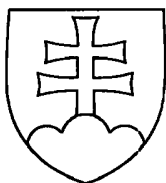


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 4. 6. 1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 198 25 213.7
199 08 837.3
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 5. 6. 1998
1. 3. 1999
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: DE, DE
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 11. 9. 2001
Vestník ÚPV SR č. 09/2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/EP99/03889
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO99/64572

(11), (21) Číslo dokumentu:

1789-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷

C12N 9/10,
C12N 15/54,
C07K 14/455,
C12N 15/10,
C12Q 1/68,
G01N 33/53,
A61K 48/00,
A01K 67/027,
A61K 31/70,
A61K 38/45

(71) Prihlasovateľ: BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Pôvodca: Kock Michael, Schifferstadt, DE;
Höger Thomas, Edingen-Neckarhausen, DE;
Kröger Burkhard, Limburgerhof, DE;
Otterbach Bernd, Ludwigshafen, DE;
Lubisch Wilfried, Heidelberg, DE;
Lemaire Hans-Georg, Limburgerhof, DE;

(74) Zástupca: Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;

(54) Názov: Poly(ADP-ribózo)polymerázové gény

(57) Anotácia:
Sú opísané homológy poly(ADP-ribózo)polyme-rázy (PARP), ktoré majú aminokyselinovú sekvenciu, ktorá má a) funkčnú doménu viažucu NAD⁺ a b) neobsahuje špeci-fický sekvenčný motív zinkových prstov všeobecného vzorca CX₂CX_nHX₂C, v ktorom je celočíselná hodnota od 28 alebo 30, a radikály X sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny; a ďalej sú uvedené jej funkčné ekvivalenty, nukleové kyseliny, ktoré ich kódujú; protilátky so špecifi-citou pre nový proteín; farmaceutické a génovoterapeutické kompozície, ktoré obsahujú tieto produkty; spôsoby analy-tického určenia uvedených proteínov a nukleových kyselín; ďalej spôsoby identifikácie efektorov alebo väzbových partnerov proteínov; a tiež nové efekторы PARP a spôsoby určenia aktivity takýchto efektorov.

SK 1789-2000 A3

Poly(ADP-ribózo)-polymerázové gény

Oblasť techniky

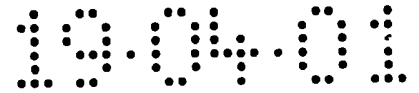
Predložený vynález sa týka nových poly(ADP-ribózo)-polymerázových (PARP) génov a proteínov z nich získaných; protilátok so špecifickosťou pre nové proteíny; farmaceutických a génovo-terapeutických kompozícií, ktoré tvoria produkty podľa vynálezu; spôsobov identifikácie efektorov alebo väzobných partnerov proteínov podľa vynálezu; spôsobov na určenie aktivity takých efektorov a ich použitia na diagnózy alebo terapiu patologických stavov.

Doterajší stav techniky

V roku 1966 Chambon a spolupracovníci objavili 116 kD enzým, ktorý bol v nasledujúcich rokoch podrobne charakterizovaný a teraz sa nazýva PARP (EC 2.4.2.30) (poly(adenozín-5'-difosforibózo)-polymeráza), PARS (poly(adenozín-5'-difosforibózo)-syntáza) alebo ADPRT (adenozín-5'-difosforibózo-transferáza). V rastlinnej ríši (*Arabidopsis thaliana*) sa objavila 72kD (637-aminokyselinová) PARP v roku 1995 (Lepiniec L. et al., FEBS Lett 1995; 364(2): 103-8). Nebolo jasné, či táto kratšia forma PARP je individualitou špecifickou pre rastliny alebo artefaktom („splice“ variantom alebo podobne). 116 kD PARP enzým bol doposiaľ jedinečný pre zvieratá a človeka vzhľadom na svoju aktivitu, ktorá je opísaná nižšie. Ďalej sa kvôli jednoznačnosti označuje ako PARP1.

Zdá sa, že primárnou fyziologickou funkciou PARP1 je jej zapojenie do komplexného opravného mechanizmu, ktorý sa vyvinul v bunkách na opravu porušených vlákien DNA. Navyše sa zdá, že primárna bunková odozva na prerušenie vlákna DNA spočíva v syntéze poly(ADP-ribózy) z NAD⁺ katalyzovanej pomocou PARP1 (De Murcia, G. et al. (1994) TIBS, 19, 172).

PARP1 má modulárnu molekulovú štruktúru. Doposiaľ boli identifikované tri hlavné funkčné prvky: N-koncová 46 kD doména viažuca DNA; stredová 22 kD automodifikačná doména, na ktorú sa pripája poly(ADP-ribóza), pričom aktivita enzýmu PARP1 klesá s rastúcou elongáciou; a C-koncová 54 kD doména viažuca NAD⁺. V automodifikačnej doméne sa našla oblasť leucínového zipsu, čo indikuje

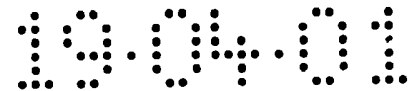


možné interakcie proteín-proteín, len v PARP z drozofily. Všetky doposiaľ známe PARP sú pravdepodobne aktívne ako homodiméry.

Vysoký stupeň organizácie molekuly sa odráža v silnej konzervácii aminokyselinovej sekvencie. Takto sa zistila 62 % konzervácia aminokyselinovej sekvencie pre PARP1 z ľudí, myší, dobytky a kurčiat. Existujú väčšie štrukturálne diferencie oproti PARP z drozofily. Jednotlivé domény samotné zase majú klastre zvýšenej konzervácie. Región viažuci DNA takto obsahuje dva takzvané zinkové prsty ako subdomény (obsahujúce motívy typu $CX_2CX_{28/30}HX_2C$), ktoré sú zapojené do Zn^{2+} -závislého rozpoznávania prerušení jednoduchých vláken DNA alebo previsov jednovláknovej DNA (napr. na koncoch chromozómov, teloméry). C-koncová katalytická doména obsahuje blok asi 50 aminokyselín (zvyšky 859-908), ktorá je na asi 100 % konzervovaná medzi stavovcami („podpis“ PARP). Tento blok viaže prirodzený substrát NAD^+ a tým riadi syntézu poly(ADP-ribózy) (de Murcia, loc.cit.). V tomto bloku je charakteristický pre PARP najmä motív GX_3GKG .

Priaznivá funkcia opísaná vyššie je v kontraste s patologickou pri početných chorobách (mŕtvica, infarkt myokardu, sepsa, atď.). PARP je zapojená do umierania buniek v dôsledku ischémie mozgu (Choi, D. W., (1997) *Nature Medicine*, 3, 10, 1073), myokardu (Zingarelli, B., et al. (1997), *Cardiovascular Research*, 36, 205) a oka (Lam, T. T. (1997), *Res. Comm. in Molecular Pathology and Pharmacology*, 95, 3, 241). Aktivácia PARP indukovaná zápalovými mediátormi bola pozorovaná aj pri septickom šoku (Szabo, C., et al. (1997), *Journal of Clinical Investigation*, 100, 3, 723). V týchto prípadoch je aktivácia PARP sprevádzaná rozsiahlou spotrebou NAD^+ . Keďže na biosyntézu jedného mólu NAD^+ sa spotrebujú štyri móly ATP, energetická zásoba bunky drasticky klesá. Dôsledkom je smrť bunky.

Inhibítormi PARP1 opísanými vo vyššie uvedenej odbornej literatúre sú nikotínamid a 3-aminobenzamid. 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)butoxy]-1(2H)-izo-chinolón publikoval Takahashi, K., et al. (1997), *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 1137. Ďalšie inhibítory sú opísané napríklad v Banasik, M., et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 3, 1569 a Griffin, R. J., et al. (1995), *Anti-Cancer Drug Design*, 10, 507.



Medzi vysokomolekulových väzobných partnerov opísaných pre ľudský PARP1 patrí bázovo excízno opravný (BER – base excision repair) proteín XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1), ktorý sa viaže cez motív zinkových prstov a modul BRCT (C-koniec BRCA1) (aminokyseliny 372-524) (Masson, M., et al., (1998) *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6, 3563).

Podstata vynálezu

Cieľom predloženého vynálezu, vzhľadom na rozličné fyziologické a patologické funkcie PARP, je poskytnúť nové homológy PARP. Dôvodom toho je, že poskytnutie homologických PARP by bolo osobitne dôležité pre vývoj nových cieľov pre liečivá a nové liečivá, aby sa zlepšila diagnostika a/alebo terapia patologických stavov, v ktorých hrajú úlohu PARP, homológy PARP alebo látky od nich odvodené.

Zistili sme, že tento cieľ sa dosahuje homológmi PARP, s výhodou odvodenými od človeka a iných cicavcov, majúcimi aminokyselinovú sekvenciu, ktorá má

a) funkčnú doménu viažucu NAD^+ , t.j. sekvenciu „podpisu“ PARP majúcu charakteristický motív GX_3GKG ;

a

b) najmä v regióne sekvencie N-konca, t.j. v regióne prvých 200, napríklad v regióne prvých 100 N-koncových aminokyselín, žiadne motívy sekvencie zinkových prstov PARP všeobecného vzorca



v ktorom

m je celočíselná hodnota od 28 alebo 30 a radikály X sú navzájom nezávislé akoukoľvek aminokyselinou;

a ich funkčnými ekvivalentmi.

Keďže molekuly PARP podľa vynálezu predstavujú najmä funkčné homológy, prirodzene majú aj aktivitu syntézy poly(ADP-ribózy). Doména viazania NAD v zásade zodpovedá tejto aktivite a nachádza sa na C konci.

Teda zásadnou charakteristikou PARP podľa vynálezu je prítomnosť funkčnej domény viažucej NAD^+ (podpis PARP), ktorá sa nachádza v C-koncovom regióne aminokyselinovej sekvencie (t.j. približne v regióne posledných 400, napríklad posledných 350 alebo 300 C-koncových aminokyselín) v kombinácii s N-koncovou sekvenciou, ktorá nemá žiadne motívy zinkových prstov. Keďže motívy zinkových prstov v známych PARP pravdepodobne prispievajú k rozpoznávaniu pretrhnutí DNA, treba predpokladať, že proteíny podľa vynálezu neinteragujú s DNA, alebo tak robia iným spôsobom. Vhodnými biochemickými testami bolo ukázané, že PARP2 podľa vynálezu možno aktivovať „aktivovanou DNA“ (t.j. DNA po obmedzenom poštičení pomocou DNázyl). Na základe tohto bolo ďalej konštatované, že PARP2 podľa vynálezu má vlastnosti viazania DNA. Avšak mechanizmus viazania DNA a aktivácie enzýmu medzi PARP podľa vynálezu a PARP1 sa líši. Jej viazanie DNA a aktivácia enzýmu je, ako už bolo spomenuté, sprostredkovaná charakteristickým motívom zinkových prstov. V PARP podľa vynálezu nie sú prítomné žiadne také motívy. Tieto vlastnosti sú pravdepodobne sprostredkované kladne nabitými aminokyselinami v N-koncovom regióne PARP podľa vynálezu. Keďže „aktivovaná DNA“ (t.j. napríklad DNA po obmedzenom pôsobení DNázyl) má veľký počet defektov (prerušenia jednoduchých vláken, medzery v jednoduchých vláknach, previsy jednoduchých vláken, prerušenia dvojítych vláken atď.), je možné, že hoci PARP1 a PARP podľa vynálezu sú aktivované tou istou „aktivovanou DNA“, je to aktivácia inými subpopuláciami defektov (napr. medzery v jednoduchých vláknach namiesto prerušení jednoduchých vláken).

Funkčná doména viazania NAD^+ (t.j. katalytická doména) viaže substrát pre syntézu poly-(ADP-ribózy). V súlade so známymi PARP sa tu nachádza najmä sekvenčný motív $\text{GX}^1\text{X}^2\text{X}^3\text{GKG}$, v ktorom G je glycín, K je lyzín a X^1 , X^2 a X^3 sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny. Ako je však prekvapujúco ukázané, porovnanie aminokyselinových sekvencií domén viažucich NAD^+ molekúl PARP podľa vynálezu so skôr publikovanou ľudskou PARP1 ukázalo, že sekvencie podľa vynálezu sa výrazne líšia od známej sekvencie pre doménu viažucu NAD^+ .

Skupina molekúl PARP, ktorá je výhodná podľa vynálezu, má s výhodou nasledujúcich niekoľko spoločných sekvenčných motívov v katalytickej doméne:

PX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (sekvencia č. 11), najmä
 (S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (sekvencia č. 12), s výhodou
 LLWHG(S/T)X₇IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFAX₃SKSAXY
 (sekvencia č. 13)

v ktorej (S/T) popisuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície S alebo T, (I/V) popisuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície I alebo V, n je celočíselná hodnota od 1 do 5 a radikály X sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny. Posledný motív sa označuje aj ako motív „podpisu PARP“.

V PARP podľa vynálezu je s výhodou prítomná aj automodifikačná doména. Môže sa nachádzať napríklad v regióne od asi 100 do 200 aminokyselín pred N-koncom domény viažucej NAD⁺.

Homológy PARP podľa vynálezu môžu ďalej obsahovať smerom k N-koncu od domény viažucej NAD⁺ (t.j. asi 30 až asi 80 aminokyselín bližšie k N koncu) leucínový zipsový sekvenčný motív všeobecného vzorca

(L/V)X₆LX₆LX₆L (sekvencia č. 14),

v ktorej

(L/V) predstavuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície L alebo V a radikály X sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny. Leucínové zipsové motívy pozorované podľa vynálezu sa výrazne odlišujú v polohe od motívov opísaných pre PARP z drozofily. Leucínové zipsy môžu viesť k homodimérom (dve molekuly PARP) alebo heterodimérom (jedna molekula PARP s naviazaným partnerom líšiacim sa od nej).

Homológy PARP podľa vynálezu s výhodou ďalej obsahujú smerom k N koncu od vyššie uvedených leucínových zipsových sekvenčných motívov, t.j. asi 10 až 250 aminokyselinových zvyškov bližšie k N koncu, aspoň jeden z nasledujúcich čiastočných sekvenčných motívov:

LX₉NX₂YX₂QLLX(D/E)X_bWGRVG, (motív 1; sekvencia č. 15)

AX₃FXKX₄KTXNXWX₅FX₃PXK, (motív 2; sekvencia č. 16)

QXL(I/L)X₂IX₉MX₁₀PLGKLX₃QIX₆L, (motív 3; sekvencia č. 17)

FYTXIPHXFGX₃PP, (motív 4; sekvencia č. 18)

a

KX₃LX₂LXDIEXAX₂L (motív 5; sekvencia č. 19),

v ktorej (D/E) popisuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície D alebo E, (I/L) popisuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície I alebo L, b je celočíselná hodnota 10 alebo 11 a radikály X sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny. Najvýhodnejšie je, aby tieto motívy 1 až 5 boli prítomné v uvedenej sekvencii, pričom motív 1 je najbližšie k N koncu.

Po vyššie spomínanom motíve podpisu PARP nasleduje v proteínoch podľa vynálezu aspoň jeden z nasledujúcich motívov:

GX₃LXEVALG (motív 6; sekvencia č. 20)

GX₂SX₄GX₃PX_aLXGX₂V (motív 7; sekvencia č. 21) a

E(Y/F)X₂YX₃QX₄YLL (motív 8; sekvencia č. 22)

v ktorých (Y/F) popisuje alternatívne obsadenie tejto sekvenčnej pozície Y alebo F, a sa rovná 7 až 9 a X je v každom prípade akákoľvek aminokyselina. Najvýhodnejšie je, aby tri C-koncové motívy boli prítomné a v uvedenej sekvencii, pričom motív 8 je najbližšie k C koncu.

Výhodnú štruktúru PARP podľa vynálezu možno schematicky opísať nasledovne:

Motívy 1 až 5/podpis PARP/motívy 6 až 8 alebo

motívy 1 až 5/leucínový zips/podpis PARP/motívy 6 až 8

prícom je možné, aby medzi jednotlivými motívmi boli zaradené ďalšie aminokyselinové zvyšky, napríklad až 40 zvyškov, a aby na N konci a/alebo C konci boli zaradené ďalšie aminokyselinové zvyšky, napríklad až 80 zvyškov.

Homológy PARP, ktoré sú osobitne výhodné podľa vynálezu, sú proteíny ľudská PARP2, ľudská PARP3, myšacia PARP3 a ich funkčné ekvivalenty. Proteín označovaný ako ľudská PARP2 obsahuje 570 aminokyselín (sekvencia č. 2). Proteín označovaný ako ľudská PARP3 pravdepodobne existuje v dvoch formách. Typ 1 obsahuje 533 aminokyselín (sekvencia č. 4) a typ 2 obsahuje 540 aminokyselín (sekvencia č. 6). Formy môžu vzniknúť rôznou iniciáciou translácie.

Proteín označovaný ako myšacia PARP3 existuje v dvoch formách, ktoré sa navzájom líšia deléciou 5 aminokyselín (15 bp). Typ 1 obsahuje 533 aminokyselín (sekvencia č. 8) a typ 2 obsahuje 528 aminokyselín (sekvencia č. 10). Homológy PARP podľa predloženého vynálezu sa významne líšia vo svojich sekvenciách od uvedeného PARP proteínu z *Arabidopsis thaliana* (pozrite vyššie). Napríklad PARP2 a PARP3 neobsahujú rastlinnú PARP špecifickú peptidovú sekvenciu AAVLDQWIPD zodpovedajúcu aminokyselinovým zvyškom 143 až 152 proteínu z *Arabidopsis*.

Vynález sa ďalej týka väzobných partnerov pre homológy PARP podľa vynálezu. Títo väzobní partneri sú s výhodou vybraní spomedzi nasledujúcich:

- a) protilátky a ich fragmenty ako napríklad Fv, Fab, F(ab')₂
- b) proteínom podobné zlúčeniny, ktoré interagujú napríklad cez vyššie uvedený leucínový zipsový región alebo inú sekvenčnú sekciu s PARP, a
- c) nízkomolekulové efekторы, ktoré modulujú biologickú funkciu PARP, ako je napríklad katalytická aktivita PARP, t.j. ADP ribozyláciu spotrebúvajúcu NAD⁺ alebo viazanie na aktivátorový proteín alebo na DNA.

Vynález sa ďalej týka nukleových kyselín obsahujúcich

- a) nukleotidovú sekvenciu kódujúcu aspoň jeden homológ PARP podľa vynálezu alebo jej komplementárnu nukleotidovú sekvenciu;
- b) nukleotidovú sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou podľa špecifikácie v a), s výhodou za stringentných podmienok; alebo
- c) nukleotidové sekvencie, ktoré sú odvodené od nukleotidových sekvencií definovaných v a) a b) cez degeneráciu genetického kódu.

Nukleové kyseliny, ktoré sú vhodné podľa vynálezu, obsahujú konkrétne aspoň jednu z čiastkových sekvencií, ktoré kódujú vyššie uvedené aminokyselinové sekvenčné motívy.

Nukleové kyseliny, ktoré sú výhodné podľa vynálezu, obsahujú nukleotidové sekvencie podľa sekvencie č. 1 a 3, a najmä ich čiastkové sekvencie, ktoré sú

charakteristické pre homológy PARP podľa vynálezu, ako sú napríklad nukleotidové sekvencie obsahujúce

- a) nukleotidy +3 až +1715 uvedené v sekvencii č. 1;
- b) nukleotidy +242 až +1843 uvedené v sekvencii č. 3;
- c) nukleotidy +221 až +1843 uvedené v sekvencii č. 5;
- d) nukleotidy +112 až +1710 uvedené v sekvencii č. 7; alebo
- e) nukleotidy +1 až +1584 uvedené v sekvencii č. 9

alebo čiastkové sekvencie a), b), c), d) a e), ktoré kódujú vyššie uvedené charakteristické aminokyselinové sekvenčné motívy homológov PARP podľa vynálezu.

Vynález sa ďalej týka expresných kaziet, ktoré obsahujú aspoň jednu z vyššie opísaných nukleotidových sekvencií podľa vynálezu pod genetickou kontrolou regulačných nukleotidových sekvencií. Tieto možno použiť na prípravu rekombinantných vektorov podľa vynálezu, ako sú napríklad virálne vektory alebo plazmidy, ktoré obsahujú aspoň jednu expresnú kazetu podľa vynálezu.

Rekombinantné mikroorganizmy podľa vynálezu sa transformujú aspoň jedným z vyššie uvedených vektorov.

Vynález sa týka aj transgénnych cicavcov transfikovaných vektorom podľa vynálezu.

Vynález sa ďalej týka spôsobu detekcie in vitro, ktorú možno uskutočniť homogénne alebo heterogénne, pre inhibítory PARP, ktorý pozostáva z nasledujúcich krokov:

- a) inkubácia poly-ADP-ribozylovateľného cieľa voľného alebo na nosiči s reakčnou zmesou obsahujúcou
 - a1) homológ PARP podľa vynálezu;
 - a2) aktivátor PARP; a
 - a3) inhibítor PARP alebo analyt, v ktorom je podozrenie na aspoň jeden inhibítor PARP;

- b) uskutočnenie polyADP ribozylačnej reakcie; a
- c) určenie polyADP ribozylácie cieľa kvalitatívne alebo kvantitatívne.

Spôsob detekcie sa s výhodou uskutočňuje predinkubáciou homológu PARP aktivátorom PARP a inhibítorom PARP alebo analytom, v ktorom existuje podozrenie na aspoň jeden inhibítor PARP, napríklad na asi 1 až 30 minút, kým sa uskutoční poly-ADP ribozylačná reakcia.

Po aktivácii pomocou DNA s prerušeniami jednoduchých vlákien (označované ako „aktivovaná DNA“ podľa vynálezu), PARP poly-ADP ribozyluje veľký počet nukleových proteínov za prítomnosti NAD. Medzi tieto proteíny patrí na jednej strane samotná PARP ale aj históny atď.

Poly-ADP-ribozylovateľný cieľ s výhodou použitý v spôsobe detekcie je histónový proteín vo svojej natívnej forme alebo poly-ADP-ribozylovateľný ekvivalent od neho odvodený. Ako príklad sa použil histónový prípravok dodávaný spoločnosťou Sigma (SIGMA, katalógové číslo H-7755; II-AS histónového typu z teľacieho týmusu, Luck, J. M., et al., J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958), Satake K., et al., J. Biol. Chem, 235, 2801 (1960)). V zásade je možné použiť všetky typy proteínov alebo ich časti prístupné poly-ADP-ribozylácii pomocou PARP. Ide s výhodou o nukleové proteíny, napr. históny, DNA polymeráza, telomeráza alebo samotná PARP. Syntetické peptidy odvodené od príslušných proteínov môžu tiež slúžiť ako cieľ.

