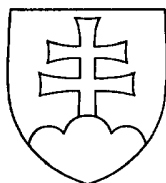


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 29.04.96
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/431 048, 08/496 841,
08/509 359
- (32) Dátum priority: 28.04.95, 28.06.95, 31.07.95
- (33) Krajina priority: US, US, US
- (40) Dátum zverejnenia: 09.09.98
- (86) Číslo PCT: PCT/CA96/00263, 29.04.96

(21) Číslo dokumentu:

1453-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

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

(71) Prihlasovateľ: HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, Toronto, Ontario, CA;
THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO, Toronto, Ontario, CA;

(72) Pôvodca vynálezu: Rae Patricia A., Toronto, Ontario, CA;
St. George-Hyslop Peter H., Toronto, Ontario, CA;
Fraser Paul E., Toronto, Ontario, CA;
Rommens Johanna M., Toronto, Ontario, CA;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Genetické sekvencie a proteíny týkajúce sa Alzheimerovej choroby a ich použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaná identifikácia, izolácia, sekvenovanie a charakterizácia mutácie dvoch ľudských génov pre pre-se-nilín, PS-1 a PS-2, ktoré vedú k Alzheimerovej cho-ro-be. Tiež sú identifikované homológy génu pre pre-se-nilín u myši, C. legans a D. melanogaster. Nukleové ky-seliny a proteíny obsahujúce alebo odvodené od pre-se-nilínov sú užitočné pri diagnostike Alzheimerovej cho-roby, pri identifikácii a vývoji terapeutík na liečbu Alz-heimerovej choroby a pri produkcii bunkových línií a transgénnych zvierat užitočných ako modely Alzhei-me-rovej choroby.

Genetické sekvencie a proteíny týkajúce sa Alzheimerovej choroby a ich použitie

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa všeobecne týka oblasti neurologických a fyziologických disfunkcií s Alzheimerovou chorobou. Presnejšie, vynález sa týka identifikácie, izolácie a klonovania génov, ktoré sú asociované s Alzheimerovou chorobou, rovnako ako ich transkriptov, génových produktov, asociovaných informácií o sekvencii, a príbuzných génov. Predkladaný vynález sa týka metód pre detekciu a diagnostiku nosičov normálnych a mutovaných alel týchto génov, metód pre detekciu a diagnostiku Alzheimerovej choroby, metód pre identifikáciu génov a proteínov týkajúcich sa alebo interagujúcich s Alzheimerovými génami a proteínmi, metód pre vyšetrovanie potencionálnych liečiv pre liečbu Alzheimerovej choroby a bunčných línií a zvieracích modelov použiteľných pre hodnotenie potencionálne použiteľných terapií Alzheimerovej choroby.

Doterajší stav techniky

Pre uľahčenie odkazov na rôzne časopisové články je zoznam článkov uvedený na konci tejto prihlášky.

Alzheimerova choroba (AD) je degeneratívne ochorenie ľudského centrálného nervového systému charakterizované progresívnym narušením pamäti a znížením kognitívnych a intelektuálnych funkcií v strednom až neskoršom veku (Katzman, 1986). Choroba je doprevádzaná súborom neuropatologických charakteristík, pričom hlavnými sú prítomnosť extracelulárneho amyloidu alebo senilných plakov a neurofibrilárnej degenerácie neurónov. Etiológia onemocnenia je komplexná, hoci pri niektorých rodinách je dedičná autosomálne dominantným spôsobom. Rovnako aj medzi týmito dedičnými formami AD existujú aspoň tri rôzne gény, ktoré udeľujú dedičnú náchylnosť k tomuto onemocneniu (St. George-Hyslop et al., 1990).

4 (C112R) alelový polyformizmus génu pre Apolipoproteín E (ApoE) bol asociovaný s AD v signifikantnom počte prípadov s nástupom v neskoršom veku (Sauders et al., 1993, Strittmatter et al., 1993).

Podobne, veľmi malá časť familiárnych prípadov s nástupom pred 65 rokom veku bola asociovaná s mutáciami génu pre -amyloid prekurzorový proteín (APP) (Chartier-Harluin et al., 1991, Goate et al., 1991, Murrel et al., 1991, Karlinsky et al., 1992, Mullan et al., 1992). Tretí lokus (AD) asociovaný s veľkou časťou prípadu so skorým nástupom AD bol nedávno mapovaný na chromozóme 14q24.3 (Schellenberg et al., 1992, St. George-Hyslop et al., 1992, Van Broeckhoven et al., 1992).

Hoci 14q región chromozómu nesie niekoľko génov, ktoré môžu byť považované za kandidátov génov pre umiestnenie mutácií asociovaných s AD3 (napr. cFOS, alfa-1-chymotrypsín akathepsín G) väčšina z týchto kandidátov génov bola vylúčená na základe ich fyzického umiestnenia okrem AD3 regionu alebo absencia mutácií v ich príslušných otvorených sčítacích rámčekoch (Schellenberg et al., 1992, Van Broeckhoven et al., 1992, Rogaev et al., 1993, Wong et al., 1993).

Existuje niekoľko smerov vývoja a komerčných zameraní alebo stratégií s ohľadom na liečbu Alzheimerovej choroby a jej diagnostiky. Publikovaná PCT prihláška WO94 23049 opisuje transfekciu DNA s vysokou molekulovou hmotnosťou do špecifických myších buniek. Táto metóda môže byť použitá pre analýzu veľkých génových komplexov. Napríklad, transgénnu myš môže mať zvýšenú dávku APP génu, čím napodobňuje trisomický stav, ktorý prevláda pri Downovom syndróme a umožňuje generovanie zvieracích modelov s -amiloidosou podobnej tej, ktorá prevažuje pri jedincoch s Alzheimerovou chorobou. Publikovaná medzinárodná prihláška WO 94 00569 popisuje transgenné non-ludské zvieratá majúce veľké transgény ako je transgén obsahujúci ľudský APP gén. Takéto zvieracie modely môžu poskytnúť užitočné modely ľudských genetických onemocnení, ako je Alzheimerova choroba.

Kanadská patentová prihláška č.2096911 popisuje nukleovú kyselinu kódujúcu AAP-štiepiacu proteázu, ktorá je asociovaná s Alzheimerovou chorobou a Downovým syndrómom. Genetická informácia, ktorá bola izolovaná z chromozómu 19, môže byť použitá pre diagnózu Alzheimerovej choroby. Kanadská patentová prihláška č.2071105 popisuje detekciu a liečbu dedičnej alebo získanej Alzheimerovej choroby pomocou použitia YAC nukleotidových sekvencií. YAC sú identifikované číslami 23CB10,

28CA12 a 26FF3.

U.S. patent 5297562 popisuje detekciu Alzheimerovej choroby asociovej s trisomiou chromozómu 21. Liečba zahrňuje metódy pre redukciu proliferácie trisomie chromozómu 21. Kanadská patentová prihláška č. 2054302 popisuje monoklonálne protilátky, ktoré rozpoznávajú jadrový proteín ľudských mozgových buniek kódovaný na chromozóme 21 a ktoré sú použitý pre detekciu zmien exprese počas Alzheimerovej choroby alebo Downovho syndrómu. Monoklonálna protilátka je špecifická pre proteín kódovaný ľudským chromozómom 21 a nachádza sa vo veľkých pyramidálnych bunkách ľudského mozgového tkaniva.

Oblasť vynálezu

Predkladaný vynález je čiastočne založený na identifikácii, izolácii, klonovaní a sekvencovaní dvoch cicavčích génov, ktoré boli označené presenilín-1 (PS1) a presenilín-2 (PS-2). Tieto dva gény a ich korešpondujúce proteínové produkty, sú členy vysoko konzervovanej rodiny génov, presenilínov s homológmi alebo orthológmi iných cicavčích druhov (napr. myši, krýs) rovnako ako orthológy pri bezstavovcoch napr., *C.elegans*, *D.melanogaster*). Mutácie v týchto génoch sú spojené u ľudí s vývojom foriem familiárnej Alzheimerovej choroby a môžu byť príčinou aj iných onemocnení (napr. iných kognitívnych, intelektuálnych, neurologických alebo psychologických ochorení ako je mozgové krvácanie, schizofrénia, depresia, mentálna retardácia a epilepsia). Predkladaný vynález poskytuje genómovú a cDNA nukleotidovú sekvenciu pre ľudský PS1 (hPS1) a ľudský PS2 (hPS2) gén, myši PS1 homológ (mPS1) a príbuzné gény od *C.elegans* (sel-12, Spe-4) a *D.melanogaster* (DmPS). Vynález taktiež poskytuje predpokladané aminokyselinové sekvencie presenilín proteínov kódovaných týmito génmi a štrukturálne charakterizácie presenilínov, vrátane putatívnych funkčných domén a antigénnych determinantov. Množstvo mutácií presenilínov, ktoré sú príčinou Alzheimerovej choroby (AD) u ľudí je taktiež opísaných a uvedených do vzťahu k funkčným doménam proteínov.

Takto v jednej sérii uskutočnenia predkladaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny vrátane sekvencií

nukleotidov obsahujúcich alebo odvodených od génov pre presenilín a/alebo kódujúcich polypeptidy obsahujúcich alebo odvodených od presenilín proteínov. Presenilín sekvencie podľa predkladaného vynálezu obsahujú špecificky popísané sekvencie, zostrihané varianty týchto sekvencií, alelické varianty týchto sekvencií, synonymné sekvencie a homológne alebo ortológne varianty týchto sekvencií. Tak napríklad vynález poskytuje genomové a cDNA sekvencie hPS1 génu, hPS2 génu, mPS1 génu a DmPS génu. Predkladaný vynález taktiež poskytuje alelické varianty a homológne alebo ortológne sekvencie poskytnutím metód, ktorými môžu byť takéto varianty získané rutinou. Predkladaný vynález taktiež špecificky poskytuje mutantné alebo onemocnenie spôsobujúce varianty presenilínov opísané v mnohých špecifických mutantných sekvenciách a poskytnutím metód, ktorými môžu byť varianty získané rutinou. Pretože nukleové kyseliny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité pre rôzne diagnostické, terapeutické a rekombinantné aplikácie, sú takiež poskytnuté rôzne podsady sekvencií pre presenilíny a kombinácie sekvencií pre presenilíny s heterológnymi sekvenciami. Napríklad pre použitie špecifickom hybridizačnom vyšetrení alebo technikách PCR amplifikácie, podsada podsady sekvencií pre presenilíny, vrátane sensu a antisensu sekvencií a vrátane normálnych a mutovaných sekvencií, rovnako ako intronových, exonových a netranslatovaných sekvencií, sú taktiež poskytnuté. Takéto sekvencie môžu obsahovať malý počet susedných nukleotidov zo sekvencií, ktoré sú opísané alebo inak tu zaznamenané, ale preferovane obsahujú aspoň 8 - 10, skôr 9 - 25 susediacich nukleotidov zo sekvencie pre presenilín. Iné preferované podsady sekvencií pre presenilín zahŕňujú tie, ktoré kódujú jednu alebo viac funkčných domén alebo antigénnych determinantov presenilínových proteínov, zrejme môžu obsahovať buď normálne (divého typu) alebo mutantné sekvencie. Vynález taktiež poskytuje rôzne konštrukcie nukleových kyselín v ktorých sú sekvencie pre presenilín, buď kompletne alebo podsady, operatívne pripojené na exogénne sekvencie počas tvorby klonovacích vektorov, fúzných vektorov, transgénnych konštruktov a podobne. Tak podľa iného aspektu vynálezu je poskytnutý vektor pre transformáciu buniek tkanív cicavcov alebo bezstavovcov pre expresiu normálnej alebo mutovanej sekvencie pre presenilín.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález

