLTLLLLAVEKKALPALPISITFG	423
hPS1	LVFYFATDYLVPFMDQLAFHQFYI	467
hPS2	LIFYFSTDNLVRPFMDTLASHQLYI	448

19.11.97



Obrázek 5

10.11.97



Obrázek 6