V teste ELISA podľa vynálezu je možné použiť množstvá histónov v rozmedzí od asi 0,1 $\mu\text{g}/\text{jamku}$ do asi 100 $\mu\text{g}/\text{jamku}$, s výhodou asi 1 $\mu\text{g}/\text{jamku}$ do asi 10 $\mu\text{g}/\text{jamku}$. Množstvá enzýmu PARP sú v rozmedzí od asi 0,2 pmol/jamku do asi 2 nmol/jamku , s výhodou od asi 2 pmol/jamku do asi 200 pmol/jamku , pričom reakčná zmes v každom prípade obsahuje 100 $\mu\text{g}/\text{jamku}$. Zníženia množstiev na menšie jamky a príslušne menšie reakčné objemy sú možné.

V teste HTRF podľa vynálezu sa používajú identické množstvá PARP a množstvo histónu alebo modifikovaných histónov je v rozmedzí od asi 2 ng/jamku do asi 25 $\mu\text{g}/\text{jamku}$, s výhodou asi 25 ng/jamku do asi 2,5 $\mu\text{g}/\text{jamku}$, pričom

reakčná zmes v každom prípade obsahuje 50 μ l/jamku. Zníženia množstiev na menšie jamky a príslušne menšie reakčné objemy sú možné.

Použitým aktivátorom PARP podľa vynálezu je s výhodou aktivovaná DNA.

Ako aktivátor môžu pôsobiť rôzne typy poškodenej DNA. Poškodenie DNA možno vyvolať štiepením DNázami alebo inými enzýmami modifikujúcimi DNA (napr. reštrikčné endonukleázy), žiarením alebo inými fyzikálnymi metódami alebo chemickým pôsobením na DNA. Ďalej je možné simulovať situáciu poškodenia DNA cieľným spôsobom pomocou syntetických oligonukleotidov. V testoch uvedených ako príklad sa použila aktivovaná DNA z teľacieho týmusu (Sigma, produkt číslo D4522; CAS: 91080-16-9, pripravený metódou Aposhian a Kornberg s použitím DNA z teľacieho týmusu (SIGMA D-1501) a deoxyribonukleázy typu I (D-4263). Aposhian H. V. a Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)). Aktivovaná DNA sa v reakčnom kroku použila v koncentračnom rozmedzí od 0,1 do 1000 μ g/ml, s výhodou od 1 do 100 μ g/ml.

PolyADP ribozylačná reakcia sa v spôsobe podľa vynálezu začína pridaním NAD^+ . Koncentrácie NAD boli v intervale od asi 0,1 μ M do asi 10 mM, s výhodou v intervale od asi 10 μ M do asi 1 mM.

Vo variante vyššie uvedenej metódy, ktorú možno uskutočniť heterogénne, sa polyADP ribozylácia cieľa na nosiči určila pomocou anti-poly(ADP-ribózových) protilátok. S týmto cieľom sa reakčná zmes oddelí od cieľa na nosiči, premyje a inkubuje s protilátkou. Táto protilátka môže byť sama označená. Ako alternatívu na detekciu viazanej anti-poly(ADP-ribózovej) protilátky však možno použiť označenú sekundárnu protilátku alebo zodpovedajúci označený fragment protilátky. Vhodnými značkami sú napríklad rádioaktívne značky, chromoforové alebo fluoroforové značky, biotinylácia, chemiluminiscenčné značkovanie, značkovanie paramagnetickou látkou alebo najmä enzýmové značky, napríklad chrenová peroxidáza. Vhodné techniky detekcie sú všeobecne známe odborníkom v danej oblasti.

Vo variante vyššie uvedeného procesu, ktorý možno uskutočniť homogénne, sa voľný cieľ označí akceptorným fluoroforom. Cieľom s výhodou používaným v tomto prípade je biotinylovaný histón, pričom akceptorný fluorofor sa viaže cez

avidín alebo streptavidín na biotínové skupiny histónu. Osobitne vhodné ako akceptorné fluorofory sú fykobiliproteíny (napr. fykokyaníny, fykoerytríny), napr. R-fykokyanín (R-PC), alofykokyanín (APC), R-fykoerytrín (R-PE), C-fykokyanín (C-PC), B-fykoerytrín (B-PE) alebo ich vzájomné kombinácie alebo s fluorescenčnými farbivami ako Cy5, Cy7 alebo texaská červená (Tandem system) (Thammapalerd, N. et al., *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 27(2): 297-303 (1996); Kronick, M. N. et al., *Clinical Chemistry*, 29(9), 1582-1586 (1986); Hicks, J. M., *Human Pathology*, 15(2), 112-116 (1984)). Farbivom XL665 použitým v príkladoch je zosieťovaný alofykokyanín (Glazer, A. N., *Rev. Microbiol.*, 36, 173-198 (1982); Kronick, M. N., *J. Imm. Meth.*, 92, 1-13 (1986); MacColl, R. et al., *Phycobiliproteins*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987); MacColl, R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 208(1), 42-48 (1981)).

Ďalej je v homogénnej metóde výhodné určiť polyADP ribozyláciu voľného cieľa pomocou anti-poly(ADP-ribózovej) protilátky, ktorá je označená donorným fluoroforom, ktorý je schopný prenášať energiu na akceptorný fluorofor, keď sú donor a akceptor priestorovo blízko vďaka viazaniu označenej protilátky na polyADP-ribozylovaný histón. Ako donorný fluorofor pre anti-poly(ADP-ribózovú) protilátku sa s výhodou používa kryptát európie.

Okrem používaného kryptátu európie sú ako potenciálne donorné molekuly možné aj ďalšie zlúčeniny. Toto môže obsahovať na jednej strane modifikáciu kryptátovej kľetky. Je tiež možné nahradiť európieum inými kovmi vzácnych zemín, napríklad terbiom. Je dôležité, aby fluorescencia mala dlhé trvanie, aby zaručila časové oneskorenie (Lopez, E. et al., *Clin. Chem.* 39/2, 196-201 (1993); patent USA 5,534,622).

Vyššie opísané metódy detekcie sú založené na zásade, že existuje korelácia medzi aktivitou PARP a množstvom ADP-ribózových polymérov vytvorených na histónoch. Tu opísaný test umožňuje kvantifikovať ADP-ribózové polyméry použitím špecifických protilátok vo forme testov ELISA a HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence – homogénna časovo rozlíšená fluorescencia). Špecifické uskutočnenia týchto dvoch testov sú podrobne opísané v nasledujúcich príkladoch.

Vyvinutý systém testu HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence – homogénna časovo rozlíšená fluorescencia) meria tvorbu poly(ADP-ribózy) na histónoch pomocou špecifických protilátok. Na rozdiel od ELISA sa tento test uskutočňuje v homogénnej fáze bez krokov separácie a premývania. To umožňuje vyšší počet spracovaných vzoriek za časovú jednotku a menšiu citlivosť na chyby. HTRF je založená na prenose fluorescencnej rezonančnej energie (FRET – fluorescence resonance energy transfer) medzi dvoma fluoroformi. V teste FRET môže excitovaný donorný fluorofor prenášať svoju energiu na akceptorový fluorofor, keď sa nachádzajú v priestorovej blízkosti. V technológii HTRF je donorným fluoroforom kryptát európie [(Eu)K] a akceptorom je XL665, stabilizovaný alofykokyanín. Kryptát európie je založený na štúdiách, ktoré uskutočnil Jean Marie Lehn zo Štrasburgu (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); patent USA 5,534,622).

V homogénnom teste sú tiež všetky komponenty prítomné počas merania. Zatiaľ čo toto má výhody pre uskutočnenie testu (rýchlosť, komplexnosť), je potrebné vylúčiť interferenciu zložiek testu (inherentná fluorescencia, zhasenie farbivami atď.). HTRF vylučuje takú interferenciu časovo oneskoreným meraním pri dvoch vlnových dĺžkach (665 nm, 620 nm). HTRF má veľmi dlhý čas rozkladu a vďaka tomu je možné časovo oneskorené meranie. V zmesi už nie je žiadna interferencia z fluorescencie pozadia s krátkou životnosťou (napr. z komponentov testu alebo inhibítorov knižnice látok). Okrem toho sa meranie vždy uskutočňuje pri dvoch vlnových dĺžkach, aby sa kompenzovali zhasacie účinky farebných látok. Testy HTRF možno uskutočňovať napríklad v 96- alebo 384-jamkových mikrotitračných platničkách a vyhodnocujú sa pomocou prístroja Discovery HTRF Microplate Analyzer (Canberra Packard).

Vynález tiež uvádza nasledujúce in vitro skríningové metódy pre väzobných partnerov PARP, najmä pre homológ PARP podľa vynálezu.

Prvý variant sa uskutočňuje

- a1) imobilizáciou aspoň jedného homológu PARP na nosiči;
- b1) kontaktovaním imobilizovaného homológu PARP s analytom, v ktorom je podozrenie na existenciu aspoň jedného väzobného partnera; a

c1) určením, v prípade vhodnosti po inkubačnom období, zložiek analytu viazaných na imobilizovaný homológ PARP.

Druhý variant obsahuje

a2) imobilizáciu analytu na nosiči, pričom analyt obsahuje aspoň jedného možného väzobného partnera pre homológ PARP;

b2) kontaktovanie imobilizovaného analytu s aspoň jedným homológom PARP, pre ktorý sa hľadá väzobný partner; a

c3) skúmanie imobilizovaného analytu, v prípade vhodnosti po inkubačnom období, na viazanie homológu PARP.

Vynález sa týka aj spôsobu kvalitatívneho alebo kvantitatívneho určenia nukleovej kyseliny kódujúcej homológ PARP, ktorý obsahuje

a) inkubovanie biologickej vzorky s definovaným množstvom exogénnej nukleovej kyseliny podľa vynálezu (napr. s dĺžkou asi 20 až 500 báz alebo dlhšej), hybridizáciu, s výhodou za stringentných podmienok, určenie hybridizujúcich nukleových kyselín a prípadne porovnanie so štandardom; alebo

b) inkubovanie biologickej vzorky s definovaným množstvom oligonukleotidových primérových párov so špecifickosťou pre nukleovú kyselinu kódujúcu homológ PARP, amplifikáciu nukleovej kyseliny, určenie produktu amplifikácie a prípadne porovnanie so štandardom.

Vynález sa ďalej týka spôsobu kvalitatívneho alebo kvantitatívneho určenia homológu PARP podľa vynálezu, ktorý obsahuje

a) inkubovanie biologickej vzorky s aspoň jedným väzobným partnerom špecifickým pre homológ PARP,

b) detekciu komplexu väzobného partnera s PARP a prípadne

c) porovnanie výsledku so štandardom.

Väzobným partnerom v tomto prípade je s výhodou anti-PARP protilátka alebo jej väzobný fragment, ktorý prípadne nesie detegovateľnú značku.

Metódy určovania podľa vynálezu pre PARP, najmä pre homológy PARP a pre jej kódujúce sekvencie nukleovej kyseliny, sú vhodné a výhodné na diagnostikovanie poškodenia tkaniva súvisiaceho so sepsou alebo ischémiou, najmä mŕtvic, infarktov myokardu, diabetes alebo septického šoku.

Vynález sa ďalej týka spôsobu určenia účinnosti efektorov PARP, ktorý obsahuje

- a) inkubovanie homológu PARP podľa vynálezu s analytom, ktorý obsahuje efektor fyziologickej alebo patologickej aktivity PARP; prípadné odstránenie efektora a
- b) určenie aktivity homológu PARP v prípade vhodnosti po pridaní substrátov alebo kosubstrátov.

Vynález sa ďalej týka kompozícií na génovú terapiu, ktoré obsahujú vo vehikule prijateľnom pre génovú terapiu konštrukt nukleovej kyseliny, ktorý

- a) obsahuje antisense nukleovú kyselinu proti kódujúcej nukleovej kyseline podľa vynálezu; alebo
- b) ribozým proti nekódujúcej nukleovej kyseline podľa vynálezu; alebo
- c) kódy pre špecifický inhibítor PARP.

Vynález sa ďalej týka farmaceutických kompozícií obsahujúcich vo farmaceuticky prijateľnom vehikule aspoň jeden proteín PARP podľa vynálezu, aspoň jedného väzobného partnera PARP podľa vynálezu alebo aspoň jednu kódujúcu nukleotidovú sekvenciu podľa vynálezu.

Nakoniec sa vynález týka použitia väzobných partnerov homológu PARP na diagnostiku alebo terapiu patologických stavov vo vývoji a/alebo progrese, v ktorých je zapojený aspoň proteín PARP, najmä homológ PARP podľa vynálezu alebo polypeptid z neho odvodený. Použitým väzobným partnerom môže byť napríklad nízkomolekulový väzobný partner, ktorého molekulová hmotnosť môže byť napríklad menšia ako asi 2000 daltonov alebo menej ako asi 1000 daltonov.

Vynález sa ďalej týka použitia väzobných partnerov PARP na diagnostiku alebo terapiu patologických stavov sprostredkovaných energetickým deficitom. Energetický deficit na účely predloženého vynálezu je najmä bunkovoenergetický deficit, ktorý sa pozoruje u chorého pacienta systémovo alebo v jednotlivých oblastiach tela, orgánoch alebo oblastiach orgánov, alebo tkanivách alebo oblastiach tkanív. Toto je charakterizované depléciou NAD a/alebo ATP prekračujúcou (nahor alebo nadol) fyziologický interval variácie hladiny NAD a/alebo ATP a sprostredkované s výhodou proteínom s aktivitou PARP, najmä homológom PARP podľa vynálezu alebo polypeptidom od neho odvodeným.

„Poruchy sprostredkované energetickým deficitom“ na účely vynálezu ďalej zahŕňajú tie, v ktorých možno poškodenie tkaniva pripísať umieraniu buniek v dôsledku nekrózy alebo apoptózy. Spôsoby podľa vynálezu sú vhodné na liečbu a prevenciu poškodenia tkaniva v dôsledku poškodenia buniek apoptózou alebo nekrozou; poškodenie nervového tkaniva v dôsledku ischémii a/alebo reperfúzie; neurologických porúch; neurodegeneratívnych porúch; vaskulárnej mŕtvice; na liečbu a prevenciu kardiovaskulárnych porúch; na liečbu iných porúch alebo stavov, napríklad s vekom súvisiacej makulárnej degenerácie; AIDS alebo iných porúch imunitnej nedostatočnosti; artritídy; aterosklerózy; kachexie; rakoviny; degeneratívnych porúch kostrového svalstva; diabetes, kraniálnej traumy; zápalových porúch gastrointestinálneho traktu ako napríklad Crohnovej choroby; svalovej dystrofie; osteoartritídy; osteoporózy; chronickej a/alebo akútnej bolesti; zlyhania obličiek; retinálnej ischémie; septického šoku (ako napríklad endotoxínového šoku); starnutia kože alebo starnutia vo všeobecnosti; všeobecných prejavov starnutia. Spôsoby podľa vynálezu možno ďalej použiť na predĺženie života a proliferatívnej kapacity telesných buniek a na senzibilizáciu nádorových buniek v spojení s radiačnou terapiou.

Vynález sa najmä týka použitia väzobného partnera PARP podľa vyššie uvedeného významu na diagnostiku alebo terapiu (akútnu alebo profylaktickú) patologických stavov sprostredkovaných energetickými deficitmi a vybranými spomedzi nasledujúcich: neurodegeneratívne poruchy alebo poškodenie tkaniva spôsobené sepsou alebo ischémiou, najmä neurotoxické poruchy, mŕtvice, infarkty myokardu, poškodenie počas infarktovej lýzy alebo po nej (napr. s TPA, Reteplase

alebo mechanicky s laserom alebo Rotablatorom) a mikroinfarkty počas alebo po výmene srdcovej chlopne, resekciách aneuryzmu a transplantáciách srdca, trauma hlavy a miechy, infarkty obličiek (akútne zlyhanie obličiek, akútna obličková nedostatočnosť alebo poškodenie počas transplantácie obličky alebo po nej), poškodenia kostrových svalov, infarkty pečene (zlyhanie pečene, poškodenie počas transplantácie pečene alebo po nej), periférne neuropatie, AIDS demencia, septický šok, diabetes, neurodegeneratívne poruchy vyskytujúce sa po ischémii, trauma (kraniocerebrálna trauma), masívne krvácanie, subarachnoidálne hemorágie a mŕtvica, ako aj neurodegeneratívne poruchy ako Alzheimerova choroba, viacinfarktová demencia, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterálna skleróza, epilepsia, najmä generalizované epileptické záchvaty ako petit mal a tonikoklonické záchvaty a čiastočné epileptické záchvaty, napríklad temporálne lalokové a komplexné čiastočné záchvaty, zlyhanie obličiek, aj pri chemoterapii nádorov a prevencii metastáz a na liečbu zápalov a reumatických porúch, napr. reumatoidnej artritídy; ďalej na liečbu revaskularizácie kriticky zúžených koronárnych artérií a kriticky zúžených periférnych artérií, napr. artérií nohy.

„Ischémia“ na účely vynálezu zahŕňa lokalizované nedostatočné zásobovanie tkaniva kyslíkom spôsobené blokovaním arteriálneho prítoku krvi. Ku globálnej ischémii dochádza, keď je na obmedzené obdobie prerušený prítok krvi do celého mozgu. To môže byť spôsobené napríklad zástavou srdca. K fokálnej ischémii dochádza, keď je časť mozgu odrezaná od normálneho zásobovania krvou. Fokálnu ischémiu môže spôsobiť tromboembolické upchatie cievy, cerebrálna trauma, edémy alebo mozgový nádor. Aj prechodné ischémie môžu viesť k širokému spektru neurónového poškodenia. Hoci poškodenie „nervového tkaniva“ sa môže vyskytnúť dni alebo týždne po začiatku ischémie, určité permanentné poškodenie (napr. umieranie nervových buniek) nastáva v prvých niekoľkých minútach po prerušení zásobovania krvou. Toto poškodenie spôsobuje napríklad neurotoxická glutamátu a nasleduje po sekundárnej reperfúzii, napríklad po uvoľnení voľných radikálov (napr. voľné radikály kyslíka, voľné radikály NO). Ischémia sa môžu podobne vyskytnúť v iných orgánoch a tkanivách, napríklad v

srdci (infarkt myokardu a iné kardiovaskulárne poruchy spôsobené oklúziou koronárnych artérií) alebo v oku (ischémia sietnice).

Vynález sa ďalej týka použitia účinného terapeutického množstva väzobného partnera PARP na ovplyvnenie neurónovej aktivity. „Neurónová aktivita“ na účely vynálezu môže spočívať v stimulácii poškodených neurónov, podpore neurónovej regenerácie alebo liečbe neurónových porúch.

„Neurónové poškodenie“ na účely vynálezu zahŕňa každý typ poškodenia „nervového tkaniva“ a každé fyzické alebo mentálne narušenie alebo smrť v dôsledku tohto poškodenia. Príčina poškodenia môže byť svojou povahou napríklad metabolická, toxická, chemická alebo tepelná a zahŕňa napríklad ischémie, hypoxie, traumy, cerebrovaskulárne poškodenie, operácie, tlak, hemorágie, ožiarenie, vazospazmy, neurodegeneratívne poruchy, infekcie, epilepsiu, poruchy vnímania, poruchy metabolizmu glutamátu a sekundárne účinky nimi spôsobené.

„Nervové tkanivo“ na účely vynálezu zahŕňa rôzne komponenty tvoriace nervový systém pozostávajúci medzi iným z neurónov, buniek glia, astrocytov, Schwannových buniek, vnútra vaskulárneho systému a na zásobovanie, CNS, mozgu, mozgového kmeňa, miechy, periférneho nervového systému atď.

„Neuroprotektívny“ na účely vynálezu zahŕňa zníženie, zastavenie, spomalenie alebo zlepšenie neurónového poškodenia a ochranu, obnovu a regeneráciu nervového tkaniva, ktoré bolo vystavené neurónovému poškodeniu.

„Prevencia neurodegeneratívnych porúch“ zahŕňa možnosť prevencie, spomalenia a zlepšenia neurodegeneratívnych porúch u ľudí, u ktorých bola taká porucha diagnostikovaná, alebo ktorí sú v príslušných rizikových skupinách pre tieto neurodegeneratívne poruchy. Zahŕňa sa aj liečba ľudí už trpiacich symptómami týchto porúch.

„Liečba“ na účely vynálezu zahŕňa

- (i) prevenciu poruchy alebo stavu u ľudí s predispozíciou na ňu;
- (ii) prevenciu poruchy alebo stavu spomalením jeho postupu; a
- (iii) zlepšenie poruchy alebo stavu.

Príkladmi „neurologických porúch“, ktoré možno liečiť spôsobmi podľa vynálezu, sú neuralgie (trigeminálna, glosyfaryngálna), myasthenia gravis, svalové dystrofie, amyotrofická laterálna skleróza (ALS), progresívna svalová atrofia, periférne neuropatie spôsobené otravou (napr. otravou olovom), Guillain-Barreho syndróm, Huntingtonova choroba, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba alebo poruchy plexu. Spôsoby podľa vynálezu sú s výhodou vhodné na liečbu neurologických porúch vybraných spomedzi periférnych neuropatií spôsobených fyzickým zranením alebo chorobou; kraniálnej traumy, napríklad traumatického poranenia mozgu; fyzického poškodenia miechy; mŕtvice spojenej s poškodením mozgu, napríklad vaskulárna mŕtvica v spojení s hypoxiou a poškodením mozgu a poškodenie cerebrálnou reperfúziou; demyelinačných porúch (myelopatie, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterálna skleróza).

Spôsoby podľa vynálezu možno ďalej použiť na liečbu kardiovaskulárnych porúch. „Kardiovaskulárne poruchy“ na účely vynálezu zahŕňajú choroby, ktoré spôsobujú ischemie alebo ich spôsobujú ischemie alebo ischemia/reperfúzia srdca. Príkladmi sú poruchy koronárnych ciev (napríklad ateroskleróza), angina pectoris, infarkt myokardu, kardiovaskulárne poškodenie v dôsledku zástavy srdca alebo operácie bypassu.

Spôsoby podľa vynálezu možno použiť na liečbu rakoviny alebo na senzibilizáciu rakovinových buniek na radiačnú terapiu. Pojem „rakovina“ treba chápať v najširšom zmysle. Modulátory proteínov podľa vynálezu možno použiť ako „prostriedky protirakovinovej terapie“. Tieto spôsoby možno napríklad použiť na liečbu typov rakoviny alebo nádorových buniek ako sú nádory produkujúce ACTH, akútna lymfatická alebo lymfoblastická leukémia; akútna alebo chronická lymfocytická leukémia; akútna nelymfocytická leukémia; rakovina močového mechúra; nádory mozgu; rakovina prsníka; rakovina krku; chronická myelocytická leukémia; rakovina čreva; lymfóm zóny T; endometrióza; rakovina pažeráka; rakovina žlčníka; Ewingov sarkóm; rakovina hlavy a krku; rakovina jazyka; Hodgkinov lymfóm; FKaposiho sarkóm; rakovina obličiek; rakovina pečene; rakovina pľúc; mezotelióm; mnohonásobný myelóm; neuroblastóm; ne-Hodgkinov lymfóm; osteosarkóm; rakovina vaječníkov; glioblastóm; rakovina prsníka; rakovina

krku; rakovina prostaty; rakovina pankreasu; rakovina penisu; retinoblastóm; rakovina kože; rakovina žalúdka; rakovina štítnej žľazy; rakovina maternice; rakovina vagíny; Wilmov nádor alebo trofoblastóm.