hostiteľské bunky, ktoré boli transfektované nukleovými kyselinami podľa predkladaného vynálezu. Bunky môžu byť transformované jednoducho za účelom propagácie konštruktov nukleových kyselín podľa predkladaného vynálezu, alebo môžu byť transformované tak, aby exprimovali sekvencie pre presenilín. Transformované bunky podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité v testoch pre identifikáciu proteínov alebo iných zlúčenín, ktoré ovplyvňujú normálnu alebo mutantnú expresiu presenilínu, ktoré reagujú s normálnymi alebo mutantnými presenilínovými proteínmi alebo ktoré modulujú funkciu alebo účinok mutantných proteínov, alebo pre produkciu presenilínových proteínov, fúzných proteínov, funkčných domén, antigénnych determinantov alebo protilátok podľa predkladaného vynálezu. Transformované bunky môžu byť taktiež implantované do hostiteľa, vrátane človeka, pre terapeutické alebo iné účely. Preferované hostiteľské bunky zahrňujú cicavčie bunky z neuronálnych, fibroblastových, splenických, organotypických, zmiešaných kultúr, alebo z kultúr kostnej drene, rovnako ako bakteriálne, kvasinkové, nematódne, hmyzie a iné bunky bezstavovcov. Pre použitie popísané ďalšie preferované bunky taktiež zahrňujú embryonálne kmeňové bunky, zygoty, gamety a bunky zárodočnej línie.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález modely transgénnych zvierat pre AD a iné choroby alebo onemcnenia asociované s mutáciami v génoch pre presenilín. Zvieratá môžu byť cicavcami, vrátane krýs, myší, škrečkov, morčiat, králikov, psov, mačiek, oviec, prasiat, a non-ludských primátov. Okrem toho, modely bezstavovcov, vrátane hlístov a hmyzu, môžu byť použité pre určité aplikácie. Zvieracie modely sú produkované štandardnými transgennými metódami vrátane mikroinjekcie, transfekcie alebo iných foriem transformácie embryonálnych kmeňových buniek, zygot, gamiet a buniek zárodočnej línie vektormi obsahujúce genomové alebo cDNA fragmenty, minigény, homológne rekombinantné vektory, vírové inserčné vektory a podobne. Vhodné vektory zahrňujú vírus vakcínie, adenovírus, adeno asociovaný vírus, retrovírus, lipozómový transport, neuraltropný vírus a Herpes simplex vírus. Zvieracie modely môžu obsahovať transgenné sekvencie obsahujúce alebo odvodené od presenilínov, vrátane normálnych a mutantných sekvencií, intronových, exonových

a netranslatovaných sekvencií kódujúcich podsady presenilínov ako sú funkčné domény. Hlavné typy poskytovaných zvieracích modelov sú:

1) Zvieratá pri ktorých bol normálny gén pre ľudský presenilín rekombinantne zavedený do genómu zvierťa ako ďalší gén, pod reguláciou buď exogenného, alebo endogenného promotorového elementu a buď ako minigén, alebo ako veľký genómový fragment, kde normálny gén pre ľudský presenilín bol rekombinantne substituovaný za jednu alebo dve kópie zvieracieho homologného génu pre presenilín homolognú rekombináciu alebo zameraním génu, a/alebo pričom jedna alebo obidve kópie zvieracieho homologného génu pre presenilín boli rekombinantne "humanizované" čiastočnou substitúciou sekvencií kódujúcich homolog homológnej rekombinácie alebo zameraním génu.

2) Zvieratá pri ktorých bol mutantný gén pre ľudský presenilín rekombinantne zavedený do genómu zvierťa ako ďalší gén, pod reguláciu buď exogenného alebo endogenného promotorového elementu a buď ako minigén alebo ako veľký genómový fragment, pričom mutantný gén pre ľudský presenilín bol rekombinantne substituovaný za jednu alebo obidve kópie zvieracieho homologného génu pre presenilín homolognú rekombináciu alebo zameraním génu, a/alebo kde jedna alebo obidve kópie zvieracieho homologného génu pre presenilín boli rekombinantne "humanizované" čiastočnou substitúciou sekvencií kódujúcich ľudský homolog homológnej rekombinácie alebo zameraním génu.

3) Zvieratá, u ktorých bola mutantná verzia jeden zo zvieracích génov pre presenilín rekombinantne zavedený do genómu zvierťa ako ďalší gén, pod reguláciu buď axogenného alebo endogenného promotorového elementu a buď ako minigén, alebo ako veľký genómový fragment, a/alebo kde bola mutantná verzia jeden zo zvieracích génov pre presenilín rekombinantne substituovaný za jednu alebo dve kópie zvieracieho homologného génu pre presenilín homolognou rekombináciu alebo zameraním génu.

4) "Knock-out" zvieratá, u ktorých boli jedna alebo obidve kópie génu pre zvierací presenilín parciálne alebo kompletne

deletované homológnu rekombináciou alebo zameraním génu, alebo bola inaktivovaná inzercia alebo substitúcia exogénnej sekvencie homológnej rekombinácie alebo zameraním génu. Pri preferovaných uskutočneniach má transgénny myší model pre AD transgén kódujúci normálny ľudský PS1 alebo PS2 proteín, mutantný ľudský alebo myší PS1 alebo PS2 proteín, alebo humanizovaný normálny alebo mutantný myší PS1 alebo PS2 proteín.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález v podstate čisté proteinové prípravky vrátane polypeptidov obsahujúcich alebo odvodených od presenilínových proteínov. Proteínové sekvencie presenilínu podľa predkladaného vynálezu zahrňujú špecificky popísané sekvencie, varianty týchto sekvencií vychádzajúce z alternatívneho zostrihu mRNA, alelické varianty týchto sekvencií a homológne alebo ortológne varianty týchto sekvencií. Tak napríklad predkladaný vynález poskytuje aminokyselinové sekvencie hPS1 proteínu, mPS1 proteínu a DmPS proteínu. Predkladaný vynález taktiež poskytuje alelické varianty a homológnych alebo ortológnych proteínov poskytnutím metód, ktorými môžu byť taktiež varianty získané rutinou. Predkladaný vynález taktiež špecificky poskytuje mutantné alebo onemocnenie spôsobujúce varianty presenilínov opísaním mnohých špecifických mutantných sekvencií a poskytnutím metód, ktorými môžu byť tiež varianty rutinou získané. Pretože proteíny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité pre rôzne diagnostické, terapeutické a rekombinantné aplikácie, sú taktiež poskytnuté rôzne podsady proteínových sekvencií pre presenilíny a kombinácie proteínových sekvencií pre presenilíny s heterológnymi sekvenciami. Napríklad, pre použitie ako imunogén alebo v testoch väzby, podsady proteínových sekvencií pre presenilíny, vrátane normálnych a mutovaných sekvencií sú poskytnuté. Takéto proteínové sekvencie môžu obsahovať malý počet susedných aminokyselinových zbytkov zo sekvencií, ktoré sú opísané alebo inak tu zachytené, ale preferovane obsahujúce aspoň 4 - 8, radšej 9 - 15 susediacich aminokyselinových zbytkov z presenilínovej sekvencie. Iné preferované podsady proteínových sekvencií pre presenilín zahrňujú tie, ktoré kódujú jedno alebo viacej funkčných domén alebo antigénnych determinantov presenilínových proteínov a zrejme môžu obsahovať normálne (divého typu) alebo mutantné sekvencie.

Vynález taktiež poskytuje rôzne proteínové koštruktory, buď kompletne alebo podsady, pripojené na exogené sekvencie počas tvorby fúzných proteínov a podobne. Tak, podľa tohoto aspektu vynálezu je taktiež poskytnutá metóda pre produkciu všetkých vyššie opísaných proteínov, ktoré obsahujú, alebo sú odvodené od presenilínov.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález produkciu a použitie polyklonálnych a monoklonálnych protilátok, vrátane fragmentov protilátok, vrátane Fab fragmentu, $F(ab')_2$ a jednoreťazových fragmentov protilátok, ktoré sa selektívne viažu na presenilíny, alebo na špecifické antigénne determinanty presenilínov. Protilátky môžu byť získané od myší, králikov, kôz alebo iných vhodných zvierat, alebo môžu byť produkované rekombinantne v kultivovaných bunkách ako sú hybridomné bunečné línie. Preferovane sú protilátky namierené proti sekvenciám pre presenilín obsahujúce aspoň 4 - 8, radšej 9 - 15 susedných aminokyselinových zvyškov zo sekvencie pre presenilín. Protilátky podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité v rôznych diagnostických, terapeutických a technických aplikáciach, ktoré sú tu popísané.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález metódy pre vyšetrovanie a identifikáciu proteínov, malých molekúl alebo iných zlúčenín, ktoré sú schopné indukcie alebo inhibície expresie génov pre presenilín a ich proteíny (napr. PS1 alebo PS2). Testy môžu byť uskutočnené in vitro pomocou použitia netransformovaných buniek, imortalizovaných bunečných línií alebo rekombinantných bunečných línií, alebo in vivo pomocou použitia transgenných zvieracích modelov tu popísaných. Jednotlivo, testy môžu detekovať prítomnosť zvýšenej alebo zníženej expresie PS1, PS2 alebo iných génov vo vzťahu k presenilínu, zvýšené alebo znížené hladiny proteínových produktov vo vzťahu k presenilínom alebo zvýšené alebo znížené hladiny expresie markerových génov (napr. -galaktosidasy, zeleného fluorescentného proteínu, alkalické fosfatasy alebo luciferasy) operatívne viazané na presenilínový 5' regulačný región v rekombinantnom konštrukte. Bunky, o ktorých je známe, že exprivujú určitý presenilín alebo sú transformované tak, aby exprivovali určitý presenilín, sú inkubované a jedna alebo viacej testovaných

zlúčenín je pridaných do média. Po dostatočnej časovej perióde (napr. 0 - 72 hodín) umožňujúcej indukciu alebo inhibíciu expresie presenilínu zlúčeninou, je akákoľvek zmena v hladine expresie vzhľadom k stanovenej základni expresie detektovaná pomocou použitia akékoľvek techniky opísanej vyššie. V predovšetkým preferovaných vyhotoveniach sú buňky z imortalizovaných bunecných línií ako je ľudská neuroblastomová, glioblastomová alebo hybridomná bunecná línia, alebo to sú transformované bunky podľa predkladaného vynálezu

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález metódy pre identifikáciu proteínov a iných zlúčenín, ktoré sa viažu na, alebo inak priamo interagujú s presenilínmi. Proteíny a zlúčeniny budú zahrňovať endogenné bunecné zložky, ktoré interagujú s presenilínmi in vivo a ktoré preto poskytujú nové ciele pre farmaceutické a terapeutické intervencie, rovnako ako rekombinantné, syntetické a iné exogenné zlúčeniny, ktoré môžu mať väzbovú kapacitu pre presenilín a preto môžu byť kandidáti pre farmaceutický agens. Tak, v jednej sérii vyhotovenia, bunkové lysáty alebo homogenizáty tkaniva (napr. homogenizáty mozgového tkaniva, lymfocytárne lysáty) môžu byť vyšetrované na proteíny a iné zlúčeniny, ktoré sa viažu na normálne alebo mutované presenilíny. Alternatívne mnoho rôznych exogenných zlúčenín, ako prirodzene sa vyskytujúcich, tak syntetických (napr. knižnice malých molekúl alebo peptidov) môžu byť vyšetrované na väzobnú kapacitu pre presenilín. V každom z týchto vyhotovení je test na detektovanie väzby medzi "presenilínovou zložkou" a s nejakou inou skupinou. "presenilínovou zložkou v týchto testoch môže byť akýkoľvek polypeptid obsahujúci alebo odvodený od normálneho alebo mutovaného presenilínového proteínu, vrátane funkčných domén alebo antigénnych determinantov presenilínu, alebo presenilínových fúzných proteínov. Väzba môže byť detekovaná nešpecifickými meraniami (napr. zmenou intracelulárneho Ca^{2+} , pomeru GTP/GDP) alebo špecifickými meraniami (napr. zmenami v A produkcii peptidov alebo zmenou expresie iných downstream génov, ktorá môže byť detektovaná rôznymi testami, 2D elektroforézou, rôznou hybridizáciou alebo SAGE metódou). Preferované metódy obsahujú variácie nasledujúcich techník:

- 1) priame extrakcie afinitnou chromatografiou
- 2) ko-izolácie zložiek presenilínu a naviazaných proteínov alebo iných zlúčenín imunoprecitáciou,
- 3) Biomolecular Interaction Assay (BIAcore), a
- 4) kvasinkových dvoj-hybridných systémov.

V inej serii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález metódy pre identifikáciu proteínov, malých molekúl a iných zlúčenín, ktoré sú schopné modulácie aktivity normálnych alebo mutovaných presenilínov. Pri použití normálnych buniek alebo zvierat, podľa predkladaného vynálezu, alebo buniek získaných od subjektov nesúcich normálne alebo mutované gény pre presenilín poskytuje predkladaný vynález metódy pre identifikáciu takých zlúčenín na základe ich schopností ovplyvňovať expresiu presenilínov, intracelulárnu lokalizáciu presenilínov, intracelulárne hladiny Ca^{2+} , Na^+ , K^+ alebo iných iónov alebo ich metabolizmus, výskyt alebo stupeň apoptosy alebo bunkovej smrti, hladiny alebo stav A produkcie peptidov, prítomnosť alebo hladiny fosforilácie s mikrotubulmi asociovaných proteínov alebo fyziologické markery, ktoré odlišujú bunky majúce normálne a mutované sekvencie pre presenilín. Pri použití transgénnych zvierat podľa predkladaného vynálezu je metóda identifikácie takýchto zlúčenín poskytnutá na základe schopnosti zlúčeniny ovplyvňovať behaviorálne, fyziologické alebo histologické fenotypy asociované s mutáciami presenilínov.

V inej sérii uskutočnení poskytuje predkladaný vynález metódy pre vyšetrenie nosičov presenilínových alel asociovaných s AD. Pre diagnózu obetí AD, a pre vyšetrenie a diagnózu príbuzných presenilných a senilných demencií, psychiatrických ochorení ako je schizofrénia a depresia a neurologických ochorení ako je iktus a mozgové krvácanie, ktoré sú asociované s mutáciami v PS1 alebo PS2 génoch. Vyšetrenie a/alebo diagnóza môže byť uskutočnená metódami založenými na nukleových kyselinách (vrátane genómovej a mRNA/cDNA sekvenciách), proteínoch, a/alebo protilátkach tu opísaných a daných, vrátane funkčných testov pre detektovanie zlyhania alebo zosilnenia normálnej aktivity presenilínu a/alebo prítomnosti špecifických nových aktivít spôsobených mutantnými presenilínmi. Tak sú poskytnuté vyšetrenia a diagnostika založené na presenilínových proteínoch, ktoré detekujú rozdiely medzi

mutantnými a normálnymi presenilínmi v elektroforetickej mobilite, vzorcoch proteolytického štepenia, molárnych pomeroch rôznych aminokyselinových zvyškov, v schopnosti viazať sa na špecifickú protuiliátku. Okrem toho sú poskytnuté vyšetrenia a diagnostika založené na nukleových kyselinách (gDNA, cDNA alebo mRNA), ktoré detektujú rozdiely v sekvencii nukleotidov priamym sekvencovaním nukleotidov, hybridizáciou pri použití alelovo špecifických nukleotidov, trávenie restriktívnymi enzýmami a mapovanie (napr. RFLP, REF-SSCP), elektroforetické mobility (napr. SSCP, DGGE), PCR mapovanie, RNAsovej ochrane, chemickým chybným štepením, ligasiou sprostredkovanou detekciou a rôznymi inými metódami. Poskytnuté sú tiež iné metódy, ktoré detekujú abnormálne spracovanie PS1, PS2, APP alebo proteínov reagujúcich s PS1, PS2 alebo APP (napr. abnormálna fosforylácia, glykosylácia, amidácia alebo proteolytické štiepenie), alterácia v presenilínovej transkripcii, translácii a posttranslačnej modifikácii; alterácia v intracelulárnej alebo extracelulárnej preprave presenilínového génového produktu; alebo abnormálnej intracelulárnej lokalizácii presenilínu. V súlade s týmito vyhotoveniami sú taktiež poskytnuté diagnostické kity, ktoré budú obsahovať reagens nevyhnutné pre vyššie opísané diagnostické vyšetrenie.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález metódy a farmaceutické prípravky pre použitie v liečbe s presenilínmi asociovanými ochoreniami ako je AD. Tieto metódy a farmaceutické prípravky sú založené na:

- 1) podávaní normálnych PS1 alebo PS2 proteínov
- 2) génovej terapii normálnymi PS1 alebo PS2 génmi pre kompenzáciu alebo náhradu za mutantné gény
- 3) génovej terapii založenej na antisensii sekvenciách k mutantným PS1 alebo PS2 génom, ktoré "vyradia" mutantné gény,
- 4) génovej terapii založenej na génoch, ktoré kódujú proteín, ktorý obklopuje alebo koriguje poškodzujúci účinok PS1 alebo PS2 mutantov,
- 5) imunoterapii založenej na protilátkach k normálnym a/alebo mutantným PS1 alebo PS2 proteínom, alebo
- 6) malých molekulách (liečivách), ktoré pozmeňujú expresiu PS1 alebo PS2, blokujú abnormálne interakcie medzi mutantnými formami PS1 alebo PS2 a inými proteínmi alebo ligandami, alebo

ktoré inak blokujú aberantnú funkciu mutantných PS1 alebo PS2 proteínov zmenou štruktúry mutantných proteínov, zvýšením ich metabolickej clearance alebo inhibíciou ich funkcie.

V súlade s iným aspektom predkladaného vynálezu môžu byť proteíny podľa predkladaného vynálezu použité ako počiatočný bod pre racionálny vývoj liečiv pre poskytnutie ligandov, terapeutických liečiv, alebo iných typov malých chemických molekúl. Alternatívne, malé molekuly alebo iné zlúčeniny identifikované vyššie popísanými vyšetrovacími testami môžu slúžiť ako "vedúce zlúčeniny" v racionálnom vývoji liečiv.

Jednotlivé popísané nukleotidové a aminokyselinové sekvencie podľa predkladaného vynálezu sú oznamované SEQ ID NO:1 - 25. Okrem toho v zmysle Budapeštianskej zmluvy, biologické depozitá jednotlivých sekvencií nukleových kyselín tu opísaných môžu byť označené ATCC (Rockville, MD). Tieto depozitá zahŕňujú prírastkové číslo 97124 (uložené 28.5.1995), prírastkové číslo 97214 (uložené 28.6.1995), a prírastkové číslo 97428 (uložené 26.1.1996).

Popis obrázkov na priložených výkresoch

Obrázok 1: Tento obrázok je reprezentáciou štruktúrálnej organizácie hPS1 genómovej DNA. Nekódujúce exóny sú znázornené vybodkovanými rámcami. Kódujúce exóny sú znázornené prázdnyimi rámcami alebo šrafovanými rámcami pre alternatívne pripojené sekvencie. Restrikčné miesta sú : B = BamHI, E = EcoRI, H = Hind III, N = Not I, P = PstI, V = PvuII, X = XbaI. Prerušenie v horizontálnej línii medzi restrikčnými miestami reprezentujú nedefinované genómové sekvencie. Klonované genómové fragmenty obsahujúce každý exon sú znázornené obojstrannými horizontálnymi šípkami. Veľkosť genómových subklonov a prírastkové čísla pre každú genómovú sekvenciu sú taktiež dané.

Obrázok 2: Tento obrázok reprezentuje hydropatický graf putatívneho PS1 proteínu. Graf bol kalkulovaný podľa metódy Kyte a Doolittle (1982).

Obrázok 3: Tento obrázok prezentuje zoradenie sekvencie proteínových sekvencií hPS1 a mPS1 proteínu. Vertikálne čiary ukazujú identické aminokyseliny.

Obrázok 4: Tento obrázok prezentuje zoradenie sekvencie proteínových sekvencií hPS1 a hPS2 proteínu. Vertikálne čiary ukazujú identické aminokyseliny.

Obrázok 5 : Tento obrázok je schematické znázornenie predpokladanej štruktúry PS1 proteínu. Rímske číslice ukazujú transmembránové domény. Putatívne glykosylačné miesta sú znázornené hviezdikou a väčšina fosforylačných miest je umiestnených na rovnakej strane membrány ako dve acidické hydrofilné slučky. MAP kinasa miesto je prítomné na zvyšku 115 a PKC miesto je na zvyšku 114. FAD mutačné miesta sú ukázané horizontálnymi šípkami.

Obrázok 6: Tento obrázok je schematické znázornenie predpokladanej štruktúry PS2 proteínu. Rímske číslice ukazujú transmembránové domény. Putatívne glykosylačné miesta sú znázornené hviezdikou a väčšinou fosforylačných miest je umiestnených na rovnakej strane membrány ako dve acidické hydrofilné slučky. FAD mutačné miesta sú znázornené horizontálnymi šípkami.

I. Definícia

Pre uľahčenie preskúmania rôznych uskutočnení predkadaného vynálezu a pre pochopenie rôznych elementov a zložiek použitých v tvorbe a použití vynálezu sú poskytnuté nasledujúce definície pre jednotlivé termíny použité v opise a pripojených nárokoch.

Presenilín: Ako je tu použité bez ďalšej modifikácie, znamená termín "presenilín" alebo "presenilíny" presenilín-1 (PS1) a/alebo presenilín-2 (PS2) gény/proteíny. Jednotlivo, nemodifikovaný termín "presenilín" alebo "presenilíny" označuje cicavčí PS1 a/alebo PS2 gény/proteíny a preferovane ľudské PS1 a/alebo PS2 gény/proteíny.

Presenilín-1 gén: Ako je tu použité, znamená termín "presenilín-1 gén" alebo "PS1 gén" cicavčí gén prvý krát skôr objavený a opísaný v U.S.prihláške sériové č.08/431048 podanej 28.5.1995 a neskôr opísanej Sherringtonom et al (1995), vrátane alelických variant a heterošpecifických cicavčích homológov. Jedna ľudská presenilín-1 (hPS1) c DNA sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO:1. Iná ľudská c DNA sekvencia, vzišlá z alternatívneho zostrihnutia hPS1 mRNA transkriptu je tu opísaná ako SEQ ID NO: 3. Okrem ľudských zostrihnutých variánt, ako je opísané nižšie, bolo taktiež nájdené, v ktorom regióne kódujúcom tridsať tri zvyškov môže byť zostrihaná v nejakom transkripte. cDNA myšieho homógu (mPS1) je opísaná ako SEQ ID NO: 16. Termín "presenilín-1 gén" alebo "PS1 gén" sa primárne dotýka kódujúcej sekvencie, ale môže taktiež zahrňovať niektoré alebo všetky susedné regulačné regióny a/alebo intróny. Termín PS1 gén špecificky zahrňuje arteficiálne alebo rekombinantné gény vytvorené z cDNA alebo genómovej DNA, vrátane rekombinantných génov založených na zostrihaných variantách. Presenilín - 1 gén bol taktiež označovaný ako S182 gén (napr. Sherrington et.al.,1995) alebo ako Alzheimer Related Membrane Protein (ARMP) gén (napr. U.S. prihlášky sériové č.08/431048 podanej 28.5.1995).