„Rádiosenzibilizátor“ alebo „senzibilizátor na žiarenie“ sa na účely vynálezu vzťahuje na molekuly, ktoré zvyšujú citlivosť buniek v tele na ožiarenie elektromagnetickým žiarením (napríklad röntgenové lúče), alebo urýchľujú toto liečenie ožarovaním. Senzibilizátory na žiarenie zvyšujú citlivosť rakovinových buniek na toxické účinky elektromagnetického žiarenia. Medzi tieto látky publikované v literatúre patrí mitomycín C, 5-brómdeoxyuridín a metronidazol. Možno použiť žiarenie s vlnovými dĺžkami v rozmedzí od 10^{-20} do 10 metrov, s výhodou gama žiarenie (10^{-20} až 10^{-13} m), röntgen (10^{-11} až 10^{-9} m), ultrafialové žiarenie (10 nm až 400 nm), viditeľné svetlo (400 nm až 700 nm), infračervené žiarenie (700 nm až 1 mm) a mikrovlnové žiarenie (1 mm až 30 cm).

Poruchy, ktoré možno liečiť takou terapiou, sú najmä neoplastické poruchy, benígne alebo malígne nádory a rakovina. Elektromagnetickým žiarením možno liečiť aj iné poruchy.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Predložený vynález bude teraz opísaný podrobnejšie s odkazom na pripojené obrázky. Tieto zobrazujú:

Na obrázku 1 je zarovnanie sekvencií ľudskej PARP (ľudská PARP1) a dvoch PARP výhodných podľa vynálezu (ľudská PARP2, ľudská PARP3, myšacia PARP3). Zhody sekvencií medzi ľudskou PARP1 a ľudskou PARP2, ľudskou PARP3 alebo myšacou PARP3 sú zobrazené v rámečkoch. Väčšinová sekvencia je indikovaná cez celé zarovnanie. Motívy zinkových prstov ľudskej PARP1 sa nachádzajú v sekciách sekvencie zodpovedajúcich aminokyselinovým zvyškom 21 až 56 a 125 až 162;

Na obrázku 2 Northern blots s rôznymi ľudskými tkanivami ilustrujú tkanivovú distribúciu molekúl PARP2 a PARP3 podľa vynálezu. Dráha 1: mozog; dráha 2: srdce; dráha 3: kostrový sval; dráha 4: hrubé črevo; dráha 5: týmus; dráha 6: slezina; dráha 7: oblička; dráha 8: pečeň; dráha 9: tenké črevo; dráha 10:

placenta; dráha 11: pľúca; dráha 12: leukocyty periférnej krvi; príslušná pozícia veľkostného štandardu (kb) je vyznačená.

Na obrázku 3 Northern blot s ďalšími rôznymi ľudskými tkanivami ilustruje tkanivovú distribúciu molekuly PARP3 podľa vynálezu. Dráha 1: srdce; dráha 2: mozog; dráha 3: placenta; dráha 4: pľúca; dráha 5: pečeň; dráha 6: kostrový sval; dráha 7: oblička; dráha 8: pankreas; príslušná pozícia veľkostného štandardu (kb) je vyznačená.

Na obrázku 4 Western blot s rôznymi ľudskými tkanivami ilustruje tkanivovú distribúciu molekuly PARP3 podľa vynálezu na úrovni proteínov. Dráha 1: srdce; dráha 2: pľúca; dráha 3: pečeň; dráha 4: slezina; dráha 5: oblička; dráha 6: hrubé črevo; dráha 7: sval; dráha 8: mozog; príslušná pozícia veľkostného štandardu (kD) je vyznačená.

Na obrázku 5 Western blot s rôznymi ľudskými tkanivami ilustruje tkanivovú distribúciu molekuly PARP3 podľa vynálezu. Dráha 1: predný kortex; dráha 2: posteriórny kortex; dráha 3: cerebellum; dráha 4: hipokampus; dráha 5: očná buľva; dráha 6: prúžkované teleso; dráha 7: talamus; dráha 8: stredný mozog; dráha 9: entorinálny kortex; dráha 10: mostík; dráha 11: dreň; dráha 12: miecha.

Na obrázku 6 je diagram testu PARP (ELISA).

Na obrázku 7 je diagram testu PARP (HTRF).

Ďalšie výhodné uskutočnenia vynálezu sú opísané v nasledujúcich častiach.

Homológy PARP a funkčné ekvivalenty

Ak nie je uvedené inak, na účely predloženého popisu sú aminokyselinové sekvencie uvádzané od N konca. Ak sa pre aminokyseliny používa jednopísmenový kód, G je glycín, A je alanín, V je valín, L je leucín, I je izoleucín, S je serín, T je treonín, D je kyselina asparágová, N je asparagín, E je kyselina glutámová, Q je glutamín, W je tryptofán, H je histidín, R je arginín, P je prolín, K je lyzín, Y je tyrozín, F je fenylalanín, C je cysteín a M je metionín.

Predložený vynález nie je obmedzený na homológy PARP špecificky opísané vyššie. Naopak, sú zahrnuté aj homológy, ktoré sú ich funkčnými ekvivalentmi. Medzi funkčné ekvivalenty patria prírodné, napríklad druho špecifické alebo orgánovo špecifické, a umelo vyrábané varianty proteínov tu špecificky opísaných. Funkčné ekvivalenty podľa vynálezu sa líšia adíciou, substitúciou, inverziou, inzerciou a/alebo deléciou jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov ľudskej PARP2 (sekvencia č. 2), ľudskej PARP3 (sekvencia č. 4 a 6) a myšacej PARP3 (sekvencia č. 8 a 10), pričom tu existuje aspoň retencia funkcie viazania NAD proteínu sprostredkovaného funkčnou katalytickou C-koncovou doménou. Podobne by pokiaľ možno mala byť zachovaná katalytická aktivita produkcie poly(ADP-ribózy). Ak sa to hodí, medzi funkčné ekvivalenty patria varianty, v ktorých je v zásade zachovaný región podobný leucínovému zipsu.

Ďalej je možné, napríklad vychádzajúc zo sekvencie pre ľudskú PARP2 alebo ľudskú PARP3, nahradiť isté aminokyseliny aminokyselinami s podobnými fyzikálnochemickými vlastnosťami (objem, bázickosť, hydrofóbnosť atď.). Je napríklad možné nahradiť arginínové zvyšky lyzínovými zvyškami, valínové zvyšky izoleucínovými zvyškami alebo zvyšky kyseliny asparágovej zvyškami kyseliny glutámovej. Je však tiež možné jednu alebo viacero aminokyselín v sekvencii vymeniť, pridať alebo odstrániť, alebo možno skombinovať niekoľko takýchto úkonov. Proteíny, ktoré boli modifikované takýmto spôsobom zo sekvencie ľudskej PARP2 alebo ľudskej PARP3, majú aspoň 60 %, s výhodou aspoň 75 %, s osobitnou výhodou aspoň 85 % homológiu s východiskovou sekvenciou, počítané pomocou algoritmu Pearsona a Lipmana, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Nasledujúce homológie boli určené na aminokyselinovej úrovni a úrovni DNA medzi ľudskou PARP1, 2 a 3 (program FastA, Pearson a Lipman, loc. cit.):

Aminokyselinové homológie:

	Percento identickosti	Percento identickosti v podpise PARP
PARP1/PARP2	41,97 % (517)	86 % (50)
PARP1/PARP3	33,81 % (565)	53,1 % (49)
PARP2/PARP3	35,20 % (537)	53,1 % (49)

Čísla v zátvorkách znamenajú počet prekrývajúcich sa aminokyselín.

Homológie DNA:

	Percento identickosti v ORF	Percento identickosti v podpise PARP
PARP1/PARP2	60,81 % (467)	77,85 % (149)
PARP1/PARP3	58,81 % (420)	59,02 % (61)
PARP2/PARP3	60,22 % (269)	86,36 % (22)

Čísla v zátvorkách znamenajú počet prekrývajúcich sa nukleotidov.

Polypeptidy podľa vynálezu možno klasifikovať ako homologické poly(ADP-ribózové) polymerázy na báze veľkej podobnosti v regióne katalytickej domény.

Pre vynález je tiež podstatné, že nové homológy PARP nemajú konvenčné motívy zinkových prstov. To znamená, že tieto enzýmy nie sú nutne zapojené do opravy DNA, alebo sú do nej zapojené spôsobom, ktorý sa líši od PARP1, ale sú stále schopné vykonávať svoj patologický mechanizmus (spotreba NAD⁺ a tým spotreba energie v dôsledku spotreby ATP). Silná expresia proteínov, najmä pri PARP3, pozorovateľná na Western blot, naznačuje významnú úlohu v spotrebe NAD. Toto je osobitne dôležité pre vývoj liečiv. Potenciálne nové inhibítory polymeráz podľa vynálezu môžu takto inhibovať patologické funkcie bez toho, aby mali nepriaznivý účinok na požadované fyziologické vlastnosti. Toto bolo nemožné pri inhibítoroch proti PARP známym doposiaľ, pretože pri nich vždy dochádzalo aj k inhibícii opravnej funkcie DNA. Potenciálne mutagénny účinok známych inhibítorov PARP je takto ľahko pochopiteľný. Možno si tiež predstaviť konštruovanie inhibítorov PARP tak, aby účinne inhibovali všetky homológy PARP s vysokou afinitou. V tomto prípade je tam, kde je to vhodné, možný potenciovateľný účinok.

Homológ PARP, ktorý je výhodný podľa vynálezu a je zobrazený v sekvencii č. 2 (ľudská PARP2), možno s výhodou izolovať z ľudského mozgu, srdca, kostrového svalstva, obličiek a pečene. Expressia ľudskej PARP2 v iných tkanivách alebo orgánoch je výrazne slabšia.

Homológ PARP, ktorý je výhodný podľa vynálezu a je zobrazený v sekvencii č. 4 a 6 (ľudská PARP3), možno s výhodou izolovať z ľudského mozgu (v tomto prípade s veľkou výhodou z hipokampu), srdca, kostrového svalstva, pečene alebo obličiek. Expressia ľudskej PARP3 v iných tkanivách alebo orgánoch, napríklad v svaloch alebo pečeni, je výrazne slabšia.

Odborník na izoláciu proteínov využije kombináciu preparatívnych metodík, ktoré sú najvhodnejšie v každom prípade na izoláciu prírodných PARP podľa vynálezu z tkanív, alebo rekombinantne pripravených PARP podľa vynálezu z bunkových kultúr. Vhodné štandardné preparatívne metódy sú opísané napríklad v Cooper, T. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, vydavateľ Walter de Gruyter, Berlín, New York, alebo v Scopes, R. *Protein Purification*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlín.

Vynález sa okrem toho týka homológov PARP2 a PARP3, ktoré, hoci ich možno izolovať z iných eukaryotických druhov, t.j. bezstavovcov alebo stavovcov, najmä iných cicavcov ako napríklad z myší, potkanov, mačiek, psov, sviň, oviec, dobytká, koní alebo opíc, alebo z iných orgánov, napríklad z myokardu, majú podstatné štrukturálne a funkčné vlastnosti predurčené enzýmami PARP podľa vynálezu.

Konkrétne, ľudská PARP2, ktorú možno izolovať z ľudského mozgu, a jej funkčné ekvivalenty, sú výhodnými prostriedkami na vývoj inhibítorov neurodegeneratívnych chorôb, napríklad mŕtvice. Je to preto, lebo možno predpokladať, že vývoj liečiv na báze PARP2 ako indikátora umožňuje vyvinúť inhibítory, ktoré sú optimalizované na použitie v ľudskom mozgu. Nemožno však vylúčiť, že inhibítory vyvinuté na báze PARP2 možno použiť aj na liečbu patologických stavov sprostredkovaných PARP v iných orgánoch (pozrite tkanivovú distribúciu proteínov podľa vynálezu).

PARP2 a pravdepodobne aj PARP3 sú tiež, podobne ako PARP1, aktivované poškodenou DNA, hoci pravdepodobne iným mechanizmom. Význam pri oprave DNA je zrejmy. Blokáda PARP podľa vynálezu by tiež bola prospešná pri indikáciách ako rakovina (napr. pri rádiosenzibilizácii pacientov s nádorom).

Ďalšiu zásadnú biologickú vlastnosť PARP podľa vynálezu a ich funkčné ekvivalenty treba vidieť v ich schopnosti viazať interagujúceho partnera. Ľudské PARP2 a 3 sa líšia od skôr publikovaných PARP z vyšších eukaryotov, napríklad cicavcov, tým, že majú potenciálne takzvané motívy leucínových zipsov. Toto je typický motív pre interakcie proteín-proteín. Je možné, že tieto motívy umožňujú moduláciu aktivity PARP interagujúcim partnerom. Tento dodatočný štruktúrny prvok takto tiež poskytuje možné východisko pre vývoj efektorov PARP, ako sú napríklad inhibítory.

Vynález sa teda ďalej týka proteínov, ktoré interagujú s PARP2 a/alebo 3, s výhodou tých, ktoré spôsobujú ich aktiváciu alebo inaktiváciu.

Vynález sa ďalej týka proteínov, ktoré ešte majú vyššie uvedenú aktivitu viazania ligandu a ktoré možno pripraviť vychádzajúc zo špecificky uvedených aminokyselinových sekvencií cielenými modifikáciami.

Vychádzajúc z peptidovej sekvencie proteínov podľa vynálezu je možné generovať syntetické peptidy, ktoré sa používajú, samotné alebo v kombinácii, ako antigény na výrobu polyklonálnych alebo monoklonálnych protilátok. Na generovanie protilátok je tiež možné použiť proteín PARP alebo jeho fragment. Vynález sa teda týka aj peptidových fragmentov proteínov PARP podľa vynálezu, ktoré obsahujú charakteristické čiastkové sekvencie, najmä tých oligo- alebo polypeptidov, ktoré obsahujú aspoň jeden z vyššie uvedených sekvenčných motívov. Fragmenty tohto typu možno získať napríklad proteolytickým štiepením proteínov PARP alebo chemickou syntézou peptidov.

Noví špecifickí väzobní partneri PARP2 a PARP3

Aktívne a s výhodou selektívne inhibítory proti proteínom podľa vynálezu sa vyvinuli s použitím špecifických testových systémov opísaných vyššie na

väzobných partnerov pre PARP2 a PARP3. Tieto inhibítory môžu byť aktívne aj proti PARP1.

Inhibítory poskytnuté podľa vynálezu majú silnú inhibičnú aktivitu na PARP2. Hodnoty K_i môžu byť v tomto prípade menej ako asi 1000 nM, napríklad menej ako asi 700 nM, menej ako asi 200 nM alebo menej ako asi 30 nM, napr. okolo 1 až 20 nM.

Inhibítory podľa vynálezu môžu tiež mať prekvapujúcu selektivitu pre PARP2. Toto ukazuje pomer $K_i(\text{PARP1}) : K_i(\text{PARP2})$ pre také inhibítory podľa vynálezu, ktorý je napríklad väčší ako 3 alebo väčší ako 5, napríklad väčší ako 10 alebo väčší ako 20.

Príkladom, ktorý treba spomenúť, je 4-(N-(4-hydroxyfenyl)aminometyl)-(2H)-dihydroftalazín-1-ón. Príprava tejto a iných analogických zlúčenín sa môže uskutočniť podľa literatúry: Puodzhyunas et al., Pharm. Chem. J. 1973, 7, 566 alebo Mazkanowa et al., Zh. Obshch. Khim., 1958, 28, 2798, alebo Mohamed et al., Ind. J. Chem. B., 1994, 33, 769, všetky zahrnuté odkazom.

Vyššie uvedená zlúčenina vykazuje hodnotu K_i 113 nM pre PARP2 a je osemkrát selektívnejšia pre PARP2 ako pre PARP3.

Nukleové kyseliny kódujúce homológy PARP:

Ak nie je uvedené inak, nukleotidové sekvencie sú v predloženom popise uvedené v smere od konca 5' po koniec 3'.

Vynález sa ďalej týka sekvencií nukleových kyselín, ktoré kódujú vyššie uvedené proteíny, najmä tých, ktoré majú aminokyselinovú sekvenciu znázornenú sekvenciou č. 2, 4, 6, 8 a 10, ale bez obmedzenia na uvedené. Sekvencie nukleových kyselín, ktoré možno použiť podľa vynálezu, zahŕňajú aj alelické varianty, ktoré, ako je opísané vyššie pre aminokyselinové sekvencie, možno získať deléciou, inverziou, inzerciou, adíciou a/alebo substitúciou nukleotidov, s výhodou nukleotidov znázornených sekvenciou č. 1, 3, 7 a 9, ale so zásadným zachovaním biologických vlastností a biologickej aktivity príslušného génového produktu. Nukleotidové sekvencie, ktoré možno použiť, sa získavajú napríklad

nukleotidovými substitúciami spôsobujúcimi tiché (bez zmeny aminokyselinovej sekvencie) alebo konzervatívne zmeny aminokyselín (výmena aminokyselín rovnakej veľkosti, náboja, polarity alebo rozpustnosti).

Sekvencie nukleových kyselín podľa vynálezu zahŕňajú aj funkčné ekvivalenty génov, napríklad eukaryotické homológy napríklad z bezstavovcov ako *Caenorhabditis* alebo *Drosophila*, alebo stavovcov, s výhodou z cicavcov opísaných vyššie. Výhodné gény sú gény zo stavovcov, ktoré kódujú génový produkt, ktorý má vlastnosti podstatné pre vynález podľa vyššie uvedeného popisu.

Nukleové kyseliny podľa vynálezu možno získať konvenčným spôsobom rôznymi cestami:

Napríklad genomickú alebo cDNA knižnicu možno skrínovať na DNA, ktorá kóduje molekulu PARP alebo jej časť. Napríklad cDNA knižnicu získanú z ľudského mozgu, srdca alebo obličky možno skrínovať s vhodnou sondou, napríklad označeným jednovláknovým fragmentom DNA, ktorý zodpovedá čiastočnej sekvencii vhodnej dĺžky vybranej spomedzi sekvencií č. 1 alebo 3 alebo sekvencie k nim doplnkovej. Na tento účel je napríklad možné fragmenty DNA knižnice, ktoré boli prenesené do vhodného klonovacieho vektora, platničkovať na agarové platničky po transformácii do baktérie. Klony možno potom preniesť na nitrocelulóзовé filtre a po denaturácii DNA hybridizovať s označenou sondou. Potom sa izolujú a charakterizujú pozitívne klony.

DNA kódujúcu homológy PARP podľa vynálezu alebo čiastkové fragmenty možno tiež syntetizovať chemicky vychádzajúc zo sekvenčnej informácie obsiahnutej v predloženej prihláške. Na tento účel je napríklad možné, aby sa syntetizovali oligonukleotidy s dĺžkou asi 100 báz a sekvenčne sa ligovali známym spôsobom, napríklad poskytnutím vhodných koncových miest reštrikčného štiepenia.

Nukleotidové sekvencie podľa vynálezu možno tiež pripraviť pomocou reakcie polymerázového reťazca (PCR). Pri nej sa cieľová DNA ako napríklad DNA z vhodného klonu s plnou dĺžkou hybridizuje s párom syntetických oligonukleotidových primérov, ktoré majú dĺžku asi 15 báz a ktoré sa viažu na opačné konce

cieľovej DNA. Úsek sekvencie ležiaci medzi nimi sa potom vyplní DNA polymerázou. Mnohonásobné opakovanie tohto cyklu umožňuje amplifikáciu cieľovej DNA (White et al.(1989), Trends Genet. 5, 185).

Sekvencie nukleových kyselín podľa vynálezu zahŕňajú aj skrátené sekvencie, jednovláknové DNA alebo RNA kódujúcej alebo nekódujúcej, doplnkovej sekvencie DNA, sekvencie mRNA a cDNA z nich odvodené.

Vynález ďalej zahŕňa nukleotidové sekvencie hybridizujúce s vyššie uvedenými sekvenciami za stringentných podmienok. Stringentné hybridizačné podmienky na účely predloženého vynálezu existujú vtedy, keď hybridizujúce sekvencie majú homológiu asi 70 až 100 %, napríklad asi 80 až 100 % alebo 90 až 100 % (s výhodou v aminokyselinovom úseku aspoň asi 40, napríklad asi 50, 100, 150, 200, 400 alebo 500 aminokyselín).

Stringentné podmienky pre skríning DNA, konkrétne cDNA bánk, existujú napríklad vtedy, keď sa hybridizačná zmes premyje 0,1X tlmivým roztokom SSC (20X tlmivý roztok SSC = 3M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0) a 0,1 % SDS pri teplote asi 60 °C.

Analýzy Northern blot sa napríklad premývajú za stringentných podmienok 0,1X SSC, 0,1 % SDS pri teplote asi 65 °C.

Deriváty a expresné konštrukty nukleových kyselín:

Sekvencie nukleových kyselín treba tiež chápať tak, že zahŕňajú deriváty ako napríklad promótorové varianty alebo alternatívne štiepne varianty. Promótory operatívne pripojené nahor od nukleotidových sekvencií podľa vynálezu môžu byť navyše modifikované adíciami, substitúciami, inverziami, inzerciami a/alebo deléciami nukleotidov, ale bez narušenia funkčnosti alebo aktivity promótorov. Promótory môžu mať tiež zvýšenú aktivitu modifikáciou svojich sekvencií, alebo môžu byť úplne nahradené efektívnejšími promótorami dokonca z heterologických organizmov. Vyššie opísané promótorové varianty sa používajú na prípravu expresných kaziet podľa vynálezu.

Špecifické príklady štiepných variantov ľudskej PARP2, ktoré možno spomenúť, sú:

Variantná ľudská PARP2a: Delécia bázových párov 766 až 904 (porovnaj te sekvenciu č. 1). Toto vedie k rámcovému posunu s novým stop kodónom („TAA“ zodpovedajúcim nukleotidom 922 až 924 v sekvencii č. 1).

Variantná ľudská PARP2b: Inzercia 5'- gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg -3' za nukleotid 204 (sekvencia č. 1). Toto predlžuje aminokyselinovú sekvenciu inzerciou: GMPGRSWASKRVS

Deriváty nukleových kyselín tiež znamenajú varianty, ktorých nukleotidové sekvencie v regióne od -1 do -1000 pred štartovým kodónom boli modifikované tak, že sa zvýšila expresia génu a/alebo proteínu.

Okrem vyššie opísanej nukleotidovej sekvencie zahŕňajú konštrukty nukleovej kyseliny, ktoré možno použiť podľa vynálezu, vo funkčnom, operatívnom prepojení jednu alebo viacero iných regulačných sekvencií, napríklad promótor, amplifikačné signály, enhancery, polyadenylačné sekvencie, zdroje replikácie, reportérové gény, vyberateľné markerové gény a podobne. Toto prepojenie môže v závislosti od požadovaného použitia viesť k zvýšeniu alebo zníženiu expresie génu.

Popri nových regulačných sekvenciách je možné, aby bola pred vlastnými štruktúrnymi génmi prítomná ešte aj prirodzená regulačná sekvencia. Táto prirodzená regulácia môže byť tam, kde sa to hodí, vypnutá genetickou modifikáciou a expresiu génov možno zvýšiť alebo znížiť. Génový konštrukt však môže mať aj jednoduchšiu štruktúru, teda pred štruktúrnymi génmi nemusia byť vložené žiadne dodatočné regulačné signály a prírodný promótor so svojou reguláciou nemusí byť odstránený. Namiesto toho sa prírodná regulačná sekvencia mutuje takým spôsobom, že regulácia už neprebíha a expresia génu je zvýšená alebo znížená. Na koniec 3' sekvencií nukleových kyselín je tiež možné vložiť dodatočné výhodné regulačné prvky. Sekvencie nukleových kyselín môžu byť v génovom konštrukte prítomné v jednej alebo viacerých kópiách.

Výhodné regulačné sekvencie pre expresnú metódu podľa vynálezu sú napríklad prítomné v promótoroch, ako sú napríklad *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *5P6*, *1-PR* alebo *1-PL*, ktorý sa s výhodou používa v gramnegatívnych baktériách. Ďalšie výhodné regulačné sekvencie sú prítomné napríklad v grampozitívnych promótoroch *amy* a *SPO2*, v kvasnicových promótoroch *ADCI*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* alebo v rastlinných promótoroch *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* alebo v ubichitínovom alebo fazeolínovom promótoře.

V zásade je možné použiť všetky prírodné promótoři so svojimi regulačnými sekvenciami. Je tiež možné a výhodné použiť syntetické promótoři.

Uvedené regulačné sekvencie majú umožniť špecifickú expresiu sekvencií nukleových kyselín a proteínov. To môže znamenať napríklad v závislosti od hostiteľského organizmu, že gén sa bude exprimovať alebo nadmerne exprimovať len po indukcii, alebo že sa bude exprimovať alebo nadmerne exprimovať okamžite.

Regulačné sekvencie alebo faktory môžu navyše s výhodou mať pozitívny vplyv na expresiu, teda ju zvyšovať alebo znižovať. Takto môže posilnenie regulačných prvkov s výhodou prebehnúť na úrovni transkripcie pomocou silných transkripčných signálov ako promótorov a/alebo enhancerov.

Je však tiež možné zvýšiť transláciu napríklad zlepšením stability mRNA.

Enhancery znamenajú napríklad sekvencie DNA, ktoré prinášajú zvýšenú expresiu cez zlepšenú interakciu medzi RNA polymerázou a DNA.

Rekombinantný konštrukt nukleovej kyseliny alebo génový konštrukt sa na expresiu vo vhodnom hostiteľskom organizme s výhodou vkladá do hostiteľsky špecifického vektora, ktorý umožňuje optimálnu expresiu génov v hostiteľovi. Vektory sú odborníkom známe a možno ich nájsť napríklad v „Cloning Vectors“ (Pouwels P. H. et al., Ed., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Okrem plazmidov vektory znamenajú aj všetky iné vektory známe odborníkom, ako sú napríklad fágy, vírusy, napríklad 5V40, CMV, baculovírus a adenovírus, transpozóny, IS elementy, fazmidy, kozmidy a lineárna alebo cirkulárna DNA. Tieto

vektory môžu v hostiteľskom organizme podliehať autonómnej replikácii alebo chromozómovej replikácii.

Expresia konštruktov:

Rekombinantné konštrukty podľa vynálezu opísané vyššie sa s výhodou zavádzajú do vhodného hostiteľského systému a exprimujú sa. Na vyvolanie expresie uvedených nukleových kyselín v konkrétnom expresnom systéme sa s výhodou používajú klonovacie a transfekčné metódy známe odborníkom. Vhodné systémy sú opísané napríklad v *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., ed., Wiley Interscience, New York 1997.

Vhodnými hostiteľskými organizmami sú v zásade všetky organizmy, ktoré umožňujú exprimovať nukleové kyseliny podľa vynálezu, ich alelické varianty, ich funkčné ekvivalenty alebo deriváty alebo rekombinantné konštrukty nukleových kyselín. Hostiteľské organizmy znamenajú napríklad baktérie, plesne, kvasnice, rastlinné alebo zvieracie bunky. Výhodnými organizmami sú baktérie, napríklad baktérie rodu *Escherichia*, napríklad *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* alebo *Pseudomonas*, eukaryotické mikroorganizmy ako *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, vyššie eukaryotické bunky zo zvierat alebo rastlín, napríklad bunky Sf9 alebo CHO.

Génový produkt môže byť v prípade potreby exprimovaný v transgénnych organizmoch, napríklad v transgénnych zvieratách, ako sú myši, ovce, alebo v transgénnych rastlinách. Transgénne organizmy môžu byť aj takzvané knock-out zvieratá alebo rastliny, v ktorých bol príslušný endogénny gén vypnutý, napríklad mutáciou alebo čiastočnou alebo úplnou deléciou.

Kombinácia hostiteľských organizmov a vektorov vhodných pre organizmy, napríklad plazmidov, vírusov alebo fágov, ako sú napríklad plazmidy so systémom RNA polymeráza/promótor, fágy λ , μ alebo iné umiernené fágy alebo transpozóny a/alebo iné výhodné regulačné sekvencie, tvorí expresný systém. Pojem expresné systémy s výhodou znamená napríklad kombináciu buniek cicavcov, napríklad buniek CHO, a vektorov, napríklad pcDNA3neo vektora, ktoré sú vhodné pre bunky cicavcov.

Ako je opísané vyššie, génový produkt možno s výhodou exprimovať v transgénnych zvieratách, napríklad myšiach alebo ovciach, alebo v transgénnych rastlinách. Je podobne možné programovať bezbunkové translačné systémy s RNA odvodenou od nukleovej kyseliny.

Génový produkt možno tiež exprimovať vo forme terapeuticky alebo diagnosticky vhodných fragmentov. Aby sa izoloval rekombinantný proteín, je možné a výhodné použiť vektorové systémy alebo oligonukleotidy, ktoré predlžujú cDNA o isté nukleotidové sekvencie a tým kódujú modifikované polypeptidy, ktoré slúžia na zjednodušenie čistenia. Vhodnými modifikáciami tohto typu sú napríklad takzvané prívesky, ktoré pôsobia ako kotvy, napríklad modifikácia známa ako hexahistidínová kotva, alebo epitopy, ktoré môžu protilátky rozpoznať ako antigény (opísané napríklad v Harlow, E. a Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Tieto kotvy možno použiť na pripojenie proteínov na tuhý nosič, napríklad polymérovú maticu, ktorá môže byť napríklad naplnená do chromatografickej kolóny alebo na mikrotitračnú platničku alebo na iný nosič.

Tieto kotvy možno súčasne použiť aj na rozpoznávanie proteínov. Na rozpoznávanie proteínov možno tiež použiť konvenčné markery ako fluorescenčné farbivá, enzýmové markery, ktoré tvoria zistiteľný reakčný produkt po reakcii so substrátom, alebo rádioaktívne markery, samotné alebo v kombinácii s kotvami na derivatizáciu proteínov.

Produkcia protilátok:

Anti-PARP2 protilátky sa produkujú spôsobom známym odborníkom. Protilátky znamenajú polyklonálne, monoklonálne, ľudské alebo humanizované protilátky alebo ich fragmenty, jednoreťazcové protilátky alebo tiež syntetické protilátky, podobne aj protilátkové fragmenty ako Fv, Fab a F(ab')₂. Vhodné produkčné metódy sú opísané napríklad v publikácii Campbell, A. M., *Monoclonal Antibody Technology*, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford a v Breitling, F. a Dubel, S., *Rekombinante Antikörper* (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Ďalšie použitie kódovacej sekvencie:

Predložená cDNA ďalej poskytuje bázu na klonovanie genomickej sekvencie nových génov PARP. To zahŕňa aj relevantnú regulačnú alebo promótorovú sekvenciu, ktorá je dostupná napríklad sekvencovaním regiónu nachádzajúceho sa 5' nahor od cDNA podľa vynálezu alebo v intrónoch génov. Sekvenčná informácia cDNA je tiež základom pre produkciu antisense molekúl alebo ribozýmov pomocou známych metód (Jones, J. T. a Sallenger, B. A. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 902; Nellen, W. a Lichtenstein, C. (1993) TIBS, 18, 419). Genomickú DNA možno podobne použiť na produkciu génových konštruktov opísaných vyššie.

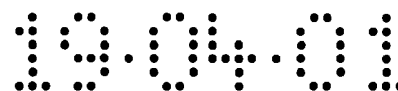
Ďalšia možnosť použitia nukleotidovej sekvencie alebo jej častí je generovanie transgénnych zvierat. Transgénna nadmerná expresia alebo genetický knock-out sekvenčnej informácie vo vhodnom zvieracom modeli môže poskytnúť ďalšie vhodné informácie o (pato)fyziológii nových génov.

Terapeutické aplikácie:

V situáciách, kde existuje prevažujúca nedostatočnosť proteínu podľa vynálezu, je možné použiť niekoľko spôsobov náhrady. Na jednej strane možno proteín, prírodný alebo rekombinantný, podať priamo alebo génovou terapiou vo forme jeho kódujúcej nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA). Na to možno použiť akékoľvek vhodné vektory, napríklad vírusové a nevírusové vehikulá. Vhodné metódy opísal napríklad Strauss a Barranger v Concepts in Gene Therapy (1997), Walter de Gruyter, vydavateľ. Ďalšiu alternatívu poskytuje stimulácia endogénneho génu vhodnými činidlami.

Je tiež možné blokovať obrat alebo inaktiváciu PARP podľa vynálezu, napríklad proteázami. Nakoniec možno použiť inhibítory alebo agonistov PARP podľa vynálezu.

V situáciách, kde je PARP prítomná v nadbytku alebo je nadmerne aktivovaná, možno použiť rôzne typy inhibítorov. Túto inhibíciu možno dosiahnuť antisense molekulami, ribozýmami, oligonukleotidmi alebo protilátkami a nízko-molekulovými zlúčeninami.



Účinné látky podľa vynálezu, t.j. PARP proteíny, nukleové kyseliny a väzobných partnerov PARP ako napríklad protilátky alebo modulátory, možno podávať buď ako samostatné terapeuticky účinné látky alebo ako zmesi s inými terapeuticky účinnými látkami. Možno ich podávať ako také, ale vo všeobecnosti sa podávajú vo forme farmaceutických kompozícií, t.j. ako zmesi účinných látok s aspoň jedným vhodným farmaceutickým nosičom alebo riedidlom. Účinné látky alebo kompozície možno podávať akýmkoľvek vhodným spôsobom pre konkrétny terapeutický účel, napríklad orálne alebo parenterálne.

Povaha farmaceutickej kompozície a farmaceutického nosiča alebo riedidla závisí od požadovaného režimu podávania. Orálne kompozície môžu byť napríklad vo forme tabliet alebo kapsúl a môžu obsahovať zvyčajné pomocné látky ako napríklad spojivá (napr. sirup, arabskú gumu, želatínu, sorbitol, tragant alebo polyvinylpyrolidón), plnivá (napr. laktóza, cukor, kukuričný škrob, fosforečnan vápenatý, sorbitol alebo glycín), mazivá (napr. stearan horečnatý, mastenec, polyetylénglykol alebo oxid kremičitý), dezintegrátory (napr. škrob) alebo zmáčadlá (napr. natrium laurylsulfát). Orálne kvapalné produkty môžu byť vo forme vodných alebo olejovitých suspenzií, roztokov, sirupov, elixírov alebo sprejov atď., alebo môžu byť vo forme suchých práškov na rekonštitúciu s vodou alebo iným vhodným nosičom. Kvapalné produkty týchto typov môžu obsahovať konvenčné prísady, napríklad suspenzné činidlá, príchute, riedidlá alebo emulgátory. Na parenterálne podávanie možno použiť roztoky alebo suspenzie s konvenčnými farmaceutickými nosičmi. Parenterálne podanie účinných látok podľa vynálezu sa s výhodou uskutočňuje s použitím kvapalnej farmaceutickej kompozície, ktorú možno podávať parenterálne, najmä intravenózne. Táto s výhodou obsahuje účinné množstvo aspoň jednej účinnej látky, s výhodou v rozpustenej forme, vo farmaceuticky prijateľnom nosiči vhodnom na tento účel. Príkladmi farmaceutických nosičov vhodných na tento účel sú najmä vodné roztoky ako napríklad fyziologický roztok, fosfátom tlmený fyziologický roztok, Ringerov roztok, Ringerov laktátový roztok a podobne. Kompozícia môže navyše obsahovať ďalšie prísady ako antioxidanty, chelátovacie činidlá alebo antimikrobiálne činidlá.

Voľba dávkovania účinných látok podľa vynálezu a konkrétny harmonogram dávkovania závisia od rozhodnutia ošetrojúceho lekára. Ten vyberie vhodnú dávku



a vhodný harmonogram podávania v závislosti od zvolenej cesty podania, od účinnosti lieku v každom prípade od povahy a závažnosti poruchy, ktorá sa má liečiť, a od stavu pacienta a jeho reakcie na liečbu. Takto napríklad možno farmakologicky účinné látky podávať cicavcovi (človeku alebo zvieratu) v dávkach asi 0,5 mg až asi 100 mg na kg telesnej hmotnosti a deň. Možno ich podávať v jednej dávke alebo v niekoľkých dávkach.

Neterapeutické aplikácie:

Nukleové kyseliny podľa vynálezu, ako je napríklad cDNA, genomická DNA, promótor a polypeptid a ich čiastkové fragmenty možno použiť aj v rekombinantnej alebo nerekombinantnej forme na vývoj rôznych testovacích systémov.

Je napríklad možné zaviesť testovací systém, ktorý bude vhodný na meranie aktivity promótoru alebo proteínu za prítomnosti testovanej látky. Metódy merania v tomto prípade sú s výhodou jednoduché, napr. kolorimetrická, luminometrická, fluorimetrická, imunologická alebo rádioaktívna, a umožňujú s výhodou rýchle meranie veľkého počtu testovaných látok. Testy tohto typu sú vhodné a výhodné pre takzvaný vysokovýkonný skríning. Tieto testovacie systémy umožňujú hodnotenie testovaných látok na ich viazanie, agonizmus, antagonizmus alebo inhibíciu proteínov podľa vynálezu.

Určenie množstva, aktivity a distribúcie proteínov podľa vynálezu alebo základnej mRNA v ľudskom tele možno použiť na diagnostiku, na určenie predispozície a na monitoring istých chorôb. Podobne sekvencia cDNA a genomická sekvencia môže poskytnúť informácie o genetických príčinách a predispozíciách na isté choroby. Na tento účel možno použiť DNA/RNA sondy aj protilátky širokého spektra typov. Nukleotidové sekvencie podľa vynálezu alebo ich časti možno ďalej použiť vo forme vhodných sond na detekciu bodových mutácií, delícií alebo inzercíí.

Proteíny podľa vynálezu možno ďalej použiť na identifikáciu a izoláciu ich prirodzených ligandov alebo interagujúcich partnerov. Proteíny podľa vynálezu možno okrem toho použiť na identifikáciu a izoláciu umelých alebo syntetických ligandov. Na tento účel rekombinantne pripravený alebo vyčistený prírodný proteín



možno derivatizovať takým spôsobom, aby mal modifikácie, ktoré umožňujú pripojenie na nosič. Proteíny viazané takýmto spôsobom možno inkubovať s rôznymi analytmi, ako sú napríklad proteínové extrakty alebo peptidové knižnice alebo iné zdroje ligandov. Takýmto spôsobom možno izolovať a charakterizovať špecificky viazané peptidy, proteíny alebo nízkomolekulové, neproteínové látky. Neproteínové látky znamenajú napríklad nízkomolekulové chemické látky, ktoré môžu pochádzať napríklad z klasickej syntézy liečiv alebo z takzvaných knižnic látok ktoré boli syntetizované kombinatoricky.

Použité proteínové extrakty sa získavajú napríklad z homogenátov rastlín alebo častí rastlín, mikroorganizmov, ľudských alebo zvieracích tkanív alebo orgánov.

Ligandy alebo interagujúcich partnerov možno tiež identifikovať metódami ako kvasnicový dvojhybridný systém (Fields, S. a Song, O. (1989) Nature, 340, 245). Expresné banky, ktoré možno použiť v tomto prípade, možno získať z ľudských tkanív, ako je napríklad mozog, srdce, oblička atď.

Sekvencie nukleových kyselín podľa vynálezu a proteíny nimi kódované možno použiť na vývoj činidiel, agonistov a antagonistov alebo inhibítorov pre diagnostiku a terapiu chronických a akútnych chorôb spojených s expresiou alebo aktiváciou jednej z proteínových sekvencií podľa vynálezu, napríklad s jej zvýšenou alebo zníženou expresiou. Vyvinuté činidlá, agonistov alebo inhibítory možno potom použiť na produkciu farmaceutických prípravkov na liečbu alebo diagnostiku chorôb. Príkladmi možných chorôb v tomto spojení sú choroby mozgu, periférneho nervového systému, kardiovaskulárneho systému alebo oka, septický šok, reumatoidná artritída, diabetes, akútne zlyhanie obličiek alebo rakovina.

Relevantnosť proteínov podľa vynálezu pre uvedené indikácie bola overená pomocou špecifických inhibítorov v relevantných zvieracích modeloch.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález je teraz opísaný podrobnejšie s odkazom na nasledujúce príklady.



Príklad 1: Izolácia cDNA PARP2 a PARP3

Tieto sekvencie cDNA boli prvýkrát zistené pri sekvenčnej analýze klonov cDNA z knižnice cDNA z ľudského mozgu (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, č. HL3002a, Clontech). Myšacie klony PARP3 sa izolovali z „lambda triplex mouse brain cDNA library“ (Clontech, objednávacie číslo ML5004t). Sekvencie týchto klonov sú opísané v sekvencii č. 1, 3, 7 a 9.

Príklad 2: Expresia PARP2 a PARP3 v ľudských tkanivách

Expresia ľudskej PARP2 a ľudskej PARP3 sa skúmala v dvanástich rôznych ľudských tkanivách pomocou analýzy Northern blot. Produkt Human Multiple Tissue Northern Blot (MTNTM) dodávaný firmou Clontech (č. 7760-1 a č. 7780-1) sa hybridizoval na tento účel so sondou RNA. Sonda sa vyprodukovala in vitro transkripciou zodpovedajúcej cDNA ľudskej PARP2 a ľudskej PARP3 za prítomnosti digoxigenínom označených nukleotidov v súlade s metódou podľa výrobcu (BOEHRINGER MANNHEIM DIG Easy Hyb, objednávacie číslo 1603 558, metóda DIG Easy Hyb na hybridizáciu RNA:RNA). Protokol sa modifikoval, aby sa uskutočnila predhybridizácia: 2 x 1 h s prídavkom DNA zo spermy sled'ov (10 mg/ml hybridizačného roztoku). Hybridizácia potom prebehla cez noc s prídavkom DNA zo spermy sled'ov (10 mg/ml hybridizačného roztoku). Detekcia pásov sa uskutočnila pomocou protokolu CDP-Star (BOEHRINGER MANNHEIM CDP-Star™, objednávacie číslo 1685 627).

Po stringentnom premytí sa transkript PARP2 zistil hlavne v ľudskom mozgu, srdci, kostrovom svalstve, obličke a pečeni. Veľkosť transkriptu asi 1,9 kb zodpovedá určenej dĺžke cDNA (1,85 kb) (pozrite obrázok 2(A)).

Expresia ľudskej PARP2 v iných tkanivách alebo orgánoch je výrazne slabšia.

Po stringentnom premytí sa transkript PARP3 zistil hlavne v srdci, mozgu, obličke, kostrovom svalstve a pečeni. Expresia v iných tkanivách (placenta, pľúca, pankreas) je výrazne slabšia (pozrite obrázok 2(B)). Existujú aspoň 2 transkripty ľudskej PARP3, čo možno pravdepodobne vysvetliť rôznymi polyadenylačnými miestami alebo alternatívnym štiepením. Ich veľkosť (asi 2,2 kb a 2,5 kb) zodpovedá určenej dĺžke cDNA (2,3kb). Premytie sa uskutočnilo s 0,2 x SSC/0,2 %



SDS pri teplote miestnosti počas 2 x 15 minút a potom s 0,1 x SSC/0,1 % SDS pri 65 °C počas 2 x 15 minút (pripravené z 20X SSC: 3M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0).

Príklad 3: Produkcia protilátok

Vyprodukovali sa špecifické protilátky proti proteínom podľa vynálezu. Tieto sa medzi iným použili na analyzovanie tkanivovej distribúcie na úrovni proteínov PARP2 a PARP3 pomocou analýzy immunoblot (Western blot). Príklady produkcie takých protilátok sú uvedené nižšie.

Nasledujúce peptidy sa pripravili syntézou spôsobom známym odborníkom na produkciu protilátok. V niektorých prípadoch bol na N alebo C konce pripojený cysteínový zvyšok, aby sa uľahčilo pripájanie na KLH (keyhole limpet hemocyanin).

PARP-2: NH₂-MAARRRSTGGGRARALNES-CO₂H (aminokyseliny 1 – 20;

sekvencia č. 23)

NH₂-KTELQSPEHPLDQHYRNLHC-CO₂H (aminokyseliny 335 – 353; sek-

vencia č. 24)

PARP-3: NH₂-CKGRQAGREEDPFRSTAEAIK-CO₂H (aminokyseliny 25 – 44;

sekvencia č. 25)

NH₂-CKQIARGFEALEALEEALK-CO₂H (aminokyseliny 230 – 248; sek-

vencia č. 26)

Produkcia anti-PARP3 protilátky je opísaná ako reprezentatívny príklad.

Pre ľudskú PARP3 sa polyklonálne protilátky vygenerovali v králikoch pomocou syntetického peptidu s peptidovou sekvenciou H₂N-KQIARGFEALEALEEALK-CO₂H (sekvencia č. 27) (aminokyseliny 230 – 248 sekvencie proteínov ľudskej PARP3). Zodpovedajúca myšacia sekvencia sa líši v tomto regióne iba jednou aminokyselinou (H₂N-KQIARGFEAZEALEEAMK-CO₂H; sekvencia č. 28). Na N koniec sa pripojil cysteín, aby sa umožnilo naviazanie proteínu na KLH.