Presenilín-1 protein: Ako je tu použité, znamená termín "presenilín-1 proteín" alebo "PS1 protein" proteín kódovaný PS1 génom, vrátane alelických variant a heterošpecifických cicavčích homológov. Jedna ľudská presenilín-1 (PS1) proteinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO:2. Iná ľudská proteinová sekvencia, vzišlá z alternatívneho zostrihania hPS1 mRNA transkriptu, je tu popísaná ako SEQ ID NO: 4. Okrem ľudských zostrihaných variantov, ako je popísané nižšie, bolo taktiež nájdené, ktorý región obsahujúci tridsať tri zvyškov môže byť zostrihaný v nejakom transkripte. Tieto varianty taktiež spadajú do termínu presenilín - 1 proteín ako je tu použitý. Proteinová sekvencia myšieho homógu (mPS1) je popísaná ako SEQ ID NO: 17. Proteín môže byť produkovaný rekombinantnými bunkami alebo organizmami, môže byť podstatne purifikovaný z prirodzených tkanív alebo bunčných línií alebo môže byť syntetizovaný chemicky alebo enzymaticky. Preto termín "presenilín - 1 proteín" alebo "PS1 proteín" zahrňuje proteín v glykosolovanej, čiastočne glykosylovanej alebo neglykosylovanej forme, rovnako ako fosforylovanou, čiastočne

fosforylovanou, nefosforylovanou, sulfatovanou, čiastočne sulfatovanou alebo nesulfatovanou formou. Termín taktiež zahrňuje alelické varianty a iné funkčné ekvivalenty PS1 aminokyselinovej sekvencie, vrátane biologicky aktívnych alebo iných fragmentov. Tento proteín bol tiež označovaný ako S182 proteín (napr. Sherrington et al., 1995) alebo ako Alzheimer Related Membrane Protein (ARMP) (napr. U.S. prihláška poradové č. 08/431048 podaná 28.5.1995).

hPS1 gén a/alebo proteín. Ako je tu použité, znamená skratka "hPS1" ľudského homológneho alebo alelického variantu PS1 génu a/alebo proteínu. Dve cDNA sekvencie ľudského PS1 génu sú tu uvedené ako SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3. Korešpondujúce hPS1 proteínovej sekvencie sú tu opísané ako SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Mnoho alelických variantov, vrátane poškodzujúcich mutantov, je popísaných a daných v opise, ktorý nasleduje.

mPS1 gén alebo proteín. Ako je tu použité, znamená skratka "mPS1" myšie homológny a myšie alelický variant PS1 génu a/alebo proteínu. cDNA sekvencia jedného myšieho PS1 génu je tu uvedená ako SEQ ID NO: 16. Korešpondujúca mPS1 proteínová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 17. Alelické varianty, vrátane poškodzujúcich mutantov, sú opísané a dané k popisu, ktorý nasleduje.

Presenilín-2 gén: Ako je tu použité, znamená termín "presenilín-2 gén" alebo "PS2 gén" cicavčí gén prvý raz objavený a opísaný v U.S. prihláške sériové č. 08/496841 podanej 28.6.1995 a neskôršie popísaný Rogaevom et al (1995) a Levy-Lahadom et al. (1995), vrátane alelických variantov a heterospecifických cicavčích homológov. Jeden ľudský presenilín-2 (hPS2) cDNA sekvencie je tu popísaný ako SEQ ID NO: 18. Pri ďalších ľudských zostrihaných variantoch, ako sú opísané nižšie, bolo tiež nájdené, v ktorom jednom kodóne alebo regióne kódujúcim tridsaťtri zvyškov môže byť zostrihaná v nejakom transkripte. Termín "presenilín-2 gén" alebo "PS2 gén" sa primárne dotýka kódujúcej sekvencie, ale môže tiež zahrňovať niektoré alebo všetky susedné regulačné regióny alebo intróny. Termín PS2 gén špecificky zahrňuje artefciálne rekombinantné gény vytvorené z cDNA alebo génomovej DNA,

vrátane rekombinantných génov založených na zostrihaných variantoch. Presenilín - 2 gén bol taktiež označovaný ako E5-1 gén (napr. Rogaev et. al., (1995), U.S. prihláška sériové č.08/496841 podaná 28.2.1995) alebo STM2 gén napr. Levy-Lahad et.al.,(1995)).

Prsenilín-2 proteín: Ako je to použité tu, znamená termín "presenilín-2 proteín" alebo "PS2 proteín" proteín kódovaný PS2 génom, vrátane alelických variantov a heterošpecifických cicavčích homológov. Jedna ľudská presenilín-2 (hPS2) proteinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 19. Pri ďalších ľudských zostrihaných variantoch, ako sú opísané nižšie, bolo taktiež nájdené, v ktorom jednom zvyšku alebo regióne obsahujúcom tridsať tri zvyškov môže byť zostrihaná v nejakom transkripte. Proteín môže byť produkováný rekombinantnými bunkami alebo organizmami, môže byť podstatne purifikovaný z prirodzených tkanív alebo bunčných línií alebo môže byť syntetizovaný chemicky alebo enzymaticky. Preto termín "presenilín - 2 proteín" alebo "PS2 proteín" zahrňuje proteín v glykosylovanej, čiastočne glykosylovanej alebo v neglykosylovanej forme, rovnako ako fosforylovanú, čiastočne fosforylovanú, nefosforylovanú, sulfatovanú, čiastočne sulfatovanú alebo nesulfatovanú formu. Termín taktiež zahrňuje alelické varianty a iné funkčné ekvivalenty PS1 aminokyselinovej sekvencie, vrátane biologicky aktívnych alebo iných fragmentov. Tento proteín bol tiež označovaný ako E5-1 proteín (napr. Sherington et.al., 1995, U.S. prihláška poradové č.08/496841 podaná 28.6.1995) alebo STM2 proteín (napr. Levy-Lahad et.al.,(1995)).

hPS2 gén a/alebo proteín. Ako je tu použité, znamená skratka, "mPS1" ľudské homológne a ľudské alelické varianty PS2 génu a/alebo proteínu. cDNA sekvencia jedného ľudského PS2 génu je tu uvedená ako SEQ ID NO: 18. Korešpondujúca hPS2 proteinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 19. Veľa alelických variantov, vrátane poškodzujúcich mutantov, je opísaných a daných v opise, ktorý nasleduje.

DmPS gén a/alebo proteín. Ako je tu použité, znamená skratka "mPS1" Drosophila homológne a alelické varianty PS1 a PS2 génu alebo proteínu. Táto definícia je chápaná tak, že zahrňuje polymorfizmus sekvencií nukleových kyselín a aminokyselín, kde

substitúcie, inzercie alebo delecie génu alebo proteínové sekvencie neovplyvňujú základnú funkciu génového produktu. Nukleotidová sekvencia alebo jedna cDNA sekvencia DmPS génu je tu uvedená ako SEQ ID NO: 20 a korešpondujúca aminokyselinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 21. Termín "DmPS gén" sa primárne dotýka kódujúcej sekvencie, ale môže taktiež zahrňovať niektoré alebo všetky susedné regulačné regióny a/alebo intróny.

Normálny: Ako je tu použité s ohľadom na gény znamená termín "normálny" gén, ktorý kóduje normálny proteín. Ako je tu použité s ohľadom na proteíny znamená termín "normálny" proteín, ktorý doprevádza svoju bežnú alebo normálnu fyziologickú rolu a ktorý nie je asociovaný s, alebo nie je príčinou patogénnych stavov. Preto, ako je tu použité, termín "normálny" je v podstate synonymné s obvyklým významom frázy "divokého typu". Pre akýkoľvek daný gén alebo korešpondujúci proteín môže existovať veľa normálnych alelických variantov, kde žiadna z nich nie je asociovaná s vývojom patogénnych stavov. Takéto normálne alelické varianty zahrňujú, ale nie sú obmedzené na, varianty v ktorých jedna alebo viacej substitúcií nukleotidov nevedú ku zmene kódovanej sekvencie aminokyselín.

Mutantný: Ako je tu použité s ohľadom na gény znamená termín "mutantný" gén, ktorý kóduje mutantný proteín. Ako je tu použité s ohľadom na proteíny znamená termín "mutantný" proteín, ktorý neuskutočňuje svoju bežnú alebo normálnu fyziologickú rolu a ktorý je asociovaný s, alebo je príčinou patogénnych stavov. Preto, ako je tu použité, termín "mutantný" je v podstate synonymný s termínmi "disfunkčný", "patogénny", "onemocnenie spôsobujúci" a "poškodzujúci". S ohľadom na presenilínové gény podľa predkladaného vynálezu označuje termín "mutantný" presenilínové gény/proteíny majúce jednu alebo viac nukleotidových/aminokyselinových substitúcií, insercií a/alebo delecií, ktoré typicky vedú k rozvoju príznakov Alzheimerovej choroby a/alebo iných príbuzných dedičných fenotypov (napr. mozgová hemorhagia, mentálna retardácia, schizofrénia, psychóza a depresia), pokiaľ sú exprimované u ľudí. Táto definícia je chápaná tak, že zahrňuje rôzne mutácie, ktoré sa prirodzene vyskytujú, rovnako ako syntetické alebo rekombinantné mutácie

vyvolané ľudským zásahom. Termín "mutantný" ako je aplikovaný na presenilínové gény, nie je mienený tak, aby zahrňoval varianty sekvencie ktoré, vďaka degenerácii genetického kódu, kódujú proteíny identické k normálnym sekvenciám tu opísaným alebo inak uvedeným, ani nie je mienený tak, aby zahrňoval varianty sekvencie ktoré, hoci kódujú rôzne proteíny, kódujú proteíny, ktoré sú funkčne ekvivalentné ku normálnym presenilínovým proteínom.

Funkčný ekvivalent: Ako je tu použité pri opisovaní génových sekvencií a aminokyselinových sekvencií znamená termín "funkčne ekvivalentný" to, že uvedená sekvencia nemusí byť identická s jednotlivou opísanou sekvenciou zoznamu sekvencií, ale poskytuje iba sekvenciu, ktorá účinkuje biologicky alebo chemicky ako ekvivalent opísanej sekvencie.

V podstate čistý: Ako je tu použité s ohľadom na proteíny (vrátane protilátok) alebo iné prípravky znamená termín "v podstate čistý" prípravok, ktorý je aspoň zo 60% hmotnosti (suchej hmotnosti) zložený z požadovanej zlúčeniny. Preferovane je prípravok aspoň z 90% a najlepšie aspoň z 99% hmotnosti zložený z požadovanej zlúčeniny. Čistota môže byť meraná akoukoľvek vhodnou metódou, napr. chromatografiou na kolóne, gelovou elektroforézou alebo HPLC analýzou.

S ohľadom na proteíny, vrátane protilátok, pokiaľ prípravok obsahuje dve alebo viacej požadovaných zlúčenín (napr. dve alebo viacej rôznych protilátok, imunogénov, funkčných domén alebo iných peptidov podľa predkladaného vynálezu) znamená "v podstate čistý" prípravok v ktorom je celková hmotnosť (suchá hmotnosť) všetkých požadovaných zlúčenín aspoň 60% celkovej suchej hmotnosti. Obdobne, pre takéto prípravky obsahujúce dve alebo viacej požadovaných zlúčenín je preferované, aby celková hmotnosť požadovaných zlúčenín bola aspoň 75%, radšej aspoň 90% a najlepšie aspoň 99% hmotnosti celkovej suchej hmotnosti prípravku.

Izolovaná nukleová kyselina: Ako je tu použité, "izolovaná nukleová kyselina" je ribonukleová kyselina, deoxyribonukleová kyselina alebo analóg nukleovej kyseliny obsahujúci polynukleotídovú sekvenciu, ktorá bola izolovaná alebo separovaná

zo sekvencií, ktoré sú bezprostredne susediace (jedna na 5' konci a jedna 3' konci) v prirodzene sa vyskytujúcom genóme organizmu, z ktorého je odvodená. Termín preto zahrňuje napríklad rekombinantnú nukleovú kyselinu, ktorá je inkorporovaná do vektoru, do autonómne sa replikujúceho plazmidu alebo víru alebo do genómovej DNA prokaryotického alebo euryotuického organizmu, alebo ktorá existuje ako separátna molekula (napr. cDNA alebo genomový DNA fragment produkovaný PCR alebo ošetrovaním reštrikčnou endonukleázou) nezávislý na iných sekvenciách. Taktiež zahrňuje rekombinantnú DNA, ktorá je časťou hybridného génu kódujúceho ďalšie peptidové sekvencie a/alebo obsahujúceho exogénne regulačné elementy.

V podstate identické sekvencie: Ako je tu použité je "v podstate identická" aminokyselinová sekvencia, ktorá sa líši iba konzervatívnymi substitúciami aminokyselín, napríklad, substitúciami aminokyselín jednej za druhou rovnakej triedy (napr. valín za prolín, arginín za lysín, atď.) alebo jednou alebo viacerými nekonzervatívnymi substitúciami, deleciami alebo inserciami umiestnenými v takých pozíciách aminokyselínovej sekvencie, kde neničia funkciu proteínu (testované, napr. ako je tu opísané). Preferovane, takáto sekvencia je prinajmenšom z 85%, skôr z 90% a najlepšie z 95% identická na úrovni aminokyselín so sekvenciou proteínu alebo peptidu s ktorým je porovnávaná. Pre nukleové kyseliny, dĺžka porovnania sekvencií bude aspoň 50 nukleotidov, radšej aspoň 60 nukleotidov, ešte lepšie aspoň 75 nukleotidov a najlepšie aspoň 110 nukleotidov. " V podstate identická" sekvencia nukleových kyselín kóduje v podstate identickú aminokyselinovú sekvenciu ako bola definovaná vyššie.

Transformované bunky: Ako je tu použité, " transformovaná bunka" je bunka do ktorej (alebo do jej predka) bola zavedená, prostriedkami rekombinantnej DNA techniky, požadovaná molekula nukleovej kyseliny. Požadovaná nukleová kyselina bude typicky kódovať peptid alebo proteín. Transformovaná bunka môže exprimovať požadovanú sekvenciu alebo môže byť použitá pre propagáciu sekvencie. Termín "transformovaná" môže tu byť použitý pre obsiahnutie akékoľvek metódy pre zavedenie exogénnej nukleovej kyseliny vrátane, ale nielen, transformácie, transfekcie, elektroporácie, mikroinjekcie, vírom

sprostredkovanej transfekcie a podobne.

Operatívne spojené: Ako je tu použité, o kódujúcich sekvenciách a regulačných regionoch je povedané, že sú "operatívne spojené", pokiaľ sú kovalentne viazané takým spôsobom, že umiestňujú expresiu alebo transkripciu kódujúcej sekvencie pod vplyv alebo kontrolu regulačného regiónu. Pokiaľ je požadované, aby kódujúce sekvencie boli translatované do funkčného proteínu, potom pri dvoch sekvenciách je povedané, že sú operatívne spojené, pokiaľ indukcia funkcie promotora vedie ku stranskripci kódujúcej sekvencie a pokiaľ charakter väzby medzi dvomi DNA sekvenciami 1) nevedie k mutácii posunu rámčeka, 2) neinterferuje sa schopnosťou regulačného regiónu riadiť transkripciu kódujúcich sekvencií, alebo 3) neinterferuje sa schopnosťou korešpondujúceho RNA transkriptu byť translatovaný na proteín. Tak, regulačný región môže byť operatívne spojený s kódujúcou sekvenciou, pokiaľ je regulačný region schopný spôsobiť transkripciu tejto DNA sekvencie, tak že vzniknutý transkript môže byť translatovaný do požadovaného proteínu alebo polypeptidu.

Prísne hybridizačné podmienky: Prísne hybridizačné podmienky je termín v odbore používaný a odborníkom známy. Pre akúkoľvek danú sekvenciu nukleových kyselín sú prísne hybridizačné podmienky podmienky teploty, chaotrofnej kyseliny, pufrov, a iontové sily, ktoré umožňujú hybridizáciu tejto sekvencie nukleových kyselín na ich komplementárnu sekvenciu a nie na podstatne odlišnú sekvenciu. Presné podmienky, ktoré tvoria "prísne" podmienky, závisia od charakteru sekvencie nukleových kyselín, dĺžky sekvencie a frekvencii výskytu podsád tejto sekvencie v iných neidentických sekvenciách. Odlišnosti hybridizačných podmienok od hladiny prísnosti v ktorej sa vyskytuje nešpecifická hybridizácia do hladiny, pri ktorej pozorovaná iba špecifická hybridizácia môže odborník v odbore určiť bez zbytočného experimentovania podmienky, ktoré umožnia hybridizáciu danej sekvencie iba s komplementárnou sekvenciou. Vhodné rozsahy takýchto podmienok prísnosti sú opísané v Krause and Aaronson (1991).

Hybridizačné podmienky v závislosti na dĺžke a bežnosti sekvencie môžu zahrňovať teploty od 20°C - 65°C a iontovú silu od 5x do 0,1x SSC. Vysoko prísne podmienky hybridizácie môžu zahrňovať teploty nižšie ako 40°C - 42°C (pokiaľ sú obsiahnuté denaturanty

ako je formamid) až vyššie ako 60 - 65°C v iontovej sile nižšej ako 0,1 x SSC. Tieto rozsahy sú viacmenej iba ilustratívne a v závislosti na charaktere cieľovej sekvencie a možného budúceho vývoja technicky môžu byť prísnejšie ako je nevyhnutné. Menej ako prísne podmienky sú využité pre izoláciu sekvencie nukleových kyselín, ktoré sú v podstate zhodné, alelické alebo homológne k akejkoľvek danej sekvencii.

Selektívne sa viaže: Ako je to použité s ohľadom na protilátky, o protilátke je povedané, že sa "selektívne viaže" na cieľ, pokiaľ protilátka rozpoznáva a viaže sa na požadovaný cieľ, ale v podstate nerozpoznáva ani sa neviaže na iné molekuly vo vzorke, napr. v biologickej vzorke, ktorá obsahuje požadovaný cieľ.

II. Presenilíny.

Predkladaný vynález je čiastočne založený na objave rodiny cicavčích génov, ktoré, pokiaľ sú mutované, sú asociované s vývojom Alzheimerovej choroby. Objav týchto génov, označených presenilín-1 a presenilín-2, rovnako ako charakterizácia týchto génov, ich proteínových produktov, mutantov a možných účinkov je opísaný nižšie. Homológy presenilínov pri bezstavovcoch sú tu taktiež uvedené, pretože môžu vniesť svetlo do účinkov presenilínov a ďalej môžu byť užitočné v rôznych vyhotoveniach, ktoré sú opísané nižšie.

1. Izolácia ľudského génu presenilínu-1

A. Genetické mapovanie AD3 regionu

Počiatočná izolácia a charakterizácia PS1 génu, potom opisovaného ako AD3 gén alebo S182 gén, bola opísaná v Sherrington et.al.(1995). Po začiatočnom regionálnom mapovaní AD3 génového lokusu na 14q24.3 blízko anonymných mikrosatelitných markerov D14S43 a D14S53 (Schellenberg et.al.,1992, St. George-Hyslop et.al.,1992, Van Breckoven et.al.1992) bolo dvadsať jeden rodokmeňov použitých pre segregáciu AD ako putatívneho autosomálne dominantného rysu (St.George-Hyslop et.al.,1992) a pre skúmanie segregácie 18 ďalších genetických markerov z 14q24.3

regionu, ktoré boli organizované do vysokodensitných máp genetických väzieb (Weissenbach et.al.,1992,Gyapay et.al.,1994). Skôr publikované maxima prevdepodobnostnej analýzy potvrdili základný kumulatívny dôkaz pre väzbu medzi familiárnou Alzheimerovou chorobou (FAD) a všetkými týmito markermi. Avšak veľa genetických dát podporujúcich väzbu na tieto markery bolo odvodených od šiestich rodokmeňov so skorým nástupom, FAD1 (Nee et.al.,1983),FAD2 (Frommelt et.al.,1991), FAD3 (Goudsmith et.al.,1981,Polenn,1993), Fad4 (Foncin et.al.,1985), TOR1.1 (Bergamini,1991) a 603 (pericak-vance et.al.,1988),kde každý z nich poskytuje aspoň jeden anonymný genetický marker z 14q24.3 (St. George-Hyslop et.al.,1992).

Pre presnejšie definovanie umiestnenia AD3 génu vo vzťahu k známym umiestneniam genetických markerov z 14q24.3 boli rekombinačné orientačné body vyhľadávané priamo inšpekciou dát zo surových haplotypov z tých genotypovaných postihnutých členov šiestich rodokmeňov, ktorí vykazovali definitívnu väzbu na chromozóm 14. Táto selektívna stratégia v tomto určitom prípade nevyhnutne ruší dáta z rekonštruovaných genotypov zosnulých postihnutých členov rovnako ako od starých asymptomatických členov veľkých rodokmeňov a neberie do úvahy malé rodokmene neistého stavu väzby. Viacmenej táto stratégia je veľmi dôkladná, pretože vylučuje získanie potenciálne zavádzajúcich dát genotypov získaných buď vďaka chybám v rekonštruovaných genotypoch zosnulých postihnutých členov vzniknutých vzniknutých z nepaternity alebo chýb vzoriek, alebo z použitia neviazaných rodokmeňov.

Po prehliadke dát haplotypov od postihnutých subjektov boli pri členoch šiestich veľkých rodokmeňov, ktorých genotypy boli priamo určené, zistené obligátne rekombinácie v D14S48 a D14S53, a v D14S258 a D14S63. Jedna rekombinácia v D14S253, ktorá znázorňuje telomerickú väzbu na FAD región sa vyskytla u rovnakého AD postihnutého jedinca FAD1 rodokmeňa, ktorý bol skôr opísaný ako rekombinantný v niekoľkých iných markeroch umiestnených telomericky do D14S53, vrátane D14S48 (St.George-Hyslop et.al.,1992). Oproti tomu, jedna rekombinacia v D14S258, ktorá označuje centromerickú väzbu FAD regionu, sa vyskytla pri postihnutom člene FAD3 rodokmeňa, ktorý bol taktiež

rekombinantný v niekoľkých iných markeroch centromerických k D14S258 vrátane D14S63. Obidva rekombinantné subjekty mali nesporný dôkaz Alzheimerovej choroby potvrdený štandardnými klinickými testami pre ochorenie u iných postihnutých členoch ich rodín a genotyp obidvoch rekombinantných subjektov bol informatívny a kosegregujúci v mnohých lokusoch v intervale centromerickom k D14S53 a telomerickom k D14S258.

Pokiaľ boli analýzy haplotypov rozšírené tak, aby zahrňovali rekonštruované genotypy zosnulých postihnutých členov šiestich veľkých rodokmeňov rovnako ako dáta zo zostávajúcich pätnástich rodokmeňov s pravdepodobnosťou väzby menšou ako 0,95, potom bolo detektovaných niekoľko ďalších rekombinantov v jednom alebo vo viacerých markerových lokusoch v intervale medzi D14S53 a D14S58. Tak jeden ďalší rekombinant bol detektovaný rekonštruovaním genotypov zosnulých postihnutých členov každého z troch veľkých FAD rodokmeňov (FAD1, FAF2 a iných príbuzných rodín) a osem ďalších rekombinantov bolo detektovaných pri postihnutých členoch piatich menších FAD rodokmeňov. Avšak, pretože niektoré z týchto rekombinantov môžu byť správne umiestnené AD3 gén v lepšie definovanom cieľovom regióne, bolo nevyhnutné považovať tieto potenciálne tesnejšie "vnútorné rekombinanty" za nedôveryhodné nielen z dôvodov uvedených vyššie, ale taktiež preto, že poskytujú vzájomne nezlučiteľné umiestnenie pre AD3 gén v D14S53-D14S258 intervale.

B. Konštrukcia fyzikálneho susediaceho ("contig") preklenujúceho AD3 regiónu.

Ako začiatočný krok pre klonovanie AD3 génu bol konštruovaný spoj presahujúcich genómových DNA fragmentov klonovaných do kvasinkových arteficiálnych chromosomových vektorov, fágových arteficiálnych chromozómových vektorov a kosmidových vektorov. Štúdie FISS mapovania pomocou použitia kosmidov odvodených od YAC klonov 932c7 a 964f5 naznačili, že interval najpravdepodobnejšie nesúci AD3 gén bol veľkosti najmenej päť megabáz. Pretože veľká veľkosť tohoto minimálneho kosegregačného regiónu tvorí pozitívnu klonováciu stratégiu neriešiteľnou, boli hľadané iné genetické vyhľadávače, ktoré boli zamerané na umiestnenie AD3 regiónu do

jedného alebo viacej podregionov v intervale vymedzenom D14S53 a D14S258. Haplotypové analýzy markerov medzi D14S53 a D14S258 zlyhali pre detekciu štatisticky signifikantného dôkazu pre nerovnováhu väzby a/alebo alelickú asociáciu medzi FAD rysom a alelami v akýchkoľvek z týchto markerov, nezávisle na tom, či analýza bola zostrihovaná na rodokmene s formami častého nástupu FAD, alebo generalizovaná na všetky rodokmene. Tento výsledok nebol neočakávane daný rôznymi etnickými pôvodmi našich rodokmeňov. Nemenej, pokiaľ boli rodokmene podobného etnického pôvodu porovnávané, potom priama inšpekcia haplotypov pozorovaných na chorobu nesúcom chromozóme segregujúcim v rôznych rodokmeňoch rovnakého etnického pôvodu odhalila dve zoskupenia markerových lokusov. Prvé z týchto zoskupení umiestnených centromericky k D14S77 (D14S786, D14S277 a D14S268) a prekleňujúci 0,95 Mb fyzikálny interval obsiahnutý v YAC 78842. Druhé z týchto zoskupení bolo umiestnené telomericky k D14S77 (D14S43, D14S273 a D14S76) a preklenovalo asi 1Mb fyzikálny interval obsiahnutý v presahujúcich YAC klonoch 964c2, 74163, 797d11 a časti 854f76. Identické alely boli pozorované v aspoň dvoch rodokmeňoch rovnakého etnického pôvodu. Ako časť tejto stratégie bolo usúdené, že prítomnosť zúčastňujúcich sa alel v jednej z týchto skupín fyzikálne zoskupených markerových lokusov môže odrážať ko-dedičnosť malých fyzikálnych regiónov obklopujúcich PS1 gén na jedinečne nájdenom chromozóme v každej etnickej populácii. Signifikantne, každý z týchto zúčastňujúcich sa rozšírených haplotypov bol vzácny v normálnej Kaukazskej populácii a tieto alely neboli pozorované v iných skupinách markerov prekenujúcich rovnaké genetické intervaly kdekoľvek na chromozóme 14q24.3.