Králiky sa imunizovali konjugátom KLH-peptid celkovo päťkrát v intervaloch 7 – 14 dní. Získané antisérum sa afinitne vyčistilo pomocou antigénu. Frakcia



špecifického IgG sa izolovala zo séra pomocou príslušných peptidov, ktoré sa na tento účel najprv imobilizovali na afinitnej kolóne spôsobom známym odborníkom. Príslušné antisérum sa zaviedlo na túto afinitnú kolónu a nešpecificky sorbované proteíny sa eluovali tlmivým roztokom. Špecificky viazaná frakcia IgG sa elovala 0,2 M tlmivým roztokom na báze glycínu s HCl s pH 2,2. pH sa okamžite zvýšilo pomocou 1 M tlmivého roztoku TRIS/HCl s pH 7,5. Eluát obsahujúci frakciu IgG sa zmiešal 1:1 (objemovo) s nasýteným roztokom síranu amónneho a inkuboval sa pri +4 °C počas 30 min, aby sa dokončilo vyzrážanie. Získaná zrazenina sa centrifugovala pri 10 000 g a po odstránení supernatantu sa rozpustila v minimálnom množstve PBS/TBS. Získaný roztok sa potom dialyzoval oproti PBS/TBS v pomere 1:100 (objem). Protilátky sa upravili na koncentráciu asi 100 g IgG/ml. Protilátky PARP3 vyčistené týmto spôsobom mali vysokú špecifickosť na PARP3. Zatiaľ čo myšacia PARP3 bola rozpoznávaná dobre, nebola žiadna pozorovateľná krížová reakcia s PARP1 alebo PARP2.

Príklad 4: Analýza tkanivovej distribúcie pomocou testu immunoblot (Western blot)

Tkanivová distribúcia na úrovni proteínu sa skúmala aj pre PARP2 a PARP3 analýzou immunoblot (Western blot).

Príprava myšacích tkanív na proteínové gély:

Tkanivá alebo bunky sa homogenizovali pomocou prístrojov Potter alebo Ultra-Turrax. S týmto cieľom sa 0,5 g tkaniva (alebo buniek) inkubovalo v 5 ml tlmivého roztoku (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl₂) s jednou tabletou koktailu inhibítora proteázy (Boehringer Mannheim, objednávacie číslo 1836153) a benzonázou (stupeň čistoty I, MERCK) pri 37 °C počas 30 min. Tkanivové vzorky z myši sa pripravili zo srdca, pľúc, pečene, sleziny, obličky, čreva, svalov, mozgu a pre ľudské embryonálne obličkové bunky (HEK293, ľudská embryonálna oblička).

Proteínové gély:

Použil sa systém NuPAGE dodávaný firmou NOVEX podľa pokynov pre proteínové gély. Použili sa polyakrylamidové gély (NuPAGE 4 – 12 % BisTris, NOVEX NP 0321), tlmivý roztok (MES-Running Buffer, NOVEX NP 0002), anti-



oxidant (NOVEX NP 0005), proteínový veľkostný štandard (Multi Mark Multi Colored Standard, NOVEX LC 5725), vzorkový tlmivý roztok (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), NOVEX NP 0007). Gély sa spustili na 45 minút pri napätí 200 V.

Western blot:

Testy Western blot sa uskutočnili s použitím systému NOVEX podľa návodu. Použila sa nitrocelulózoová membrána (Nitrocellulose Pore s veľkosťou 45 μm , NOVEX LC 2001). Transfer trval 1 hodinu pri prúde 200 mA. Transferový tlmivý roztok pozostával z 50 ml koncentrátu transferového tlmivého roztoku (NOVEX NP 0006), 1 ml antioxidantu (NOVEX NP 0002), 100 ml metanolu analytickej čistoty a 849 ml dvakrát destilovanej vody.

Okrem blotov pripravených takýmto spôsobom sa použili aj vopred pripravené bloty, napríklad od firmy Chemicon (blot myšacieho mozgu, Chemicon, katalógové č.: NS 106 s tkanivami 1. frontálny kortex, 2. posteriórny kortex, 3. cerebellum, 4. hipokampus, 5. očná bulva, 6. prúžkované teleso, 7. talamus, 8. stredný mozog, 9. entorinálny kortex, 10. most, 11. medulla, 12. miecha).

Reakcia protilátky s PARP3:

Western blots sa blokovali v TBST (TBS + 0,3 % Tween 20) s 5 % suchým práškovým mliekom počas najmenej 2 hodín (TBS: 100 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl). Reakcia protilátky s primárnou protilátkou (zriedenie 1:1000) prebehla v TBST s 5 % suchým práškovým mliekom (pozrite vyššie) pri teplote miestnosti počas najmenej 2 hodín alebo pri 4 °C cez noc, s jemným miešaním (vertikálny rotátor). Nasledovalo premytie trikrát po 5 minút v TBST. Inkubácia so sekundárnou protilátkou (anti-králičí IgG, viazaný s peroxidázou, SIGMA A-6154, zriedenie 1:2000) prebehla v TBST s 5 % suchým práškovým mliekom počas 1 hodiny. Nasledovalo premytie trikrát po 5 minút, ako je uvedené vyššie. Nasledujúca detekcia bola založená na chemiluminiscencii pomocou súpravy SUPER BLAZE (Pierce, Signal BLAZE Chemiluminescent Substrate 34095) podľa návodu výrobcu. Použil sa „Lumi-Film“ (Chemiluminescent Detection Film, Boehringer, objednávacie číslo: 1666916). Filmy sa vyvíjali asi 2 min (röntgenový



vývojkový koncentrát, ADEFO-Chemie GmbH), hydratovali sa, ustaľovali sa asi 4 min (Acidofix 85 g/1 /AGFA), hydratovali a potom vysušili.

Príklad 5: Príprava enzýmov

Na porovnanie sa exprimovala ľudská PARP1 rekombinantne v baculo-vírusovom systéme spôsobom známym odborníkom a čiastočne sa vyčistila podľa popisu (Shah et al., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13). Hovädzia PARP1 s čistotou 30 – 50 % ($c = 0,22$ mg/ml, špecifická aktivita 170 nmol ADP-ribózy/min/mg celkového proteínu pri 25 °C) sa kúpila od firmy BIOMOL (objednávacie číslo SE-165). Ľudská a myšacia PARP2 a PARP3 sa exprimovali rekombinantne v baculovírusovom systéme (systém Bac-to-Bac, BRL LifeScience). Na tento účel sa príslušné cDNA klonovali do vektora pFASTBAC-1. Po príprave rekombinantnej baculovírusovej DNA rekombináciou v *E. coli* nasledovala transfekcia buniek hmyzu (Sf9 alebo High-Five) príslušnými rekombinantnými baculovírusovými DNA. Expresia príslušných proteínov bola overená analýzou western blot. Vírusové kmene boli amplifikované spôsobom známym odborníkom. Väčšie množstvá rekombinantných proteínov sa získali infekciou 500 ml kultúry hmyzích buniek (2×10^6 buniek/ml) vírusmi v MOI (multiplicity of infection; pomer vírusov k bunkám) 5 – 10 a inkubovali sa 3 až 4 dni. Hmyzie bunky sa potom centrifugovali do peliet a proteíny sa vyčistili z týchto peliet.

Čistenie sa uskutočnilo klasickými metódami čistenia proteínov známymi odborníkom, pričom enzýmy sa zisťovali vhodnými špecifickými protilátkami. V niektorých prípadoch sa proteíny aj afinitne vyčistili na 3-aminobenzamidovej afinitnej kolóne podľa popisu (Burtscher et al., Anal Biochem 1986, 152:285-290). Čistota bola > 90 %.

Príklad 6: Testovacie systémy na určenie aktivity PARP2 a PARP3 a inhibičného pôsobenia efektorov na PARP1, PARP2 a PARP3

a) Produkcia protilátok proti poly(ADP-ribóze)

Poly(ADP-ribózu) možno použiť ako antigén na generovanie anti-poly(ADP-ribózových) protilátok. Produkcia anti-poly(ADP-ribózových) protilátok je opísaná v literatúre (Kanai Y et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306;

Kawamitsu H et al. (1984) *Biochemistry* 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) *Immunology* 34, 501-508).

Medzi inými sa použili nasledujúce: anti-poly(ADP-ribózové) protilátky (polyklonálne antisérum, králiky), BIOMOL; objednávacie č. SA-276, anti-poly(ADP-ribózové) protilátky (monoklonálne, myšacie; klon 10H; hybridómový supernatant, afinitne vyčistený).

Antiséra monoklonálnych protilátok získané z hybridómového supernatantu sa vyčistili afinitnou chromatografiou proteínu A spôsobom známym odborníkom.

b) ELISA

Materiály:

Farebné činidlo ELISA: TMB mix, SIGMA T-8540

96-jamková mikrotitračná platnička (FALCON Micro-Test III™ Flexible Assay Plate, č. 3912) sa pokryla histónmi (SIGMA, H-7755). Históny sa na tento účel rozpustili v uhličitanovom tlmivom roztoku (0,05 M Na₂HCO₃; pH 9,4) v koncentrácii 50 µg/ml. Jednotlivé jamky mikrotitračnej platničky sa inkubovali každá so 150 µl tohto histónového roztoku pri teplote miestnosti počas najmenej 2 hodín alebo pri 4 °C cez noc. Jamky sa potom zablokovali pridaním 150 µl 1 % roztoku BSA (SIGMA, A-7888) v uhličitanovom tlmivom roztoku pri teplote miestnosti počas 2 hodín. Potom nasledovali tri kroky premývania premývacím tlmivým roztokom (0,05 % Tween 10 v 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline – fosfátom tlmený fyziologický roztok; Gibco, objednávacie č. 10010): 0,21 g/l KH₂PO₄, 9 g/l NaCl, 0,726 g/l Na₂HPO₄ · 7 H₂O, pH 7.4). Kroky premývania sa všetky uskutočnili v premývačke mikrotitračných platničiek (premývačka mikrotitračných platničiek „Columbus“, SLT-Labinstruments, Austria).

Na enzýmovú reakciu bol potrebný enzýmový reakčný roztok a roztok substrátu, v každom prípade ako vopred pripravená zmes. Absolútne množstvo týchto roztokov záviselo od plánovaného počtu testovacích jamiek.

Zloženie enzýmového reakčného roztoku na jednu jamku:

- 4 μ l reakčného tlmivého roztoku PARP (1 M Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT)
- 20 ng PARP1 (ľudskej alebo hovädzej) alebo 8 ng PARP2 (ľudskej alebo myšacej)
- 4 μ l aktivovanej DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)
- H₂O do 40 μ l

Zloženie substrátového roztoku na jednu jamku:

- 5 μ l reakčného tlmivého roztoku PARP (10x)
- 0,8 μ l roztoku NAD (10 mM, SIGMA N-1511)
- 44 μ l H₂O

Inhibítory sa rozpustili v 1x reakčnom tlmivom roztoku PARP. DMSO, ktorý sa príležitostne používal na rozpustenie inhibítorov pri vyšších koncentráciách, nepôsobil problémy až do konečnej koncentrácie 2 %. Na enzýmovú reakciu sa 40 μ l enzýmového reakčného roztoku zaviedlo do každej jamky a inkubovalo sa s 10 μ l roztoku inhibítora počas 10 minút. Potom sa začala enzýmová reakcia pridaním 50 μ l substrátového roztoku do každej jamky. Reakcia sa uskutočňovala pri teplote miestnosti v priebehu 30 minút a potom sa zastavila trojnásobným premytím premývacím tlmivým roztokom.

Použitými primárnymi protilátkami boli špecifické anti-poly(ADP-ribózové) protilátky v zriedení 1:5000. Zriedenie sa uskutočnilo v protilátkovom tlmivom roztoku (1 % BSA v PBS; 0,05 % Tween 20). Inkubačný čas pre primárne protilátky bol jedna hodina pri teplote miestnosti. Po následnom trojnásobnom premytí premývacím tlmivým roztokom sa uskutočnila inkubácia so sekundárnou protilátkou (protimýšací IgG, fragmenty Fab, naviazané na peroxidázu, Boehringer Mannheim, objednávacie č. 1500.686; protikráličí IgG, naviazaný na peroxidázu, SIGMA, objednávacie č. A-6154) v zriedení 1:10,000 v protilátkovom tlmivom roztoku pri teplote miestnosti v priebehu jednej hodiny. Po trojnásobnom premytí premývacím tlmivým roztokom nasledovala farebná reakcia s použitím 100 μ l farebného činidla (TMB mix, SIGMA) na jamku pri teplote miestnosti počas asi 15 min. Farebná reakcia sa zastavila pridaním 100 μ l 2 M H₂SO₄. Nasledovalo okamžité meranie v

čítačke platničiek ELISA (EAR34OAT „Easy Reader“, SLT-Labinstruments, Austria) (450 nm oproti 620 nm). Princíp merania je zobrazený diagramom na obrázku 6.

Rôzne koncentrácie sa použili na skonštruovanie závislosti dávka – účinok, aby sa určila hodnota K_i inhibítora. Hodnoty sa získavali trojmo pre konkrétnu koncentráciu inhibítora. Aritmetické priemery sa určili pomocou programu Microsoft® Excel. Hodnoty IC_{50} sa určovali pomocou programu Microcal® Origin Software (Vers. 5.0) („Sigmoidal Fit“). Konverzia hodnoty IC_{50} takto vypočítanej na hodnoty K_i sa uskutočnila pomocou „kalibračných inhibítorov“. „Kalibračné inhibítory“ sa tiež merali v každej analýze. Hodnoty K_i „kalibračných inhibítorov“ sa určili v rovnakom testovacom systéme analýzou Dixonovho diagramu spôsobom známym odborníkom.

b) Test HTRF (homogenous time-resolved fluorescence – homogénna časovo rozlíšená fluorescencia)

V teste HTRF PARP podľa vynálezu sa históny ako cieľové proteíny pre modifikáciu pomocou PARP označili nepriamo fluoroforom XL665. Anti-poly(ADP-ribózová) protilátka sa priamo označila kryptátom európie (anti-PAR-kryptát). Ak je fluorofor XL665 v jej priamej priestorovej blízkosti, čo je zabezpečené viazaním poly(ADP-ribózy) na histón, je možný prenos energie. Emisia pri 665 nm je takto priamoúmerná množstvu viazanej protilátky, ktoré je zase ekvivalentné množstvu poly(ADP-ribózy). Nameraný signál teda zodpovedá aktivite PARP. Princíp merania je zobrazený diagramom na obrázku 7. Použité materiály sú totožné s tými, ktoré sa použili pri teste ELISA (pozrite vyššie), ak nie je uvedené inak.

Históny sa rozpustili v koncentrácii 3 mg/ml v tlmivom roztoku HEPES (50 mM, pH = 7,5). Biotinylácia sa uskutočnila s použitím sulfo-NHS-LC-biotínu (Pierce, č. 21335T). Použil sa molárny pomer 4 molekuly biotínu na histón. Čas inkubácie bol 90 minút (teplota miestnosti). Biotinylované históny sa potom vyčistili na kolóne G25 SF HR10/10 (Pharmacia, 17-0591-01) v tlmivom roztoku HEPES (50 mM, pH = 7,0), aby sa odstránil nadbytok biotinylačného činidla. Anti-poly(ADP-ribózová) protilátka sa označila kryptátom európie pomocou

dvojfunkčných spájacích činidiel (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); patent USA 5,534,622).

Čistenie sa uskutočnilo na kolóne G25SF HR10/30. Dosiahol sa molárny pomer 3,1 kryptátov na protilátku. Výťažok bol 25 %. Konjugáty sa uložili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ za prítomnosti 0,1 % BSA vo fosfátovom tlmivom roztoku (0,1 M, pH = 7).

Pri enzýmovej reakcii sa do každej jamky napipetovalo nasledujúce:

- 10 μl roztoku PARP v reakčnom tlmivom roztoku PARP HTRF (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) s 20 ng PARP1 (ľudskej alebo hovädzej) alebo 8 ng PARP2 (ľudskej alebo myšacej)
- 10 μl aktivovanej DNA v reakčnom tlmivom roztoku PARP HTRF (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 10 μl biotinylovaných histónov v reakčnom tlmivom roztoku PARP HTRF (1,25 μM)
- 10 μl inhibítora v reakčnom tlmivom roztoku PARP HTRF

Tieto činidlá sa inkubovali 2 minúty, kým sa začala reakcia pridaním

- 10 μl roztoku NAD v reakčnom tlmivom roztoku PARP HTRF (41 $\mu\text{M}/\text{ml}$).

Reakčný čas bol 30 minút pri teplote miestnosti.

Reakcia sa potom zastavila pridaním

- 10 μl inhibítora PARP (25 μM , $K_i = 10\text{ nM}$) v tlmivom roztoku „Revelation“ (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2 M KF, 0,05 % BSA).

Potom sa pridalo nasledujúce:

- 10 μl roztoku EDTA (SIGMA, E-7889, 0,5 M v H_2O)
- 100 μl Sa-XL665 (Packard Instruments) v tlmivom roztoku „Revelation“ (15 – 31,25 nM)
- 50 μl anti-PAR kryptátu v tlmivom roztoku „Revelation“ (1,6 – 3,3 nM).

Meranie bolo potom možné po 30 minútach (až do 4 hodín). Meranie sa uskutočnilo v prístroji „discovery HTRF microplate analyzer“ (Canberra Packard Instruments). Hodnoty K_i sa vypočítali tak, ako je opísané pre ELISA.

Príklad 7: Testovacie systémy na určenie terapeutickkej účinnosti inhibítorov PARP

Terapeutickú účinnosť nových inhibítorov PARP možno skontrolovať v relevantných farmakologických modeloch. Príklady niektorých vhodných modelov sú uvedené v tabuľke 1.

Porucha	Model	Literatúra
Neurodegeneratívne poruchy (mŕtvica, Parkinson atď.)	Excitotoxicita NMDA u myši alebo potkanov	Popis pozrite nižšie
Mŕtvica	Trvalá MCAO („stredná cerebrálna arteriálna oklúzia“)	Tokime, T. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18(9): 991-7, 1998. Guegan, C., Brain Research. Molecular Brain Research, 55(1): 133-40, 1998.
	Prechodná, fokálna MCAO u potkanov alebo myši	Eliasson MJL et al., Nat Med 1997, 3:1089-1095. Endres, M et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1143-1151. Takahashi K et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1137-1142.
Parkinsonova choroba	Toxicita MPTP (1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridínu) u myši alebo potkanov	Cosi C, et al., Brain Res., 1998, 809(1):58-67. Cosi C, et al., Brain Res., 1996, 729(2):264-9.

Infarkt myokardu	Oklúzia koronárnych ciev u potkanov, sviň alebo králikov	Richard V, et al., Br. J. Pharmacol 1994, 113, 869-876. Thiemermann C, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94(2):679-83. Zingarelli B, et al., Cardiovasc Res. 1997, 36(2):205-15.
	Langendorfov model srdca u potkanov alebo králikov	Popis pozrite nižšie
Septický šok	Endotoxínový šok u potkanov	Szabo C, et al., J Clin Invest, 1997, 100(3):723-35.
	Zyosanom alebo karagénanom indukované zlyhanie viacerých orgánov u potkanov alebo myši	Szabo C, et al. J Exp Med. 1997, 186(7):1041-9. Cuzzocrea S, et al. Eur J Pharmacol. 1998, 342(1):67-76.
Reumatoidná artritída	Adjuvans alebo kolagénom indukovaná artritída u potkanov alebo myši	Szabo C, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95(7):3867-72.
Diabetes	Indukovaný streptozotocínom a aloxánom alebo spojený s obezitou	Uchgata Y et al., Diabetes 1983, 32: 316-318. Masiello P et al., Diabetologia 1985, 28: 683-686. Shimabukuro M et al., J Clin Invest 1997, 100: 290-295.
Rakovina	In vitro model; pozrite nižšie	Schlicker et al., 1999, 75(1), 91-100.

a) Model excitotoxicity NMDA

Glutamát je najdôležitejším excitačným neurotransmitrom v mozgu. Za normálnych podmienok sa glutamát vylučuje do synaptickej štrbiny a stimuluje postsynaptické glutamátové receptory, špecificky glutamátové receptory typu NMDA a AMPA. Táto stimulácia hrá významnú úlohu v mnohých funkciách mozgu vrátane učenia, pamäti a motorickej kontroly.

Za podmienok akútnej a chronickej neurodegenerácie (napr. mŕtvica) však existuje veľký nárast presynaptickej sekrécie glutamátu, čo má za následok nadmernú stimuláciu receptorov. To vedie k umieraniu takto stimulovaných buniek. Táto zvýšená aktivita glutamátu sa objavuje pri niekoľkých neurologických chorobách alebo psychických poruchách a vedie k stavom nadmerného vzrušenia alebo toxickým účinkom v centrálnej nervovej sústave (CNS) ale aj v periférnom nervovom systéme. Glutamát je teda zapojený do veľkého počtu neurodegeneratívnych porúch, najmä neurotoxických porúch po hypoxii, anoxii, ischemii a po léziách, napríklad po tých, ku ktorým dochádza po mŕtvici a traume, do mŕtvice, Alzheimerovej choroby, Huntingtonovej choroby, amyotrofickej laterálnej sklerózy (ALS; „Lou Gehringova choroba“), kraniálnej traumy, traumy miechy, periférnych neuropatií, AIDS demencie a Parkinsonovej choroby. Ďalšia choroba, pri ktorej sú dôležité glutamátové receptory, je epilepsia (Brain Res Bull 1998; 46(4):281-309, Eur Neuropsychopharmacol 1998, 8(2):141-52.).

Účinky glutamátu sprostredkujú rôzne receptory. Jeden z týchto receptorov sa nazýva NMDA (N-metyl-D-aspartátový) receptor podľa špecifického agonistu (Arzneim. Forschung 1990, 40, 511-514; TIPS, 1990, 11, 334-338; Drugs of the Future 1989, 14, 1059-1071). N-Metyl-D-aspartát je silný agonista konkrétnej triedy glutamátových receptorov („NMDA“ typu). Stimulácia NMDA receptora vedie k prílevu vápnika do bunky a ku generovaniu voľných radikálov. Voľné radikály vedú k poškodeniu DNA a aktivácii PARP. PARP zase spôsobuje umieranie buniek depléciou vysokoenergetických fosfátov (NAD a ATP) v bunke. To vysvetľuje toxicitu NMDA. Liečba zvierat s NMDA sa môže preto považovať za model vyššie uvedených porúch, v ktorých je zapojená excitotoxicita.

Vzhľadom na dôležitosť glutamátových receptorov v neurodegenerácii mnoho doterajších farmakologických prístupov bolo zameraných na špecifické blokovanie práve týchto receptorov. Avšak vzhľadom na ich význam za podmienok normálnej stimulácie tieto prístupy sa ukázali ako problematické (vedľajšie účinky). Okrem toho stimulácia receptorov je udalosť, ktorá prebieha veľmi rýchlo, takže podávanie receptorov často prichádza prineskoro (problém „časového okna“). Preto existuje veľká potreba nových princípov pôsobenia a inhibítorov neurotoxicity súvisiacej s NMDA.