C. Transkripčné mapovanie a analýza kandidátov na gény

Na izolovanie exprivovaných sekvencií kódovaných medzi obidvomi kritickým intervalmi bola použitá priama selekčná stratégia vyžadujúca imobilizovanú, klonovanú, ľudskú genómovú DNA ako hybridizačný cieľ na znovuzískanie transkribovaných sekvencií z primárnych komplementárnych poolov DNA odvodených od ľudskej mozgovej mRNA (Rommens et al., 1993). Približne 900 putatívnych DNA fragmentov veľkosti 100 až 600 párov báz bolo získaných z týchto regiónov. Tieto fragmenty boli hybridizované na Souther bloty obsahujúce genómové DNA od ľudí a od iných cicavcov. Táto

identifikovaná podsada 151 klonov, ktoré vykazovali dôkazy pre evolučnú konzerváciu a/alebo pre komplexnú štruktúru, čo naznačovalo, že boli odvodené od zostrihnutej DNA. Klony v tejto podsade boli triedené na základe fyzického mapového umiestnenia, zkríženej hybridizácie a sekvencie nukleotidov a boli použité na vyšetrovanie konvenčných ľudských mozgových cDNA knižníc na dlhšie cDNA. Bolo izolovaných aspoň 19 nezávislých cDNA klonov dĺžky väčšej než 1 kb a boli potom zoradené do čiastočnej transkripčnej mapy AD3 regiónu. Len tri z týchto transkriptov korešpondovali so známymi charakterizovanými génami (cFOS, dihydrolipoamid sukcinyl transferasa a väzobný proteín 2 na latentný transformujúci rastový faktor).

D. Získanie kandidátov na gény

Každá z častí otvoreného čítacieho rámčeku kandidátových génov bola získaná RT-PCR z mRNA izolovanej z mŕtveho mozgového tkaniva od normálnych kontrolných subjektov a od buď mŕtveho mozgového tkaniva alebo kultivovaných fibroblastových línií postihnutých členov šiestich rodokmeňov definitívne viazaných na chromozóm 14. RT-PCR produktov boli potom vyšetrované na rozdiely v sekvencii pri použití chemického štiepenia a metódou vyhľadávania restriktívnymi endonukleázami konformačného polymorfizmu jednoretazcovej sekvencie (Saleeba and Cotton, 1993; Liu and Sommer, 1995) a priameho sekvencovania nukleotidov. S jednou výnimkou, všetky z vyšetrovaných génov, aj keď nie požadovaných, neobsahovali aterácie v sekvenciách, ktoré boli jedinečné u postihnutých subjektov alebo kosegregovali s onemocnením. Jednou výnimkou bol kandidátový gén reprezentovaný klonom S182, ktorý obsahoval sériu nukleotidových zmien, ktoré neboli pozorované u normálnych subjektov a o ktorých sa predpokladalo, že alternujú aminokyselinovú sekvenciu u postihnutých subjektov. Gén korešpondujúci tomuto klonu bol teraz označený ako preselinin-1 (PS1). Dve PS1 sekvencie, reprezentujúce alternatívne zostrihnuté varianty opísané nižšie, sú tu opísané ako SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3. Korešpondujúce predpokladané aminokyselinové sekvencie sú opísané ako SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Bluescript plasmidy nesúci klony týchto cDNA boli deponované v ATCC, Rockville, Md., pod ATCC prírastkovými číslami 97124 a 97508 28.5.1995. Sekvencia korešpondujúca SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2 boli tiež deponované v

GenBank databasy a môžu tu byť získané pod prírastkovým číslom 42110.

2. Izolácia génu pre myšiu presenilin-1

Myšiu homológ (mPS1) ľudského PS1 génu bol získaný vyšetrením myšej cDNA knižnice označenou ľudskou cDNA próbou z hPS1 génu. Týmto spôsobom bol získaný 2 kb čiastočný transkript (reprezentujúci 3' koniec génu) a niekoľko RT-PCR produktov reprezentujúcich 5' koniec. Sekvencovanie konsenzuálneho cDNA transkriptu myšieho homólogu odhalilo významnú aminokyselinovú identitu s hPS1. Významné je, ako je opísané nižšie, že všetky aminokyseliny, ktoré boli mutované v FAD rodokmeňoch boli konzervované medzi myším homológom a normálnym ľudským variantom. Táto konzervácia PS1 génu ukazuje, že ortológny gén existuje u myší (mPS1) a že je teraz možné klonovať iné homológy cicavcov alebo ortológy vyšetrovaním genómových alebo cDNA knižníc pri použití ľudských PS1 prób. Tak, podobný prístup umožní identifikáciu a charakterizáciu PS1 génu u iných druhov. Sekvencia nukleovej kyseliny mPS1 je tu opísaná ako SEQ ID NO: 16 a korešpondujúca aminokyselinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 17. Obe sekvencie boli deponované v GenBank databasy a môžu tu byť získané pod prírastkovým číslom 42177.

3. Izolácia génu pre ľudský presenilin-2.

Druhý ľudský gén, teraz označený presenilin-2 (PS2) bol izolovaný a bolo ukázané, že má významnú nukleotidovú a aminokyselinovú homológiu s PS1 génom. Prvá izolácia tohto génu je detailne opísaná v Rogaev et al., (1995). Izolácia ľudského PS2 génu (tiež označovaného ako "STM2") takmer rovnakou metódou je tiež opísaná v Levy-Lahad et al. (1995). Stručne, PS2 gén bol identifikovaný za použitia nukleotidovej sekvencie cDNA pre PS1 na prehliadanie databáz pri použití BLASTN vzoru podľa Altschul et al. (1990). Boli lokalizované tri vybrané miesta exprimovanej sekvencie, identifikovanej prírastkovým číslom T03769, R14600 a R05907, ktorá mala významnú homológiu ($p < 1,0 \cdot 10^{-100}$, viac než 97% identita v aspoň 100 susedných pároch bází).

Z týchto sekvencií boli produkované oligonukleotidové priméry a boli použité na generovanie PCR produktov reverznej

transkriptasovú PCR (RT-PCR). Tieto krátke RT-PCR produkty boli čiastočne sekventované na potvrdenie ich identity so sekvenciami v databáze a potom boli použité ako hybridizačné próby na vyšetrenie kompletných cDNA knižníc. Niekoľko rôznych cDNA v rozsahu od 1 kb do 2,3 kb bolo získaných z cDNA knižnice nádorovej bunky (Caco2) a z ľudskej mozgovej cDNA knižnice (E5-1, G1-1, cc54, cc32). Nukleotidová sekvencia týchto klonov potvrdila, že boli všetky generované z rovnakého transkriptu.

Gén kódujúci transkript, PS2 gén, bol mapovaný na ľudský chromozóm 1 pri použití hybridných mapovacích panelov k dvom zoskupeniam CEPH Mega YAC klonov, ktoré boli umiestnené podľa fyzikálnej susediacej ("conting") mapy (YAC klony 750g7, 921d12 mapovaný 1q41; a YAC klon 787g12 mapovaný na 1p36.1-p35). Sekvencia nukleových kyselín hPS2 klonu je tu opísaná ako SEQ ID NO: 18 a korešpondujúca aminokyselinová sekvencia je tu opísaná ako SEQ ID NO: 19. Obe skvencie boli deponované v GenBank databasy a môžu tu byť získané pod prírastkovým číslom L44577. DNA sekvencie hPS2 klonu bola tiež vložená do vektoru a deponovaná v ATCC, Rockville, MD pod prírastkovým číslom 97214 28.6.1995.

4. Identifikácia homológov pri *C. elegans* a *D. melanogaster*

A. SPE-4 *C. elegans*

Porovnanie sekvencie nukleových kyselín a predpokladanej aminokyselinovej sekvencie PS1 s dostupnou databázou pri použití BLAST typu zoradenia ukázalo strednú podobnosť s *C. elegans* spermatickým integrálnym membránovým proteínom SPE-40 ($P = 1,5e^{-25}$, 24 - 37% identita v troch skupinách aspoň päťdesiatich zostatkov) a slabšia podobnosť s časťami iných, membránu preklenujúcich proteínov vrátane cicavčieho chromogranínu A a alfa podjednotky cicavčieho napäťovo závislého kalciového kanálu (Altschul et al., 1990). Podobnosti aminokyselinovej sekvencie v putatívnych transmembránových doménach môžu príležitostne dávať zostavenie, ktoré jednoducho vzniká z obmedzeného počtu hydrofóbných amnokyselín, ale existuje tu tiež rozšírené zostavenie aminokyselín medzi PS1 a SPE-4 v niekoľkých hydrofilných doménach. Obidva putatívne PS1 proteín a SPE-4 sú predpokladane porovnateľnej veľkosti (467 a 465 zostatkov, v príslušnom poradí) a, ako je podrobnejšie opísané nižšie, obsahujú aspoň sedem transmembránových domén s

veľkou acidickou doménou predchádzajúcej konečnej transmembránovej doméne. PS1 proteín nemá veľký predpokladaný hydrofilný región na N konci.

Analýza BLASTP zostavenia tiež detekovala významnú homológiu medzi PS2 a *C. elegans* SPE-4 proteínom ($P = 3,5 \cdot 10^{-26}$ 20-63% identita v piatich doménach aspoň 22 zostatkov), a slabšiu homológiu k mozgovým sodíkovým kanálom (alfa III podjednotka) a alfa podjednotke napäťovo dependentných kalciových kanálov z rôznych druhov ($P = 0.02$, 20 - 28% identita v dvoch alebo viacerých doménach každá s aspoň 35 zostatkami) (Altschul, 1990). Tieto zostavenia sú rovnaké ako tie, ktoré boli opísané vyššie pre PS1 gén.

B. Sel - 12 *C. elegans*

Pri 461 zostatkoch Sel - 12 proteínu od *C. elegans* a S182 (SEQ ID NO:2) bolo zistené, že majú 48% identitu sekvencie v 460 aminokyselinách (Levitan and Greenwald, 1995). O SEL-12 proteíne sa tiež usudzuje, že má mnoho transmembránových domén. Sel-12 gén (prírastkové číslo U35660) bol identifikovaný vyšetrením na supresory lin-12 "gain of function" (nadobudnutie funkcie) mutácie a bol klonovaný transformačnou záchranou (Levitan and Greenwald, 1995).

C. DmPS D. melanogaster

Renundantné oligonukleotidy kódujúce vysoko konzervované regióny presenilin/sel 12 proteínov boli pripravené a použité na identifikáciu relevantných mRNA z dospelých a embryonálnych *D. melanogaster*. Tieto mRNA boli sekvencované a ukázalo sa, že obsahujú otvorený čítací rámček s putatívnou aminokyselinovou sekvenciou vysoko homológiou k sekvencii ľudských presenilínov. DmPS cDNA je identifikovaná ako SEQ ID NO: 20.

Táto sekvencia kóduje polypeptid o 541 aminokyselinách (SEQ ID NO: 21) s asi 52% identitou k ľudským presenilínom.

Štruktúra *D. melanogaster* homólu je podobná štruktúre ľudských presenilínov s aspoň siedmymi putatívnymi transmembrá-

novými doménami (Kyte-Doolittle analýzy hydrofobicity pri použití okna 15 a hranice 1,5). Dôkaz aspoň jednej alternatívne zostrihnutej formy bol detekovaný v klone pds13 obsahujúcom ORF s 541 aminokyselinami, pokým klony pds7, pds14 a pds1 neobsahovali uzatvárajúce nukleotidy 1300 - 1341. Toto alternatívne zostrihnutie vedie k alternácii Gly na Ala v zostatku 384 v putatívnej TM6->7 sľučke a k fúzii v rámčeku ku Glu zostatku v kodóne 399 dlhšieho ORF. Zásadné rozdiely v aminokyselinovej sekvencii *D. melanogaster* a ľudských génov boli v N terminálnej acidickéj hydrofilnej doméne a v acidickéj hydrofilnej časti TM6->7 sľučky. Pozostatky obklopujúce TM6->7 sľučku sú najmä konzervované (pozostatky 220 - 313 a 451 - 524), čo naznačuje, že tieto sú funkčne dôležité domény. Šestnásť z dvadsiatich zostatkov identifikovaných ako mutované v ľudskom PS1 a PS2 a spôsobujúcich ľudský FAD je konzervovaných v *D. melanogaster* homológu.

DNA sekvencia DmPS génu ako bola klonovaná bola vložená do Bluescript plasmidu. Tento stabilný vektor bol deponovaný v ATCC, Rockville, MD, pod ATTC prírastkovým číslom 97428 26.1.1996.

5. Charakterizácia ľudských génov pre presenilíny

A. hPS1 transkripcie a génová štruktúra

Hybridizácia PS1 (182) klonu na norther bloty identifikovala transkript hojne exprivovaný v mnohých oblastiach mozgu a periférne tkanivá ako hlavný asi 2,8 kb transkript (viď. napr. obrázok 2 v Scherrington et al., 1995). PS1 je exprivovaný temer uniformovane vo väčšine regiónoch mozgu a vo väčšine periférnych tkanivách s výnimkou pečene, kde je transkripčia nízka. Aj keď identita 7,5 kb transkriptu je nejasná, dve pozorovania naznačujú, že asi 2,8 kb transkript reprezentuje aktívny produkt génu. Hybridizácia PS1 klonu na northern bloty obsahujúca mRNA z mnohých myších tkanív, vrátane mozgu, identifikovala len jeden transkript identickej veľkosti k asi 2,8 kb ľudskému transkriptu. Všetky dlhšie cDNA klony doposiaľ získané (2,6 - 2,8 kb), ktoré obsahovali ako 5', tak aj 3' UTR a ktoré patrili k 2,8 kb prúžku v northern blote, boli mapované výlučne na rovnaký fyzikálny región chromozómu 14.

Z týchto pokusov môže asi 7,5 kb transkript buď vzácné alternatívne zostrihnutú, alebo polyadenylovanú izoformu asi 2,8 kb transkriptu, alebo môže reprezentovať iný gén s homológiou k PS1. cDNA knižnica Caco2 bunecnej línie, ktorá exprimuje vysoké hladiny ako PS1, tak aj PS2, bola vyšetovaná na dlhé transkripty. Boli získané dva rôzne klony, GL40 a B53. Sekvenčovanie ukázalo, že obidva klony obsahujú podobné 5' UTR a ORF, ktorý bol identický k Orf kratšieho 2,8 kb transkriptu v mozgu.

Obidva klony obsahovali neobvykle dlhý 3' UTR. Tento dlhý 3' UTR reprezentuje použitie alternatívneho polyadenylačného miesta s asi 3 kb ďalej downstream. Tento dlhý 3' UTR obsahoval množstvo motívov nukleotidovej sekvencie, ktoré viedli k palindromom alebo kmeňovo-slučkovým štruktúram. Tieto štruktúry sú asociované s mRNA stabilitou a tiež s translačnou účinnosťou. Užitočnosť tohto pozorovania je v tom, že môže byť možné vytvoriť rekombinantné expresné konštrukty a/alebo transgény, v ktorých je odstránené upstream polyadenylačné miesto, čo posilňuje použitie downstream polyadenylačného miesta a dlhšieho 3' UTR. V určitých prípadoch, toto môže navodiť stabilitu vybraných mRNA druhov, s preferenčnou transláciou, ktorá môže byť využitá na zmenu rovnováhy mutantných versus prirodzených transkriptov v cieľových bunecných líniách, alebo in vivo v mozgu, buď terapiou zárodočných línií alebo použitím vírových vektorov ako sú modifikované herpes simplex virus vektory ako forma génovej terapie.

hPS1 gén sa rozkladá v genomovom intervale aspoň 60 kb v 200 kb PAC1 klonu RPCI-1 54D12 z Roswell Park PAC knižnice a troch prekrývajúcich sa kosmidových klonov 57-H10, 1-G9 a 24-D5 z Los Alamos Chromosome 14 kosmidovej knižnice. Transkripty PS1 génu obsahujú RNA z 13 exonov, ktoré boli identifikované opakovanou hybridizáciou oligonukleotidových a čiastočných cDNA prób na subklonované restričné fragmenty PAC a kosmidových klonov a priamym sekventovaním nukleotidov týchto subklonov. 5' UTR je obsiahnutý v exonoch 1 - 4 s tým, že exony 1 a 2 reprezentujú alternatívne 5' konce transkriptu. ORF je obsiahnutý v exonoch 4 až 13, s alternatívnym spojením, ktoré vedie k absencii časti exonu 4 alebo celého exonu 9. Exon 13 tiež obsahuje 3' UTR.

Pokiaľ nie je inak uvedené, v záujme ujasnenia a stručnosti, všetky odkazy na umiestnenie nukleotidov v hPS1 odvodených nukleotidových sekvencií budú využívať číslovanie báz podľa SEQ ID NO: 1 (L42110), hPS1 cDNA sekvencia začínajúca exonom 1. V tejto cDNA je exon 1 pripojený priamo na exon 3, ktorý je pripojený na exony 4 - 13. V SEQ ID NO: 1 sa exon 1 rozkladá v nukleotidovej pozícii 1 - 113, exon 3 sa rozkladá v pozícii 114 - 195, exon 4 sa rozkladá v pozícii 196 - 335, exon 5 sa rozkladá v pozícii 336 - 586, exon 6 sa rozkladá v pozícii 587 až 728, exon 7 sa rozkladá v pozícii 729 až 796, exon 8 sa rozkladá v pozícii 797 až 1017, exon 9 sa rozkladá v pozícii 1018 až 1116, exon 10 sa rozkladá v pozícii 1117 až 1203, exon 11 sa rozkladá v pozícii 1204 až 1377, exon 12 sa rozkladá v pozícii 1378 až 1496, exon 13 sa rozkladá v pozícii 1497 až 2765. Podobne, pokiaľ nie je uvedené inak, všetky odkazy na umiestnenie aminokyselín v hPS1 odvodených proteinových sekvenciách budú využívať číslovanie zvyšok podľa SEQ ID NO: 2, translačného produktu SEQ ID NO: 1.

Obklopujúce genomové sekvencie boli získané pre exony 1 - 12 a sú prezentované v SEQ ID NO: 5 - 14 (prírastkové čísla L76518 - L76527). Genomová sekvencia 5' z exonu 13 bola tiež určená a je prezentovaná v SEQ ID NO: 15 (prírastkové číslo L76528). SEQ ID NO: 5 - 14 tiež obsahujú kompletne exonové sekvencie. SEQ ID NO: 15, avšak, neobsahuje 3' koniec exonu 13. Genomové sekvencie korešpondujúce exonom 1 a 2 sú umiestnené približne 240 bp od 2,6 kb BamHI-HindIII fragmentu, SEQ ID NO: 5. Exony 3 a 4 (ktoré obsahujú ATG start kodon) sú umiestnené na separátnom 3 kb BamHI fragmente. Kompletná sekvencia intronu 2 medzi BamHI miestom 850 bp downstream od exonu 2 a BamHI miestom 600bp upstream od exonu 3 nebola ešte identifikovaná a nebola ihneď získaná rozšíreným PCR pri použití primérov zo susediacich BamHI miest, čo naznačuje, že intron 2 môže byť väčší.

Analýzy nukleotidovej sekvencie susediacej s exonmi 1 a 2 (SEQ ID NO: 5) odhalili dinukleotidy obsahujúce NotI restriktčné miesto v introne 1. Konsenzuálna sekvencia pre niekoľko putatívnych transkripčných regulačných proteínov obsahujúcich mnohé zoskupenia aktivátor proteínu - 2 (AP-2), signálnych transducerov a aktivátorov transkripcie (STAT3) (Schindler and Darnell, 1995), gamma aktivátorových sekvencií (Gas alebo STAT1),

mnohotný štart miesto element downstream (MED) (Ince and Scotto, 1995) a GC elementy boli prítomné ako v introne 1, tak aj v sekvencii 5' od exonu 1 (viď. SEQ ID NO: 5). Dva putatívne TATA boxy sú prítomné upstream od exonu 1, v bp 925 -933 a 978 - 987 SEQ ID NO: 5, a sú nasledované dvomi putatívnymi transkripčnými iniciačnými (CAP alebo Chambon-Trifonov) konsenzuálnymi sekvenciami v 1002 -1007 bp a 1037 -1043 bp 484 SEQ ID NO: 5. Oproti tomu, sekvencia ihneď upstream od exonu 2 nemá TATA boxy alebo CAP miesta, ale je obohatená v zoskupení CpG ostrovčekoch.

Schématická mapa štrukturálnej organizácie hPS1 génu je prezentovaná na obrázku 1. Nekódujúce exony sú znázornené ako vybodkované rámčeky. Kódujúce exony sú znázornené ako prázdne rámčeky alebo vyšrafované rámčeky pre alternatívne zostrihnuté sekvencie. Reštrikčné miesta sú: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; N = NotI; P = PstI; V = PvuII; X = XbaI. Prerušenie v horizontálnej línii medzi reštrikčnými miestami reprezentujú nedefinované genomové sekvencie. Klonované genomové fragmenty obsahujúce každý exon sú znázornené obojstrannými horizontálnymi šípkami. Veľkosť genomových subklonov a prírastkové čísla pre každú genomovú sekvenciu sú tiež dané.

Pedpoklady DNA sekundárnej štruktúry založenej na sekvencii nukleotidov v 290 upstream exone 1 a v introne 1 odhalili niekoľko palindromov so stabilitou vyššou než 16 kcal/mol. Tieto analýzy sekundárnej štruktúry tiež predpovedali prítomnosť troch stabilných motívov kmeňových slučiek (v bp 1119 - 1129/1214 - 1224; v bp 1387 -1394/1462 - 1469; a v bp 1422 -1429/1508 -1515; všetko v SEQ ID NO: 5) s veľkosťou slučky dostatočnou na obkruženie nukleosomu (asi 76 bp). Takéto kmeňové slučkové štruktúry sú bežnou vlastnosťou génov obsahujúcich TATA (Kollmar and Farnham, 1993).

Súhrn vlastností týchto 5' regiónov je prezentovaný v tabuľke 1. Všetky odkazy na umiestnenie báz sú vo vzťahu k SEQ ID NO: 5. Najdlhší predpokladaný otvorený čítací rámček v SEQ ID NO: 1 kóduje proteín s 467 aminokyselinami, SEQ ID NO: 2. Štart kodon pre tento otvorený čítací rámček e prvej ve-fázy ATG umiestnený downstream od TGA stop kodonu. Nie sú tu klasické konsenzuálne Kozak sekvencie okolo prvých dvoch vo ve-fázy ATG kodonov

(Sherrington et al., 1995). Ako iné gény ktoré nemajú klasické "silné" štart kodony, putatívny 5' UTR ľudských transkriptov je bohaté na GC.