Ochranu proti cerebrálnej nadmernej excitácii excitačnými aminokyselinami (NMDA antagonizmus u myši) možno považovať za adekvátny dôkaz aktivity farmakologického efektora PARP pri poruchách založených na excitotoxicite. Intracerebrálne podanie excitačných aminokyselín (EAA) indukuje takú masívnu nadmernú excitáciu, že v priebehu krátkeho času vedie ku kŕčom a smrti zvierat (myši).

V tomto prípade išlo o jednostranné intracerebroventrikulárne podanie 10 μ l 0,035 % vodného roztoku NMDA 120 minút po intraperitoneálnom (i.p.) podaní testovanej látky. Tieto symptómy možno inhibovať systémovým, napr. intraperitoneálnym podaním centrálne pôsobiacich liečiv. Keďže nadmerná aktivácia EAA receptorov v centrálnej nervovej sústave hrá významnú úlohu v patogenéze rôznych neurologických porúch, je možné usúdiť na základe zisteného EAA antagonizmu in vivo, že tieto látky môžu mať terapeutické využitie pri takých poruchách CNS. ED₅₀, pri ktorej 50 % zvierat nemá príznaky vďaka predchádzajúcemu i.p. podaniu meranej látky s pevnou dávkou NMDA, bola určená ako miera aktivity látok.

b) Langendorfov model srdca (model pre infarkt myokardu)

Na test sa použili samce potkanov Sprague-Dawley (telesná hmotnosť 300 – 400 g; dodané firmou Janvier, Le Genest-St-Isle, Francúzsko). Potkanom sa podala účinná látka alebo placebo orálne nazogastrickou sondou (objem: 5 ml/kg). O 50 minút neskôr sa intraperitoneálne podal heparín (Liquemin N Roche, 125 IU/zviera v 0,5 ml). Zvieratá sa anestetizovali prípravkom Inactin® T133

(tiobetabarbital sodný 10 %), zafixovali sa na operačný stôl, tracheotomizovali sa a ventilovali sa pomocou „Harvard ventilatory pump“ (40 cyklov/min, 4,5 ml/cykus). Po torakotómii nasledovala okamžitá katetrizácia aorty, vybratie srdca a okamžitá retrográdna perfúzia. Srdcia boli perfúzované s konštantným tlakom 75 mm Hg, ktorý sa dosiahol pomocou čerpadla „Gilson Miniplus 2 perfusion pump“. Zloženie perfuzátu (mmol/l): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ x 2 H₂O 2,52, MgSO₄ x 7 H₂O 1,64, NaHCO₃ 24,88, KH₂PO₄ 1,18, glukóza 11. Teplota sa počas celého experimentu udržiavala na 37 °C. Funkčné parametre sa zaznamenávali kontinuálne pomocou prístroja „Gould 4-channel recorder“. Merali sa hodnoty ľavokomorového tlaku (LVP; mmHg), LVEDP (mmHg), uvoľňovania enzýmov (kreatín kináza, mU/ml/g), koronárny prietok (ml/min), HR (pulz, min⁻¹). Ľavokomorový tlak sa meral pomocou kvapalinou naplneného latexového balóna a tlakového prevodníka Statham23 Db. Objem balóna sa najprv nastavil tak, aby dosiahol LVEDP (left-ventricular enddiastolic pressure – ľavokomorový tlak pri skončení diastoly) s hodnotou približne 12 mmHg. Hodnota dP/dt_{max} (maximálna čerpacia sila) sa odvádza od tlakového signálu pomocou derivačného modulu. Srdcová frekvencia sa vypočítala z tlakového signálu. Prietok sa určil pomocou počítača kvapiek (BMT Messtechnik GmbH Berlin). Po ekvilibračnom čase 20 minút sa srdcia podrobili 30-minútovej globálnej ischémii zastavením dodávky perfuzátu, pričom teplota sa udržiavala na 37 °C. Počas nasledujúceho 60-minútového reperfúzneho obdobia sa odobrali vzorky perfuzátu v čase 3, 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min na analýzu aktivity kreatín kinázy (CK). Stredné hodnoty a štandardné odchýlky pre merané parametre sa analyzovali štatisticky (Dunnettov test). Limit signifikantnosti bol p = 0,05.

Experiment na králikoch sa uskutočnil podobne. Použili sa samce bielych novozélandských králikov (získané od firmy Interfauna). Srdcia sa pripravili podľa vyššie uvedeného popisu pre potkaní model. Perfúzny tlak bol nastavený na maximum 60 mmHg a na prietok asi 25 ml/min. Čas ekvilibrácie bol asi 30 min. Látka sa podala infúziou priamo proti prúdu do srdca. 15 min po začiatku infúzie sa spôsobila globálna ischémia zastavením prietoku, pričom sa udržiavala teplota srdca. Nasledovala 30-minútová reperfúzia. Perfuzát bol odobraný na skúmanie aktivity CK pred podaním látky po 15 min a v rôznych časoch (5, 10, 15, 20, 30 min) počas reperfúzie. Merali sa nasledujúce parametre: LVP (mmHg), LVEDP,

LVdP/dt, PP (mmHg), HR (pulzová frekvencia; údery/min), aktivita CK (U/min/g hmotnosti srdca).

c) **Zvierací model pre akútne zlyhanie obličiek**

Skúmal sa ochranný účinok intravenózneho podania inhibítorov PARP (4 dni) na funkciu obličiek potkanov s postischemickým akútnym zlyhaním obličiek.

Použili sa samce potkanov Sprague-Dawley (asi 330 g na začiatku experimentov; chovateľ: Charles River). Na jednu experimentálnu skupinu sa použilo 10 – 15 zvierat. Podanie účinnej látky alebo placebo sa uskutočňovalo kontinuálne osmotickou mikropumpou do femorálnej žily. Odberala sa orbitálna krv (1,5 ml celej krvi) pod inhalačnou anestéziou enfluranom (Ethrane Abbot, Wiesbaden).

Po počiatkových meraniach (krvné vzorky) a určení množstva moču vylúčeného za 24 hodín sa potkany anestetizovali („Nembutal“, pentobarbital sodný, Sanofi CEVA; 50 mg/kg i.p., injektovaný objem 1,0 ml/kg) a fixovali sa na vyhrievaný operačný stôl (37 °C). Do kaudálnej žily sa podalo 125 IU/kg heparínu (Liquemin N, Roche) i.v. Brušná dutina sa otvorila a obnažila sa pravá oblička. Rozvetvujúca sa renálna artéria sa obnažila a superiórne odsvorkovala pomocou buldočích svoriek (Diefenbach 38 mm). Ľavá renálna artéria sa podobne obnažila a odsvorkovala (superiórne, asi na polceste k obličke). Počas operácie sa do femorálnej žily implantovala osmotická mikropumpa. Vnútornosť sa vložila späť a strata tekutín sa kompenzovala vlažným 0,9 % roztokom NaCl. Zvieratá sa prikryli vlhkou textíliou a udržiavali sa v teple pod červeným svetlom. Po 40 minútach sa zaznamenal vzhľad obličiek a svorky sa odstránili, najprv pravá a potom ľavá. Vnútornosť sa vložila späť a pridali sa 2 kvapky antibiotika (Tardomyocel, Bayer). Brušná stena sa uzavrela sterilným mačacím črevom (Ethicon č. 4) a ešte raz sa ošetrila 1 kvapkou antibiotika. Epiderma sa zošila sterilnou niťou Ethibond Exel (Ethicon) č. 3/0 a šev sa nastriekal sprejom na rany Nebacetin N (Yamanouchi). Desatina dennej dávky liečiva alebo placebo sa podala ako i.v. bolus.

Odobrali sa vzorky a krv na vyšetrenie biochemických parametrov v sére a moči: Na, K, kreatinín, proteín (len v moči), v dňoch 1, 2 a 4 experimentu. Okrem

toho sa zaznamenala spotreba potravy a vody, telesná hmotnosť a objem moču. Po 14 dňoch boli zvieratá usmrtené a obličky sa vyhodnotili.

Z hodnotenia sa vylúčili všetky zvieratá, ktoré zomreli na infarkt počas experimentu alebo vykazovali známky infarktu pri pitve v deň 14. Klírens kreatinínu a frakčné vylučovanie sodíka sa vypočítali ako parametre funkcie obličiek, pričom sa porovnali liečené zvieratá s kontrolou a placebom.

d) In vitro model pre rádiosenzibilizáciu (terapia nádorov)

Bunky MCF-7 (ľudský karcinóm prsníka) sa kultivovali v Dulbeccovom modifikovanom Eagleovom médiu s 10 % tepelne inaktivovaným FCS a 2 mM L-glutamínu. Bunky sa nasadili v bunkových hustotách 100, 1000 alebo 10,000 buniek na jamku do 6-jamkovej platničky a potom sa vystavili pôsobeniu ionizujúceho žiarenia s dávkou v rozmedzí od 0 do 10 Gy (^{137}Cs , Shepard Mark, model I-68A, dávkový príkon 3,28 Gy/min). 10 dní po ožiarení sa experiment vyhodnotil počítajúc kolónie s päťdesiatimi bunkami ako pozitívne.

e) Model mŕtvice (fokálna cerebrálna ischemia; oklúzia MCA (middle cerebral artery – strednej cerebrálnej artérie) u potkana

Fokálna ischemia sa uskutočnila pomocou kauterizácie pravej distálnej MCA na potkanoch Sprague-Dawley alebo Long-Evans. Potkany možno ošetriť pred začiatkom oklúzie MCA alebo po nej modulátormi proteínov podľa vynálezu. Spravidla sa volia dávky 1 – 10 mg/kg (bolusová aplikácia) voliteľne nasledované kontinuálnou infúziou 0,5 – 5 mg/kg/h.

Potkany sa anestetizujú zmesou halotánu v zmesi 70 % dusíka a 30 % kyslíka (4 % v počiatočnej fáze a 0,8 – 1,2 % počas operácie). Telesná teplota sa sústavne merala rektálne a udržiavala sa na konštantnej hodnote $37,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocou nastaviteľnej vyhrievacej prikrývky. Navyše sa meral arteriálny krvný tlak, arteriálne pH, $\text{Pa}(\text{O}_2)$ a $\text{Pa}(\text{CO}_2)$ pomocou katétra v chvostovej žile. Potom sa uskutočnila fokálna ischemia použitím metódy podľa Chen et al. (Stroke 17: 738-743; 1986) alebo Liu et al. (Am. J. Physiol. 256: H589-593; 1989) pomocou kontinuálnej kauterizácie distálnej časti pravej MCA. Keď sa operácia skončila,

zvieratá sa udržiavali v teplom prostredí ďalších 24 hodín. Potom sa zabili použitím CO₂ a dekapitovali. Ich mozgy sa vybrali, šokovo zmrazili (suchý ľad alebo kvapalný dusík) a uložili sa pri -80 °C. Mozgy sa narezali na 0,02 mm hrubé rezy a každý 20. rez sa použil na následnú analýzu. Príslušné rezy sa zafarbili krezylovou fialovou (Nisslove farbenie). Alternatívne možno na vyfarbovanie použiť TTC (2,3,4-trifenyltetrazoliumchlorid). Infarktový objem možno potom analyzovať pod mikroskopom. Na presnú kvantifikáciu možno použiť počítačový softvér na analýzu obrazov (J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10: 290-293; 1990).

f) Septický šok

Skupiny 10 samcov myší C57/BL (telesná hmotnosť 18 – 20 g) sa ošetrili LPS (lipopolysacharid, z E. coli, LD₁₀₀ 20 mg/zviera i. v.) plus galaktóзамínom (20 mg/zviera i. v.). Látka, ktorá sa má testovať, sa aplikuje i. p. alebo i. v. počas troch po sebe nasledujúcich dní (napr. 1 – 10 mg/kg), pričom prvá dávka sa podá 30 minút po ošetrení LPS. Úmrtnosť sa určuje každých 12 hodín. Alternatívne možno látku aplikovať v niekoľkých dávkach rozložených na niekoľko dní.

g) Určenie zmenenej expresie génov v starnúcich bunkách

Starnutie buniek sa simuluje zmenou bunkového kultivačného média z kompletného média na médium so zníženou koncentráciou séra a potom sa bunky analyzujú pomocou kvantitatívnej PCR alebo technikou Northern Blotting (Linskens et al., Nucleic Acids Res. 1995, 23(16): 3244-51). Ako typické markery starnutia kože možno použiť napríklad kolagén alebo elastín. Používajú sa ľudské fibroblasty alebo fibroblastové bunkové línie, ktoré simulujú starnutie kože. Modulátory proteínov podľa vynálezu sa pridávajú do média a pozoruje sa ich účinok na zmenu expresie génov. Možno pozorovať zvýšenú produkciu elastínu v bunkách so zníženým procesom starnutia spôsobeným pomocou uvedených modulátorov.

Sekvenčný protokol

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Nové poly(ADP-ribózo)-polymerázové gény

<130> M/39113-PCT

<140> PCT/EP 99/03889

<141> 1999-06-04

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1843

<212> DNA

<213> Mozog

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1715)

<223> Produkt = Poly ADP-ribózo polymeráza

<400> 1

cc atg gcg gcg cgg cgg cga cgg agc acc ggc ggc ggc agg gcg aga	47
Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg	
1 5 10 15	

gca tta aat gaa agc aaa aga gtt aat aat ggc aac acg gct cca gaa	95
Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu	
20 25 30	

gac tct tcc cct gcc aag aaa act cgt aga tgc cag aga cag gag tcg	143
Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	
35 40 45	

aaa aag atg cct gtg gct gga gga aaa gct aat aag gac agg aca gaa	191
Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	
50 55 60	

gac aag caa gat gaa tct gtg aag gcc ttg ctg tta aag ggc aaa gct	239
---	-----

Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala 65 70 75	
cct gtg gac cca gag tgt aca gcc aag gtg ggg aag gct cat gtg tat Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr 80 85 90 95	287
tgt gaa gga aat gat gtc tat gat gtc atg cta aat cag acc aat ctc Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu 100 105 110	335
cag ttc aac aac aac aag tac tat ctg att cag cta tta gaa gat gat Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp 115 120 125	383
gcc cag agg aac ttc agt gtt tgg atg aga tgg ggc cga gtt ggg aaa Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys 130 135 140	431
atg gga cag cac agc ctg gtg gct tgt tca ggc aat ctc aac aag gcc Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala 145 150 155	479
aag gaa atc ttt cag aag aaa ttc ctt gac aaa acg aaa aac aat tgg Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp 160 165 170 175	527
gaa gat cga gaa aag ttt gag aag gtg cct gga aaa tat gat atg cta Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu 180 185 190	575
cag atg gac tat gcc acc aat act cag gat gaa gag gaa aca aag aaa Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys 195 200 205	623
gag gaa tct ctt aaa tct ccc ttg aag cca gag tca cag cta gat ctt Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu 210 215 220	671
cgg gta cag gag tta ata aag ttg atc tgt aat gtt cag gcc atg gaa Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu 225 230 235	719
gaa atg atg atg gaa atg aag tat aat acc aag aaa gcc cca ctt ggg Glu Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly 240 245 250 255	767
aag ctg aca gtg gca caa atc aag gca ggt tac cag tct ctt aag aag Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys	815

260	265	270	
att gag gat tgt att cgg gct ggc cag cat gga cga gct ctc atg gaa			863
Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu			
275	280	285	
gca tgc aat gaa ttc tac acc agg att ccg cat gac ttt gga ctc cgt			911
Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg			
290	295	300	
act cct cca cta atc cgg aca cag aag gaa ctg tca gaa aaa ata caa			959
Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln			
305	310	315	
tta cta gag gct ttg gga gac att gaa att gct att aag ctg gtg aaa			1007
Leu Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys			
320	325	330	335
aca gag cta caa agc cca gaa cac cca ttg gac caa cac tat aga aac			1055
Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn			
340	345	350	
cta cat tgt gcc ttg cgc ccc ctt gac cat gaa agt tac gag ttc aaa			1103
Leu His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys			
355	360	365	
gtg att tcc cag tac cta caa tct acc cat gct ccc aca cac agc gac			1151
Val Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp			
370	375	380	
tat acc atg acc ttg ctg gat ttg ttt gaa gtg gag aag gat ggt gag			1199
Tyr Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu			
385	390	395	
aaa gaa gcc ttc aga gag gac ctt cat aac agg atg ctt cta tgg cat			1247
Lys Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His			
400	405	410	415
ggt tcc agg atg agt aac tgg gtg gga atc ttg agc cat ggg ctt cga			1295
Gly Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg			
420	425	430	
att gcc cca cct gaa gct ccc atc aca ggt tac atg ttt ggg aaa gga			1343
Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly			
435	440	445	
atc tac ttt gct gac atg tct tcc aag agt gcc aat tac tgc ttt gcc			1391
Ile Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala			
450	455	460	

tct cgc cta aag aat aca gga ctg ctg ctc tta tca gag gta gct cta 1439
 Ser Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu
 465 470 475

ggc cag tgt aat gaa cta cta gag gcc aat cct aag gcc gaa gga ttg 1487
 Gly Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu
 480 485 490 495

ctt caa ggt aaa cat agc acc aag ggg ctg ggc aag atg gct ccc agt 1535
 Leu Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser
 500 505 510

tct gcc cac ttc gtc acc ctg aat ggg agt aca gtg cca tta gga cca 1583
 Ser Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro
 515 520 525

gca agt gac aca gga att ctg aat cca gat ggt tat acc ctc aac tac 1631
 Ala Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr
 530 535 540

aat gaa tat att gta tat aac ccc aac cag gtc cgt atg cgg tac ctt 1679
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu
 545 550 555

tta aag gtt cag ttt aat ttc ctt cag ctg tgg tga atgtgatat 1725
 Leu Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp
 560 565 570

taaataaacc agagatctga tcttcaagca agaaaataag cagtgttgta cttgtgaatt 1785
 ttgtgatatt ttatgtaata aaaactgtac aggtctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1843

<210> 2

<211> 570

<212> PRT

<213> Mozog

<400> 2

Met Ala Ala Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu Asp
 20 25 30

Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser Lys
 35 40 45

Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu Asp
 50 55 60

Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala Pro
 65 70 75 80

Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr Cys
 85 90 95

Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu Gln
 100 105 110

Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp Ala
 115 120 125

Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys Met
 130 135 140

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

Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp Glu
 165 170 175

Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu Gln
 180 185 190

Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys Glu
 195 200 205

Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu Arg
 210 215 220

Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu Glu
 225 230 235 240

Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys Ile
 260 265 270

Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu Ala
 275 280 285

Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg Thr
 290 295 300

Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln Leu

305 310 315 320
 Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys Thr
 325 330 335
 Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn Leu
 340 345 350
 His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys Val
 355 360 365
 Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp Tyr
 370 375 380
 Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu Lys
 385 390 395 400
 Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His Gly
 405 410 415
 Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg Ile
 420 425 430
 Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Ile
 435 440 445
 Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala Ser
 450 455 460
 Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly
 465 470 475 480
 Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Leu
 485 490 495
 Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser Ser
 500 505 510
 Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro Ala
 515 520 525
 Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr Asn
 530 535 540
 Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu Leu
 545 550 555 560
 Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp
 565 570

<210> 3

<211> 2265

<212> DNA

<213> Maternica

<220>

<221> CDS

<222> (242)..(1843)

<223> Produkt - Poly ADP-ribózo polymeráza

<400> 3

tgggactggt cgctgactc ggctgcccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa	60
tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccgcc tctgggattg ttggaattc	120
tctccctaat tcacgcctga ggctcatgga gagttgctag acctgggact gccctgggag	180
gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc tttcttggc	240
 c atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct gag aag	289
Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys	
1 5 10 15	
 aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc tcc acc	337
Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr	
20 25 30	
 gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc cgc gtg	385
Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val	
35 40 45	
 gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg tat gag	433
Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu	
50 55 60	
 gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac aac aac	481
Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn	
65 70 75 80	
 aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gag agc aac cgc ttc ttc acc	529
Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr	
85 90 95	
 tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca aag atc	577

Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile	
100 105 110	
aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag aag aaa	625
Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys	
115 120 125	
ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac ttt gtg	673
Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val	
130 135 140	
tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag gat gag	721
Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu	
145 150 155 160	
gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg act gtg	769
Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val	
165 170 175	
act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag aag ctc	817
Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu	
180 185 190	
atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg gcc ctc	865
Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu	
195 200 205	
atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc aag caa	913
Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln	
210 215 220	
cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag gcc ctg	961
Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu	
225 230 235 240	
aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc tca cac	1009
Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His	
245 250 255	
ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc ccg ccc	1057
Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro	
260 265 270	
atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg	1105
Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val	
275 280 285	
ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct gag cag	1153
Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln	

290	295	300	
gag aag acg gtg gag gag gtg cca cac ccc ctg gac cga gac tac cag			1201
Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln			
305	310	315	320
ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct gag tac			1249
Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr			
	325	330	335
aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac agg tgc			1297
Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys			
	340	345	350
cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag gaa gac			1345
Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp			
	355	360	365
aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg tgg cat			1393
Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His			
	370	375	380
ggc acc aac atg gcc gtg gtg gcc gcc atc ctc act agt ggg ctc cgc			1441
Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg			
385	390	395	400
atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac ttt gcc			1489
Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala			
	405	410	415
tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag tgt ggg			1537
Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly			
	420	425	430
gcc cac cat gtc ggc tac atg ttc ctg ggt gag gtg gcc ctg ggc aga			1585
Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg			
	435	440	445
gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca cct cct			1633
Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro			
	450	455	460
ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat ccg acc			1681
Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr			
465	470	475	480
cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtg gtg gtg ccc cag			1729
Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln			
	485	490	495

ggc cag cct gtg ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc tcc cag 1777
 Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
 500 505 510

agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg 1825
 Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525

ctg gag gtc cac ctc tga gtgcccggcc tgtccccggg ggtcctgcaa 1873
 Leu Glu Val His Leu
 530

ggctggactg tgatctcaa tcactctgcc catctctggt acccctatat cactcctttt 1933

tttcaagaat acaatacgtt gttgtaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993

cttatgcctc ctaactgaaa tttgtattc ttgacacat ctgccagtc cctctcctcc 2053

cagcccatgg taaccagcat ttgactcttt actgtataa gggcagcttt tataggttcc 2113

acatgtaagt gagatcatgc agtgttgtc tttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173

aatgtgcacc gggttcacc atgtttcat aaatgacaag atttctcct ttaaaaaaaaa 2233

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2265

<210> 4

<211> 533

<212> PRT

<213> Maternica

<400> 4

Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr
 20 25 30

Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val
 35 40 45

Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu
 50 55 60

Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn
 65 70 75 80

Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr
 85 90 95

Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile
 100 105 110

Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys
 115 120 125

Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val
 130 135 140

Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu
 145 150 155 160

Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val
 165 170 175

Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu
 180 185 190

Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu
 195 200 205

Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln
 210 215 220

Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu
 225 230 235 240

Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His
 245 250 255

Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro
 260 265 270

Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val
 275 280 285

Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln
 290 295 300

Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320

Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr
 325 330 335

Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys

340 345 350

Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp
355 360 365

Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His
370 375 380

Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
385 390 395 400

Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
405 410 415

Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly
420 425 430

Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg
435 440 445

Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr
465 470 475 480

Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln
485 490 495

Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
500 505 510

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
515 520 525

Leu Glu Val His Leu
530

<210> 5

<211> 2265

<212> DNA

<213> Maternica

<220>

<221> CDS

<222> (221)..(1843)

<223> Produkt - Poly ADP-ribózo polymeráza

<400> 5

tgggactggt cgctgactc ggctgcccc agcctctgct tcaccccaact ggtggcctaaa 60

tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc 120

tctccctaatac tcacgcctga ggctcatgga gagttgctag acctgggact gcctggggag 180

gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atg tcc ctg ctt ttc 235

Met Ser Leu Leu Phe

1 5

ttg gcc atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct 283

Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro

10 15 20

gag aag aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc 331

Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg

25 30 35

tcc acc gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc 379

Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile

40 45 50

cgc gtg gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg 427

Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val

55 60 65

tat gag gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac 475

Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn

70 75 80 85

aac aac aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gac agc aac cgc ttc 523

Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe

90 95 100

ttc acc tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca 571

Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser

105 110 115

aag atc aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag 619

Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu

120	125	130	
aag aaa ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac			667
Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His			
135	140	145	
ttt gtg tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag			715
Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu			
150	155	160	165
gat gag gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg			763
Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg			
170	175	180	
act gtg act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag			811
Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln			
185	190	195	
aag ctc atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg			859
Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met			
200	205	210	
gcc ctc atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc			907
Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser			
215	220	225	
aag caa cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag			955
Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu			
230	235	240	245
gcc ctg aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc			1003
Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser			
250	255	260	
tca cac ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc			1051
Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro			
265	270	275	
ccg ccc atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg			1099
Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu			
280	285	290	
ctg gtg ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct			1147
Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser			
295	300	305	
gag cag gag aag acg gtg gag gag gtg cca cac ccc ctg gac cga gac			1195
Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp			
310	315	320	325

tac cag ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro 330 335 340	1243
gag tac aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His 345 350 355	1291
agg tgc cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu 360 365 370	1339
gaa gac aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu 375 380 385	1387
tgg cat ggc acc aac atg gcc gtg gtg gcc gcc atc ctc act agt ggg Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly 390 395 400 405	1435
ctc cgc atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr 410 415 420	1483
ttt gcc tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys 425 430 435	1531
tgt ggg gcc cac cat gtc ggc tac atg ttc ctg ggt gag gtg gcc ctg Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu 440 445 450	1579
ggc aga gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro 455 460 465	1627
cct cct ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp 470 475 480 485	1675
ccg acc cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtg gtg gtg Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val 490 495 500	1723
ccc cag ggc cag cct gtg ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe 505 510 515	1771

tcc cag agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc 1819
 Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg
 520 525 530

tac ctg ctg gag gtc cac ctc tga gtgcccgcc tgtccccgg ggtcctgcaa 1873
 Tyr Leu Leu Glu Val His Leu
 535 540

ggctggactg tgatctcaa tcacctgcc catctctggt acccctatat cactcctttt 1933

ttcaagaat acaatacgtt gttgtaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993

cttatgcctc ctaactgaaa tttgtattc ttgacacat ctgccagtc cctctctcc 2053

cagcccatgg taaccagcat ttgactctt acttgataa gggcagcttt tataggttcc 2113

acatgtaagt gagatcatgc agtgtttgic ttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173

aatgtgcacc gggttcacc atgtttcat aaatgacaag atttctcct taaaaaaaaa 2233

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2265

<210> 6

<211> 540

<212> PRT

<213> Maternica

<400> 6

Met Ser Leu Leu Phe Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val
 1 5 10 15

Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu
 20 25 30

Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala
 35 40 45

Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn
 50 55 60

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

Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln
 85 90 95

Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly
 100 105 110

Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala
 115 120 125

Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp
 130 135 140

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

Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp
 165 170 175

Arg Gly Pro Val Arg Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu
 180 185 190

Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met
 195 200 205

Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro
 210 215 220

Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu
 225 230 235 240

Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser
 245 250 255

Leu Glu Glu Leu Ser Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe
 260 265 270

Gly His Ser Gln Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala
 275 280 285

Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala
 290 295 300

Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His
 305 310 315 320

Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu
 325 330 335

Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln
 340 345 350

Thr Gly Ser Asn His Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val
 355 360 365

Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly
 370 375 380

Asn Arg Lys Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala
 385 390 395 400

Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val
 405 410 415

Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr
 420 425 430

Val Ile Gly Met Lys Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu
 435 440 445

Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro
 450 455 460

Ser Leu Lys Ser Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly
 465 470 475 480

His Thr Glu Pro Asp Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly
 485 490 495

Gln Gln Val Val Val Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe
 500 505 510

Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser
 515 520 525

Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Val His Leu
 530 535 540

<210> 7

<211> 1740

<212> DNA

<213> Myši sval

<220>

<221> CDS

<222> (112)..(1710)

<400> 7

cccggtttc acttttctg ctgcctcggg gaacacctg agccaactgc ttctaactc
 agggtgggca gaactgacgg gatctaagct tctgcatctc tgaggagaac c atg gct

60
 117

Met Ala

1

cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag cag cga Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys Gln Arg	165
5 10 15	
caa ggg aca gag gag gag gac agc ttc cgg tcc act gcc gag gct ctc Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu	213
20 25 30	
aga gca gca cct gct gat aat cgg gtc atc cgt gtg gac ccc tca tgt Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys	261
35 40 45 50	
cca ttc agc cgg aac ccc ggg ata cag gtc cac gag gac tat gac tgt Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys	309
55 60 65	
acc ctg aac cag acc aac atc ggc aac aac aac aac aag ttc tat att Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile	357
70 75 80	
atc caa ctg ctg gag gag ggt agt cgc ttc ttc tgc tgg aat cgc tgg Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp	405
85 90 95	
ggc cgc gtg gga gag gtg ggc cag agc aag atg aac cac ttc acc tgc Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys	453
100 105 110	
ctg gaa gat gca aag aag gac ttt aag aag aaa ttt tgg gag aag act Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr	501
115 120 125 130	
aaa aac aaa tgg gag gag cgg gac cgt ttt gtg gcc cag ccc aac aag Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys	549
135 140 145	
tac aca ctt ata gaa gtc cag gga gaa gca gag agc caa gag gct gta Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu Ala Val	597
150 155 160	
gtg aag gcc tta tct ccc cag gtg gac agc ggc cct gtg agg acc gtg Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val	645
165 170 175	
gtc aag ccc tgc tcc cta gac cct gcc acc cag aac ctt atc acc aac Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn	693
180 185 190	

atc ttc agc aaa gag atg ttc aag aac gca atg acc ctc atg aac ctg Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu 195 200 205 210	741
gat gtg aag aag atg ccc ttg gga aag ctg acc aag cag cag att gcc Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala 215 220 225	789
cgt ggc ttc gag gcc ttg gaa gct cta gag gag gcc atg aaa aac ccc Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro 230 235 240	837
aca ggg gat ggc cag agc ctg gaa gag ctc tcc tcc tgc ttc tac act Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr 245 250 255	885
gtc atc cca cac aac ttc ggc cgc agc cga ccc ccg ccc atc aac tcc Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser 260 265 270	933
cct gat gtg ctt cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg cta gcg gac Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp 275 280 285 290	981
atc gag ttg gcg cag acc ttg cag gca gcc cct ggg gag gag gag gag Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu 295 300 305	1029
aaa gtg gaa gag gtg cca cac cca ctg gat cga gac tac cag ctc ctc Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu 310 315 320	1077
agg tgc cag ctt caa ctg ctg gac tcc ggg gag tcc gag tac aag gca Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala 325 330 335	1125
ata cag acc tac ctg aaa cag act ggc aac agc tac agg tgc cca aac Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn 340 345 350	1173
ctg cgg cat gtt tgg aaa gtg aac cga gaa ggg gag gga gac agg ttc Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe 355 360 365 370	1221
cag gcc cac tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr 375 380 385	1269
aat gtg gcc gtg gtg gct gcc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg	1317

Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met	
390 395 400	
cca cac tcg ggt ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag	1365
Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu	
405 410 415	
aac agc aag tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgt ggg ggc cac	1413
Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His	
420 425 430	
cag gtg ggc tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac	1461
Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His	
435 440 445 450	
cac atc acc atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt	1509
His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe	
455 460 465	
gac agc gtc atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac	1557
Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp	
470 475 480	
att gaa ctt gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg gtg ccc caa ggc ccg	1605
Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro	
485 490 495	
cct gtg cag tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa	1653
Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu	
500 505 510	
tac ctc ata tac aag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg ctg gag	1701
Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu	
515 520 525 530	
att cac ctc taagctgctt gccctcccta ggtccaagcc	1740
Ile His Leu	

<210> 8

<211> 533

<212> PRT

<213> Myší sval

<400> 8

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys

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

Asn Ser Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu
 275 280 285

Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Glu Glu Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320

Leu Leu Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr
 325 330 335

Lys Ala Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys
 340 345 350

Pro Asn Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp
 355 360 365

Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His
 370 375 380

Gly Thr Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
 385 390 395 400

Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415

Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly
 420 425 430

Gly His Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys
 435 440 445

Glu His His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala
 465 470 475 480

Gln Asp Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln
 485 490 495

Gly Pro Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln
 500 505 510

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525

Leu Glu Ile His Leu
530

<210> 9

<211> 1587

<212> DNA

<213> Myši sval

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1584)

<400> 9

atg gct cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag 48

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

cag cga caa ggg aca gag gag gag gac agc ttc cgg tcc act gcc gag 96

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

20 25 30

gct ctc aga gca gca cct gct gat aat cgg gtc atc cgt gtg gac ccc 144

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro

35 40 45

tca tgt cca ttc agc cgg aac ccc ggg ata cag gtc cac gag gac tat 192

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr

50 55 60

gac tgt acc ctg aac cag acc aac atc ggc aac aac aac aac aag ttc 240

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe

65 70 75 80

tat att atc caa ctg ctg gag gag ggt agt cgc ttc ttc tgc tgg aat 288

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn

85 90 95

cgc tgg ggc cgc gtg gga gag gtg ggc cag agc aag atg aac cac ttc 336

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe

100 105 110

acc tgc ctg gaa gat gca aag aag gac ttt aag aag aaa ttt tgg gag 384

Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu

115 120 125

aag act aaa aac aaa tgg gag gag cgg gac cgt ttt gtg gcc cag ccc 432

Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro

130	135	140	
aac aag tac aca ctt ata gaa gtc cag gga gaa gca gag agc caa gag			480
Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu			
145	150	155	160
gct gta gtg aag gtg gac agc ggc cct gtg agg acc gtg gtc aag ccc			528
Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro			
165	170	175	
tgc tcc cta gac cct gcc acc cag aac ctt atc acc aac atc ttc agc			576
Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser			
180	185	190	
aaa gag atg ttc aag aac gca atg acc ctc atg aac ctg gat gtg aag			624
Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys			
195	200	205	
aag atg ccc ttg gga aag ctg acc aag cag cag att gcc cgt ggc ttc			672
Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe			
210	215	220	
gag gcc ttg gaa gct cta gag gag gcc atg aaa aac ccc aca ggg gat			720
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp			
225	230	235	240
ggc cag agc ctg gaa gag ctc tcc tcc tgc ttc tac act gtc atc cca			768
Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro			
245	250	255	
cac aac ttc ggc cgc agc cga ccc ccg ccc atc aac tcc cct gat gtg			816
His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val			
260	265	270	
ctt cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg cta gcg gac atc gag ttg			864
Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu			
275	280	285	
gcg cag acc ttg cag gca gcc cct ggg gag gag gag gag aaa gtg gaa			912
Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu			
290	295	300	
gag gtg cca cac cca ctg gat cga gac tac cag ctc ctc agg tgc cag			960
Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln			
305	310	315	320
ctt caa ctg ctg gac tcc ggg gag tcc gag tac aag gca ata cag acc			1008
Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr			
325	330	335	

tac ctg aaa cag act ggc aac agc tac agg tgc cca aac ctg cgg cat Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His 340 345 350	1056
gtt tgg aaa gtg aac cga gaa ggg gag gga gac agg ttc cag gcc cac Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His 355 360 365	1104
tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc aat gtg gcc Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala 370 375 380	1152
gtg gtg gct gcc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg cca cac tcg Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser 385 390 395 400	1200
ggg ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag aac agc aag Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys 405 410 415	1248
tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgt ggg ggc cac cag gtg ggc Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly 420 425 430	1296
tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac cac atc acc Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr 435 440 445	1344
atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt gac agc gtc Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val 450 455 460	1392
atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac att gaa ctt Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu 465 470 475 480	1440
gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg gtg ccc caa ggc ccg cct gtg cag Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln 485 490 495	1488
tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa tac ctc ata Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile 500 505 510	1536
tac aag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg ctg gag att cac ctc Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu 515 520 525	1584
taa	1587

<210> 10

<211> 528

<212> PRT

<213> Myši sval

<400> 10

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys
 1 5 10 15

Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu
 20 25 30

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro
 35 40 45

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr
 50 55 60

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe
 65 70 75 80

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn
 85 90 95

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe
 100 105 110

Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu
 115 120 125

Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro
 130 135 140

Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro
 165 170 175

Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser
 180 185 190

Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys
 195 200 205

Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe
 210 215 220

Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp
 225 230 235 240

Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro
 245 250 255

His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val
 260 265 270

Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu
 275 280 285

Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu
 290 295 300

Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln
 305 310 315 320

Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr
 325 330 335

Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His
 340 345 350

Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His
 355 360 365

Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala
 370 375 380

Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser
 385 390 395 400

Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys
 405 410 415

Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly
 420 425 430

Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr
 435 440 445

Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val
 450 455 460

Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu
 465 470 475 480

Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln
 485 490 495

Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile
 500 505 510

Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu
 515 520 525

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Xaa je 1 až 5 okrem aminokyselín

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa je Thr alebo Ser

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 11

Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 1 5 10

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Xaa je Ser alebo Thr

<220>

<221> SITE

<222> (6)

<223> Xaa is Ile alebo Val

<220>

<221> SITE

<222> (9)

<223> Xaa je 1 až 5 okrem aminokyselín.

<220>

<221> SITE

<222> (10)

<223> Xaa je Ser alebo Thr

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 12

Xaa Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys

1 5 10 15

Gly Ile Tyr Phe Ala

20

<210> 13

<211> 45

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<220>

<221> SITE

<222> (6)

<223> Xaa je Ser alebo Thr

<220>

<221> SITE

<222> (16)

<223> Xaa je Ser alebo Thr

<220>

<221> SITE

<222> (21)

<223> Xaa je Ile alebo Val

<220>

<221> SITE

<222> (24)

<223> Xaa je 1 až 5 okrem aminokyselín

<220>

<221> SITE

<222> (25)

<223> Xaa je Ser alebo Thr

<400> 13

Leu Leu Trp His Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly
20 25 30

Ile Tyr Phe Ala Xaa Xaa Xaa Ser Lys Ser Ala Xaa Tyr
35 40 45

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Xaa je Leu alebo Val

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 20

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> SITE

<222> (21)

<223> Xaa je Asp alebo Glu

<220>

<221> SITE

<222> (22)

<223> Xaa je 10 až 11 okrem aminokyselín

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 15

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Xaa Xaa Xaa Trp Gly Arg Val Gly
 20 25

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 16

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Thr Xaa Asn Xaa
 1 5 10 15

Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Lys
 20 25

<210> 17

<211> 44

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> SITE

<222> (4)

<223> Xaa je Ile alebo Leu

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 17

Gln Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Gly Lys Leu

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Gln Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu

35 40

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 18

Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro

1 5 10 15

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 19

Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa

1 5 10 15

Leu

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 20

Gly Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Glu Val Ala Leu Gly
 1 5 10

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<220>

<221> SITE

<222> (14)

<223> Xaa je 7 až 9 okrem aminokyselín

<400> 21

Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15

Gly Xaa Xaa Val
 20

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Xaa je Tyr alebo Phe

<400> 22

Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 23

Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser
 20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 24

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

Asn Leu His Cys
 20

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 25

Cys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys
 20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 26

Cys Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys
 20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 27

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 28

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Met Lys

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Homológ poly(ADP-ribózo) polymerázy (PARP) získaný z človeka alebo iného cicavca, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, vyznačujúci sa tým, že má

a) funkčnú doménu viažucu NAD^+

a

b) žiadny motív sekvencie zinkových prstov všeobecného vzorca



v ktorom

m je celočíselná hodnota od 28 alebo 30 a radikály X sú navzájom nezávisle akoukoľvek aminokyselinou.

2. Homológ PARP podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že funkčná doména viažuca NAD^+ obsahuje jeden z nasledujúcich všeobecných sekvenčných motívov:

$\text{PX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFA}$,

$(\text{S/T})\text{XGLR}(\text{I/V})\text{XPX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFA}$ alebo

$\text{LLWHG}(\text{S/T})\text{X}_7\text{IL}(\text{S/T})\text{XGLR}(\text{I/V})\text{XPX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFAX}_3\text{SKSAXY}$

v ktorom

n je celočíselná hodnota od 1 do 5 a radikály X sú navzájom nezávisle akoukoľvek aminokyselinou.

3. Homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, vyznačujúci sa tým, že obsahuje aspoň jeden z nasledujúcich čiastkových sekvenčných motívov:

$\text{LX}_9\text{NX}_2\text{YX}_2\text{QLLX}(\text{D/E})\text{X}_{10/11}\text{WGRVG}$,

$\text{AX}_3\text{FXKX}_4\text{KTXNXWX}_5\text{FX}_3\text{P XK}$,

$\text{QXL}(\text{I/L})\text{X}_2\text{IX}_9\text{MX}_{10}\text{PLGKLX}_3\text{QIX}_6\text{L}$,

$\text{FYTXIPH XFGX}_3\text{PP}$; a

$KX_3LX_2LXDIEAX_2L$,

v ktorých radikály X sú navzájom nezávisle akékoľvek aminokyseliny.

4. Homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov vybraný spomedzi homológov ľudskej PARP, vyznačujúci sa tým, že má aminokyselinovú sekvenciu znázornenú sekvenciou č. 2 (ľudská PARP2) alebo sekvenciou č. 4 alebo 6 (ľudská PARP3 typu 1 alebo 2); alebo spomedzi homológov myšacej PARP, ktoré majú aminokyselinovú sekvenciu znázornenú sekvenciou č. 8 (myšacia PARP, dlhá forma) alebo sekvenciou č. 10 (myšacia PARP, krátka forma).
5. Väzobný partner majúci špecifickosť pre homológy PARP podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov vybraný spomedzi nasledujúcich:
 - a) protilátky a ich fragmenty,
 - b) proteínom podobné zlúčeniny, ktoré interagujú s čiastkovou sekvenciou proteínu, a
 - c) nízkomolekulové efekory, ktoré modulujú katalytickú aktivitu PARP alebo inú biologickú funkciu molekuly PARP.
6. Nukleová kyselina obsahujúca
 - a) nukleotidovú sekvenciu kódujúcu aspoň jeden homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 alebo jej komplementárnu nukleotidovú sekvenciu;
 - b) nukleotidovú sekvenciu, ktorá hybridizuje so sekvenciou podľa špecifikácie v a) za stringentných podmienok; alebo
 - c) nukleotidové sekvencie, ktoré sú odvodené od nukleotidových sekvencií definovaných v a) a b) cez degeneráciu genetického kódu.
7. Nukleová kyselina podľa nároku 6 obsahujúca

- a) nukleotidy +3 až +1715 uvedené v sekvencii č. 1;
 - b) nukleotidy +242 až +1843 uvedené v sekvencii č. 3;
 - c) nukleotidy +221 až +1843 uvedené v sekvencii č. 5;
 - d) nukleotidy +112 až +1710 uvedené v sekvencii č. 7; alebo
 - e) nukleotidy +1 až +1584 uvedené v sekvencii č. 9.
8. Expresná kazeta obsahujúca pod genetickou kontrolou aspoň jednej regulačnej nukleotidovej sekvencie aspoň jednu nukleotidovú sekvenciu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 a 7.
9. Rekombinantný vektor obsahujúci aspoň jednu expresnú kazetu podľa nároku 8.
10. Rekombinantný mikroorganizmus obsahujúci aspoň jeden rekombinantný vektor podľa nároku 9.
11. Transgénny cicavec obsahujúci vektor podľa nároku 9.
12. Cicavec trpiaci nedostatkom PARP alebo eukaryotická bunka trpiaca nedostatkom PARP, kde je inhibovaná funkčná expresia aspoň jedného génu, ktorý kóduje homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4.
13. Spôsob in vitro detekcie inhibítorov PARP, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa nasledujúce kroky:
- a) inkubáciu poly-ADP-ribozylovateľného cieľa voľného alebo na nosiči s reakčnou zmesou obsahujúcou
 - a1) homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4,
 - a2) aktivátor PARP; a
 - a3) inhibítor PARP alebo analyt, v ktorom je podozrenie na aspoň jeden inhibítor PARP;
 - b) uskutočnenie polyADP ribozylačnej reakcie; a

c) určenie polyADP ribozylácie cieľa kvalitatívne alebo kvantitatívne.

14. Spôsob podľa nároku 13, vyznačujúci sa tým, že homológ PARP je predinkubovaný s aktivátorom PARP a inhibítorom PARP alebo s analytom, v ktorom existuje podozrenie na aspoň jeden inhibítor PARP, pred uskutočnením poly-ADP-ribozyláčnej reakcie.
15. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 a 14, vyznačujúci sa tým, že poly-ADP-ribozylateľný cieľ je histónový proteín.
16. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 15, vyznačujúci sa tým, že aktivátorom PARP je aktivovaná DNA.
17. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 16, vyznačujúci sa tým, že poly-ADP-ribozyláčna reakcia sa naštartuje pridaním NAD^+ .
18. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 17, vyznačujúci sa tým, že poly-ADP-ribozylácia cieľa na nosiči sa určuje pomocou anti-poly(ADP-ribózových) protilátok.
19. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 17, vyznačujúci sa tým, že voľný cieľ je označený akceptorným fluoroforom.
20. Spôsob podľa nároku 19, vyznačujúci sa tým, že poly-ADP-ribozylácia voľného cieľa sa určuje pomocou anti-poly(ADP-ribózovej) protilátky, ktorá je označená donorným fluoroforom, ktorý je schopný prenášať energiu na akceptorný fluorofor.
21. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 19 a 20, vyznačujúci sa tým, že cieľom je biotinylovaný histón a akceptorný fluorofor je naň naviazaný cez avidín alebo streptavidín.
22. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 a 21 vyznačujúci sa tým, že anti-poly(ADP-ribózová) protilátka nesie ako donorný fluorofor kryptát euróbia.

23. Spôsob in vitro skrínungu väzobných partnerov pre molekulu PARP, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa

- a1) imobilizáciu aspoň jedného homológu PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na nosič;
- b1) kontaktovanie imobilizovaného homológu PARP s analytom, v ktorom je podozrenie na existenciu aspoň jedného väzobného partnera; a
- c1) určenie, v prípade vhodnosti po inkubačnom období, zložiek analytu viazaných na imobilizovaný homológ PARP;

alebo

- a2) imobilizáciu analytu na nosiči, pričom analyt obsahuje aspoň jedného možného väzobného partnera pre molekulu PARP;
- b2) kontaktovanie imobilizovaného analytu s aspoň jedným homológom PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, pre ktorý sa hľadá väzobný partner; a
- c2) skúmanie imobilizovaného analytu, v prípade vhodnosti po inkubačnom období, na viazanie homológu PARP.

24. Spôsob kvalitatívneho alebo kvantitatívneho určenia nukleových kyselín kódujúcich homológ PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa

- a) inkubovanie biologickej vzorky s definovaným množstvom exogénnej nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 a 7, hybridizáciu za stringentných podmienok, určenie hybridizujúcich nukleových kyselín a prípadne porovnanie so štandardom; alebo
- b) inkubovanie biologickej vzorky s párom oligonukleotidových primérov so špecifickosťou pre nukleovú kyselinu kódujúcu homológ PARP,

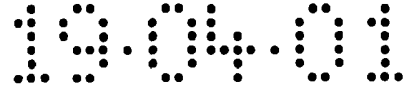
amplifikáciu nukleovej kyseliny, určenie produktu amplifikácie a prípadne porovnanie so štandardom.

25. Spôsob kvalitatívneho alebo kvantitatívneho určenia homológu PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa
- a) inkubovanie biologickej vzorky s väzobným partnerom špecifickým pre homológ PARP,
 - b) detekciu komplexu väzobného partnera s PARP a prípadne
 - c) porovnanie výsledku so štandardom.
26. Spôsob podľa nároku 25, vyznačujúci sa tým, že väzobným partnerom je protilátka alebo jej väzobný fragment, ktorý prípadne nesie detegovateľnú značku.
27. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 24 až 26 na diagnostiku chorôb sprostredkovaných energetickým deficitom.
28. Spôsob určenia účinnosti efektorov PARP, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa
- a) inkubovanie homológu PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 s analytom, ktorý obsahuje efektor fyziologickej alebo patologickej aktivity PARP; prípadné odstránenie efektora a
 - b) určenie aktivity homológu PARP v prípade vhodnosti po pridaní substrátov alebo kosubstrátov.
29. Kompozícia na génovú terapiu, vyznačujúca sa tým, že obsahuje vo vehikule prijateľnom pre génovú terapiu konštrukt nukleovej kyseliny, ktorý
- a) obsahuje antisense nukleovú kyselinu proti kódujúcej nukleovej kyseline podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 a 7; alebo

b) ribozým proti nukleovej kyseline podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 a 7;
alebo

c) kódy pre špecifický inhibítor PARP.

30. Farmaceutická kompozícia, vyznačujúca sa tým, že obsahuje vo farmaceuticky prijateľnom vehikule aspoň jeden proteín PARP podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, aspoň jedného väzobného partnera PARP podľa nároku 5 alebo aspoň jednu kódujúcu nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 6 alebo 7.
31. Použitie nízkomolekulových väzobných partnerov PARP podľa nároku 5 na výrobu farmaceutického prostriedku na diagnostiku alebo terapiu patologických stavov vo vývoji a/alebo progrese, v ktorých je zapojený aspoň proteín PARP alebo polypeptid z neho odvodený.
32. Použitie nízkomolekulových väzobných partnerov PARP podľa nároku 5 na výrobu farmaceutického prostriedku na diagnostiku alebo terapiu patologických stavov sprostredkovaných energetickým deficitom.



1 MAESSDKLYRVEYAKSERASCKKCSSESI PKDSLRMAIMVQSPHF DGKVP IIVYIIPSCFHKV
 1 MAAR
 1 MS
 1 MI

zhoda

ľudská PAPP1
ľudská PAPP2
ľudská PAPP3
mysäcia PAPP

61 CII S I I I I H P D V E V D O F S E L R W D D Q K V K K T A E A Q O V T G K Q O D G I G S K A E K T L O D F A A E Y A K S
 5
 3
 2

zhoda

ľudská PAPP1
ľudská PAPP2
ľudská PAPP3
mysäcia PAPP

121 H R S T C K G C H E K I E X G Q V R L S K K H V D P E K I Q L Q H I D R W Y I I P O C P V K N E E L G P P E Y S A S Q
 20
 3
 2

zhoda

ľudská PAPP1
ľudská PAPP2
ľudská PAPP3
mysäcia PAPP

181 L X G F S L L A T E D K E A L K K Q L P Q V K S E G K H K G D K V D G V D E V A K K S K K E K D K D S K L E K A L K A
 43
 3
 2

zhoda

ľudská PAPP1
ľudská PAPP2
ľudská PAPP3
mysäcia PAPP

261 Q H D L I W H I K D E L K K V C S T H D L K E L L I F H K Q O V P S G E S A I L D R V A D G H V F G A L L P C E E C S G
 68
 3
 2

zhoda

ľudská PAPP1
ľudská PAPP2
ľudská PAPP3
mysäcia PAPP



LNHFXTX - LEDAKEDFXKKFXEKTKNNWERRRDXFKKPKYTLLEVDY - XEKEDDEUA VVK - zhoda

610 620 630 640 650 660

601 LEQHNSK - EDALJEFHKLLEKTYEBKTCNAWHSKN - FTKYPKPKPYPLLEIDYO - - QDEEAVKK -
148 LVACSGH LHXAKKELIPQKKFLDKKMMWEDREKKEFKVFPQKYDHLQKHDYATNTTQDEEETKKK -
119 INHPTR - LEDAKKDPPEKXKFRKREKTKKNNWAEERDHPVSHPPQKYTLLEVO - - ADEDEAQEAVVK -
109 MNHFTC - LEDAKKDPKPKKFKFHEKTKKHKWAEERDRFVAQPNKYTLLEVO - - GEAESQEA VVK A
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP

- SLXVDXGVPVSTVXXRRVQPCSLDPAATQXLI TNIFSVEMFKHAMXLDVXKKMPLGKLSK zhoda

670 680 690 700 710 720

655 - - LTVNPGTKSKLPKPVV - - - - - DLIXKXIFDVESKKAHVVEYEIDLQKKAHPLOKLSK
209 ESLKSP LKPEEQLLDLKRVV - - - - - ELIXKLICNVQAAMERMMELHKKYNTKKAHPLOKLSK
175 - - - - - VDRRQPPVITVTKRNV - - - - - ELIXKLICNVQAAMERMMELHKKYNTKKAHPLOKLSK
166 LSPQVDSGPPVRTVVVK - - - - - PCSLDPAATQNLITNIFSKKEHFKNANLDMNLDVVKKHPLOKLSK
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP

QOIAAGFBALEEA LEEA LXXGTXGQSLSEELSSXPYTVIPIIDFGXSPPLINSPPDXLQAKK zhoda

730 740 750 760 770 780

704 ROIOAAYSILSEVQAQVSOQSSDSQILLD - LSNRFYTLIPHDPOMKKPPPLLNHADSVQA K V
260 AQIKAOYQS LKKIEDCIRAGQHORA LNE - ACHEFPYTHIPHDPOMKKPPPLLNHADSVQA K V
231 QOJARGFEAL EALEEA LKGP TDGQQLSEESHSHPYTVIPIIDFGXSPPLINSPPDXLQAKK
223 QOJARGFEAL EALEEA LKGP TDGQQLSEESHSHPYTVIPIIDFGXSPPLINSPPDXLQAKK
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP

DHLLVLA DIELAQXLQAXXEXSXKXVBPPIPLDRDYQLLKCQLLDSOSXEXYKVIQTY zhoda

790 800 810 820 830 840

763 EMLDNLDIEVAYSLLRQGSDDSSK - - - - - DPIP DVHYEK LKTDIKVVDROSEAEIIRKY
319 QLLEALGDI EAIAIYKLVKTBLO - - - - - HPLDQHYRNLLKCALRPLDHELSYEFKVIISQY
291 DMLLVLA DIELAQXLQAXXEXSXKXVBPPIPLDRDYQLLKCQLLDSOSXEXYKVIQTY
283 DMLLVLA DIELAQXLQAXXEXSXKXVBPPIPLDRDYQLLKCQLLDSOSXEXYKVIQTY
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP

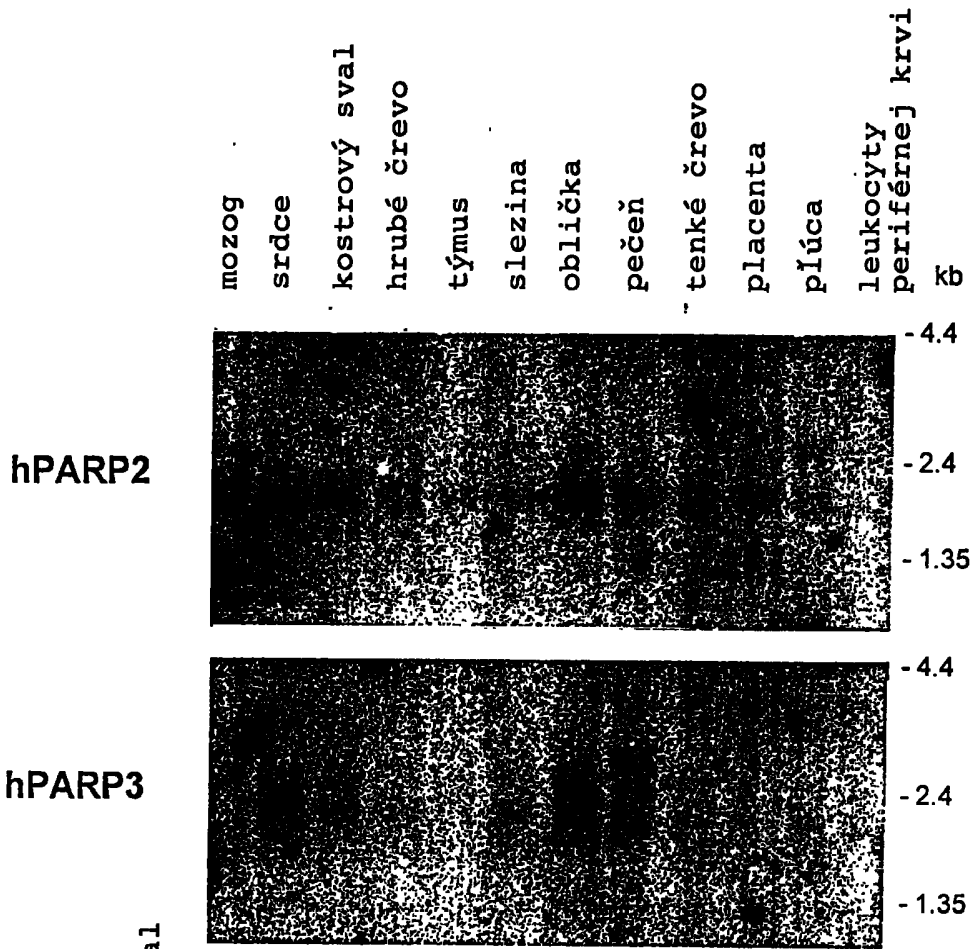
LKQTGAXTHICPY - - TLXDI PKVNEREGEXDRFOAHSKLOHRRRL'LLWIOSNHAVVAOILSSGL zhoda

850 860 870 880 890 900

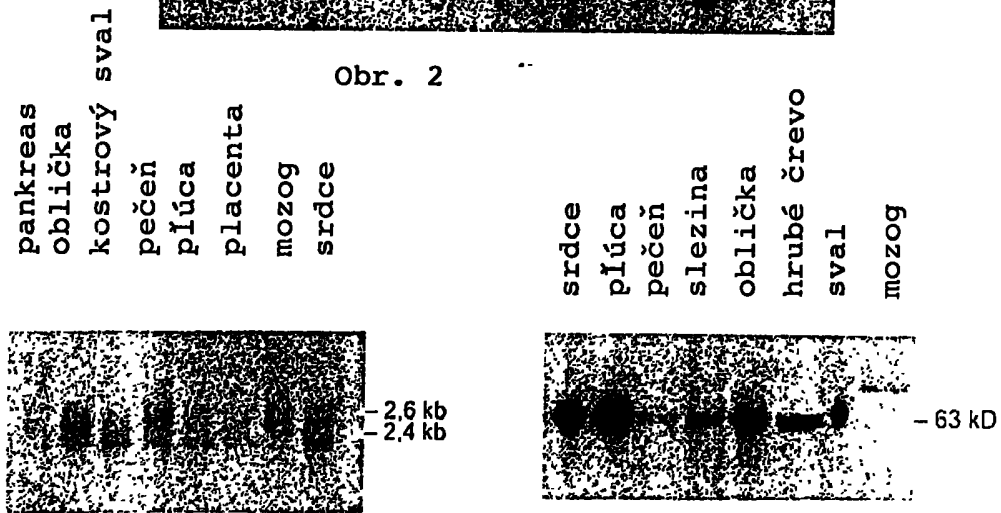
818 VKNTHAATTHHAYDLEVIDIFKISRREGCECOHYKPYKQLHNNRLLWHIGSN'TTHFAOILSQGL
373 LOSTHAPTHSDYTHTLTLDLPEVEKDGESAFR - - EDLHNRHLLWHIGSN'HSMWVQIISQGL
350 LEO TGSNIKCP - - - - - TLQH IWRVNRQEGEGEDRPOAHSKLOHRRRL'LLWIOSNHAVVAOILSSGL
343 LKOTGNSYRCP - - - - - NLLRHVWKVNRQEGEGEDRPOAHSKLOHRRRL'LLWIOSNHAVVAOILSSGL
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP
mysacia PAPP

	R I A P H E A P - S G O R V O K O I Y P A S E N S K S A G Y V X T S X C O G H X V O L H L L O E V A L O X E H E L X X A	910	920	930	940	950	960	zhoda	
878	R I A P P E A P V T O Y H F G K O I Y P A D H V S K S A N Y C H T S O - - G D P I O L I L L G E V A L O G N H Y E L K I I A							ludská PARE1	
431	R I A P P E A P I T O Y N F O K O I Y P A D H S K S A H Y C I F A S R - - L K N T O L L L L G E V A L O G O C N I E L L E I A							ludská PARE2	
407	R I M P H - - - S G O R V G K O I Y P A S E N S K S A G Y V I G M K C G A H H V V O I Y H P L O E V A L O R E H I I N T D							ludská PARE3	
400	R I M P H - - - S G O R V G K O I Y P A S E N S K S A G Y V T M H I C O G H H Q V G I Y K F L O E V A L O K E H I I T I D							mýšacia PARE	
	N P S L K S L P P O K D S V I G L G K T E P D P A O D I E L E L D G O O V V P L O P P V X C O X F X S S X P S L - Y S	970	980	990	1000	1010	1020	zhoda	
936	S H I S K - L P K O K H S V K G L O K T T P D P S A H I S L D - - - - - O V D V P L G T O I S S O V - - - H D T S L L Y N							ludská PARE1	
489	N P K A E G L L O K H S T K O L O K H A P P S S A H P Y T L N - - - - - O S T V P L G P A S D T G I L N P D O Y T L H Y N							ludská PARE2	
463	N P S L X S P P P O P D S V I A R C H T E P D P T O D T E L E L D O O O V V V P O G O P V P C P E P S S S T P S O - - - S							ludská PARE3	
456	D P S L K S P P P G F D S V I A R G Q T E P D P A O D I E L E L D O O P P V V P O G P P P V O C P S F K S S S P S O - - - S							mýšacia PARE	
	E Y L V Y X E S Q V R L R Y L L E V H P N P - X X L W -							zhoda	4/7
	E Y I V Y D I A Q V H L K Y L L K L K F N F K T S L W .	1030	1040					ludská PARE1	
545	E Y I V Y N P N O V R H R Y L L K V O P H P - L O L W .							ludská PARE2	
521	E Y L I Y Q E S O C R R L R Y L L E V H L .							ludská PARE3	
514	E Y L I Y K E S O C R R L R Y L L E I I - - - - - L							mýšacia PARE	

Obr. 1 (4)



Obr. 2

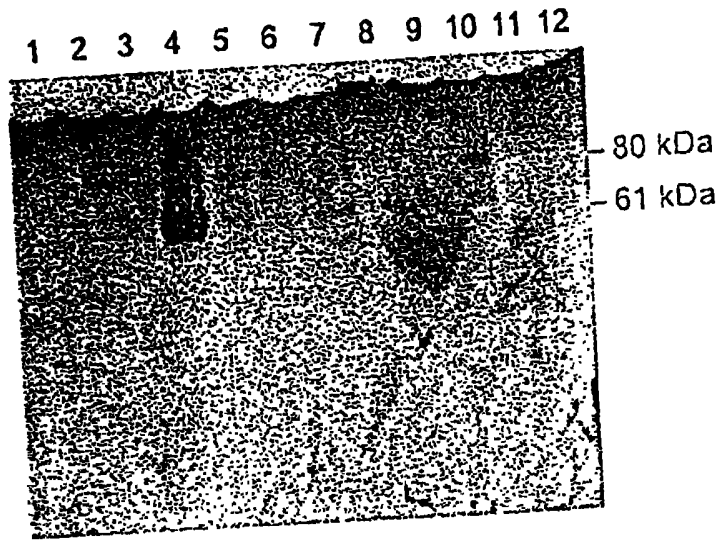


Analýza Northern Blot
Tkanivová distribúcia
ľudskej PAPR3

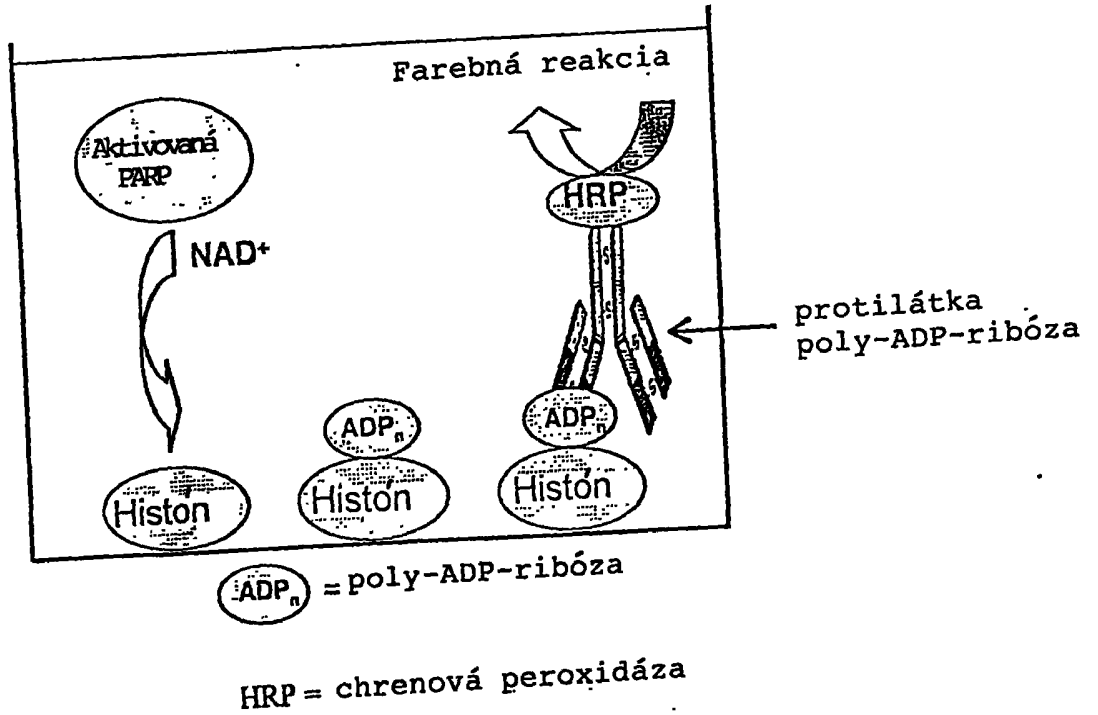
Obr. 3

Analýza Western Blot
Tkanivová distribúcia PAPR3

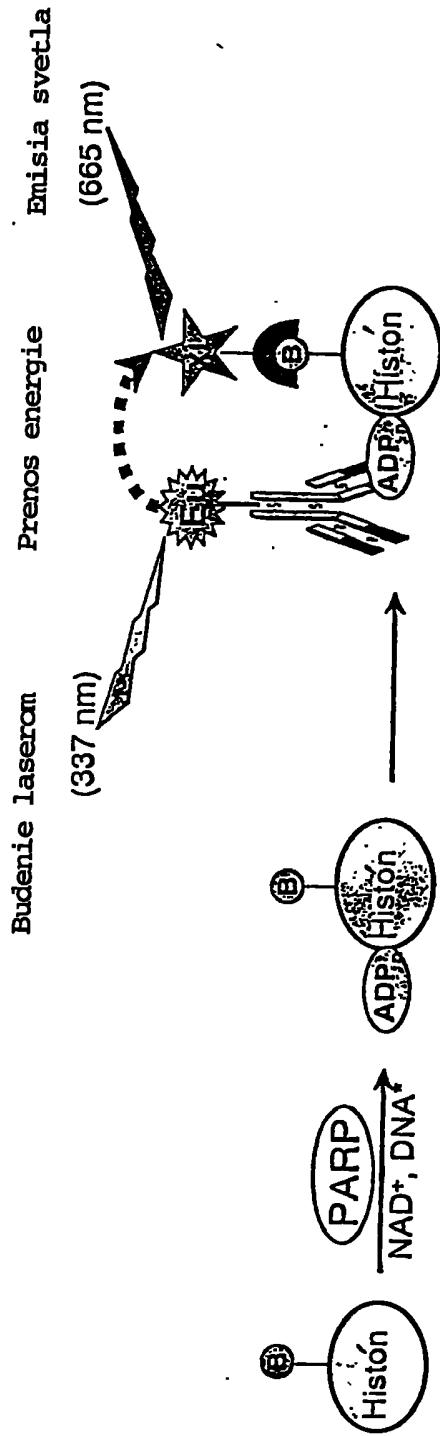
Obr. 4



Obr. 5



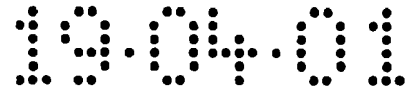
Obr. 6



ADP = poly-ADP-ribóza
 B = biotín
 DNA* = aktivovaná DNA

Streptavidín
 označený
 fluoroformom
 XL 665

Protilátka
 poly-ADP-ribóza označená
 kryptátom europia



Obr. 7