B. Alternatívne transkripcie a zostrih hPS1 5' UTR

Hoci prvé tri exony a časť štvrtého exonu obsahujú netranslanované sekvencie, analýza mnohých kompletných cDNA klonov izolovaných z cDNA knižnice ľudského hippocampu (Stratagene, La Jolla CA) a z bunecnej línie adenokarcinómu čreva (Caco2 od J.Rommens) ukázala, že u väčšiny klonov boli iniciálne sekvencie odvodené od exonu 1 a boli priamo pripojené na exon 3 (prírastkové číslo L42110, SEQ ID NO: 1). Menej často (1 z 9 klonov) boli prvý raz transkribované sekvencie odvodené od exonu 2 a boli pripojené na exon 3 (prírastkové číslo L76517, SEQ ID NO: 3). Priame sekventovanie nukleotidov aspoň 40 nezávislých RT-PCR transkriptov izolovaných pri použití priméru v exone 1 zlyhalo pri identifikácii klonov obsahujúcich ako exon 1, tak aj exon 2. Nakoniec, inšpekcia genómovej sekvencie upstream od exonu 2 neodhalila 3' zostrihávacie miesto sekvencie. Tieto pozorovania argumentujú pre to, že exon 2 je skutočným iniciálnym exonom skôr než alternatívnou zostrihnutou formou transkriptov začínajúcich v exone 1 alebo artefaktom cDNA klonovania. Okrem toho, pretože klon (cc44) obsahujúci exon 2 bol získaný z rovnakej monoklonálnej Caco2 bunecnej línie, je pravdepodobné, že obidva exon 1 obsahujúce transkripty a exon 2 obsahujúce transkripty existujú v rovnakej bunke.

Na testovanie predpokladov o transkripčných iniciačných miestach založených na sekvencii nukleotidov 5' upstream regiónu v blízkosti exonu 1 sme vyšetrovali 5' sekvenciu troch nezávislých "kompletných" cDNA klonov obsahujúcich exon 1 (cc33, cc58 a cc48) a troch sekvencií získaných extenziou primery za použitia antisenzie priméru umiestneného v exone 3. Ďalšia 5' extenzia bola pozorovaná v cDNA G40L, ktorá mapovala najproximálnejší transkripčný štart miesto na pozíciu 1214 bp v genómovej sekvencii obsahujúcej exon 1 SEQ ID NO: 5 (L76518), a ktorá preto korešponduje pozíciu -10 SEQ ID NO: 1. Dva ďalšie klony (cDNA cc48 a 5' RACE produkt č. 5) niesli spoločné štart miesto v pozícii 1259 bp v genómovej sekvencii, SEQ ID NO: 5, čo korešponduje pozíciu 34 v SEQ ID NO: 1. Dve zostávajúce cDNA,

rovnako ako zostávajúce 5' RACE klony, začínali vo viacerých distálnych pozíciách v exone 1. 5' RACE klon č. 8 začínal v pozícii 1224 bp, zhodnej s pozíciou 1 v SEQ ID NO: 1. Žiadny z týchto klonov preto nesiahal k predpokladanému CAP miestu upstream od exonu 1. Vďaka nízkej prevalencii transkriptov obsahujúcich iniciálne sekvencie z exonu 2 neboli podobné štúdie štart miest uskutočnené.

C. Alternatívny zostrih hPS1 ORF

Okrem transkriptov s rôznymi iniciálnymi sekvenciami odhalila analýza mnohých cDNA klonov získaných z rôznych knižníc tiež dve variácie v PS1 transkriptochoch, ktoré narušujú ORF.

Prvá z týchto je absencia 12 nukleotidov z 3' konca exonu 4, nukleotidov 324 až 335 SEQ ID NO: 1. Toto môže vzniknúť zo zostrihu exonu 4 po nukleotide 323 miesto po nukleotide 335. Transkripty vzniknuté z tohto alternatívneho zostrihnutia exonu 4 nekódujú aminokyselinové zvyšky Val26-Arg27-Ser28-Gln29 SEQ ID NO: 2. Transkripty vzniknuté z týchto dvoch alternatívnych zostrihnutí exonu 4 boli detekované v približne rovnakej frekvencii vo všetkých prežívajúcich tkanivách. U týchto doposiaľ vyšetrovaných klonov je zaujímavé, že myšie PS1 transkripty obsahujú len cDNA sekvencie pre Ile26-Arg27-Ser28-Gln29 a že sekvencie pre Val-Arg-Ser-Gln motív je iba čiastočne konzervovaná v ľudskom PS2 ako Arg48-Ser49-Gln50 (Rogaev et al., 1995). Každé z týchto pozorovaní naznačuje, že tieto rozdiely nie sú zásadné pre vlastnú PS1 funkciu.

Druhý variant zostrihu ovplyvňujúci ORF vedie k absencii exonu 9, nukleotidov 1018 až 1116 v SEQ ID NO: 1. Analýza RT-PCR produktov odvodených z mRNA mnohých tkanív ukázala, že mozog (vrátane neokortikálnych oblastí typicky postihnutých AD) a niekoľko iných tkanív (svaly, srdce, pľúca, hrubé črevo) predominantne exprimujú jeden transkript nesúci exon 9. Leukocyty (ale nie lymfoblasty) na druhej strane, tiež exprimujú kratšiu formu ktorej chýba exon 9. O alternatívnom zostrihu exonu 9 sa predpokladá, že mení aspartatový zvyšok v pozícii 257 SEQ ID NO: 2 na alanín, že eliminuje ďalších 33 zvyškov a že vedie k fúzii v rámci na zvyšok proteínu začínajúci threonínom v pozícii 291

kódovaným v exone 10.

D. hPS2 transkripty.

Genómová DNA obsahujúca ľudský hPS2 gén nebola doposiaľ plne charakterizovaná. Avšak, mnoho podobností medzi PS1 a PS2 génami je jasných. Intron/exon väzba obidvoch génov, viacmenej, sa zdá byť veľmi podobná alebo zhodná s výnimkou regiónu TM6->7 slučky.

Hybridizácia PS2 cDNA klonov na Northern Bloty detekovala asi 2,3 kb mRNA prúžkov v mnohých tkanivách, vrátane regiónov mozgu, rovnako ako asi 2,6 kb mRNA prúžok vo svaloch, srdcovom svale a slinivke. PS2 je exprivovaný v nízkej hladine vo väčšine regiónov v mozgu s výnimkou corpus callosum, kde je transkripcia vysoká. Vo svaloch skeletu, srdcovom svale a slinivke je PS2 gén exprivovaný v relatívne vyšších hladinách než v mozgu a ako dva rôzne transkripty 2,3 kb a 2,6 kb. Obidva transkripty majú veľkosť zreteľne odlišnú od 2,7 kb PS1 transkriptu a nehybridizujú zkrížene s PS1 próbami pri vysokej prístnosti. cDNA sekvencie jednej hPS2 alely je identifikovaná SEQ ID NO: 18 (prírastkové číslo: L44577).

Najdlhší ORF v tejto PS2 cDNA konsenzuálnej nukleotidovej sekvencii určuje polypeptid obsahujúci 448 aminokyselín (SEQ ID NO: 19) počítaných od prvého vo fáze ATG kodónu, v pozícii 366 - 368 v SEQ ID NO: 18, ktorý je obklopený Kozak konsenzuálnou sekvenciou. Stop kodón je v pozícii 1710 - 1712.

Ako bolo vykonané pre PS1, analýza PS2 RT-PCR produktov z niekoľkých tkanív, vrátane mozgu a svalov, RNA ukázala dva alternatívne varianty zostrihnutia, v ktorých môže byť relatívne veľký segment vystrihnutý. Tak, s relatívne nízkou frekvenciou, sú produkované transkripty, v ktorých sú nukleotidy 1152 - 1250 PS2 transkriptu, SEQ ID NO: 18, (kódujúce zvyšky 263 - 295, SEQ ID NO: 19) alternatívne zostrihnuté. Ako bolo uvedené vyššie, toto zostrihnutie tesne korešponduje s alternatívnym zostrihom exonu 9 PS1 (Rogaev et al., 1995).

Ďalší variant zostrihu PS2 cDNA sekvencie ktorej chýba GAA triplet v pozícii nukleotidov 1338 - 1340 v SEQ ID NO: 18 môže

byť tiež nájdená vo všetkých vyšetrovaných tkanivách. Tento alternatívny zostrih vedie k vynechaniu Glu zvyšku v aminokyselinovej pozícii 325.

6. Štruktúra presenilínových proteínov

A. Rodina presenilínových proteínov

Presenilíny sú teraz opísané ako nová rodina vysoko konzervovaných integrálnych membránových proteínov so spoločným štrukturálnym motívom, spoločnými vzormi alternatívneho zostrihnutia, a spoločnými mutačnými regiónmi hot spots, ktoré korelujú s putatívnymi štrukturálnymi doménami, ktoré sú prítomné u mnohých zvieracích buniek od bezstavovcových a do stavovcových. Analýza predpokladaných aminokyselinových sekvencií ľudských génov pre presenilíny pri požití Hopp and Woods algoritmu naznačila, že proteíny sú rozsiahle integrálne membránové proteíny ako sú receptory, kanálové proteíny alebo štrukturálne membránové proteíny. Kyte-Doolittle hydropatické znázornenie putatívneho hPS1 proteínu je znázornené na obrázku 2. Hydropatické znázornenie a štrukturálne analýzy naznačujú, že tieto proteíny majú asi sedem hydrofóbných transmembránových domén (označených TM1 až TM7) separovaných hydrofilnými slučkami. U iných modelov môže byť predpokladané, že majú najmenej 5 a najviac 10 transmembránových domén v závislosti na parametroch použitých v algoritme na tento predpoklad. Prítomnosť sedem membránu preklenujúcich domén, viacmenej, je charakteristikou niekoľkých tried G-viazaných receptorových proteínov, ale je tiež pozorovaná u iných proteínov (napr. kanálových proteínov). Absencia rozpoznateľného signálneho peptidu a malý počet glykosylačných miest sú pozoruhodné.

Aminokyselinové sekvencie hPS1 a mPS1 proteínov sú porovnané na obrázku 3 a sekvencia hPS2 a mPS2 proteínov sú porovnané na obrázku 4. V každom obrázku sú zhodné aminokyselinové zvyšky vyznačené horizontálnymi čiarami. Sedem putatívnych transmembránových domén je vyznačené horizontálnymi líniami nad alebo pod sekvenciami.

Hlavné rozdiely medzi členmi tejto rodiny sú v sekvenciách

aminokyselín hydrofilných, acidických slučkových domén na N-konci a medzi putatívnou TM6 a TM7 doménou presenilinových proteínov (TM6->7 slučka). Väčšina zo zvyškov kódovaných hPS1 exonom 9, ktorý je alternatívne zostrihnutý v niektorých non-neutrálnych tkanivách, tvorila časť putatívnej TM6->7 slučky. Okrem toho, u korešpondujúcich alternatívne zostrihnutých variant identifikovaných v hPS2 sa zdalo, že kódujú časť TM6->7 slučky. Variabilný zostrih tejto hydrofilnej slučky a skutočnosť, že aminokyselinivá sekvencia slučky sa líši medzi členmi génovej rodiny, naznačuje, že táto slučka je významnou funkčnou doménou proteínu a môže určovať určitú špecificitu fyziologickým a patogénnym interakciám jednotlivých presenilinových proteínov. Pretože N-terminálna hydrofilná doména nesie určitý acidický náboj ako TM6->7 hydrofilná acidická slučka a v modeli siedmych transmembránových domén je pravdepodobné, že má rovnakú orientáciu s ohľadom na membránu, a je tiež variabilná medzi presenilínmi, je veľmi pravdepodobné, že tieto dve domény majú funkciu buď koordinovaným alebo nezávislým spôsobom (napr. rovnaké alebo rôzne ligandy alebo funkčné vlastnosti). Tak je pravdepodobné, že N-koniec je tiež významnou funkčnou doménou proteínu a môže určovať určitú špecificitu fyziologickým a patogénnym interakciám jednotlivých presenilinových proteínov.

Ako je podrobnejšie opísané nižšie, patogénna mutácia v PS1 a PS2 zoskupení v oblasti TM1->2 slučkovej a TM6->7 slučkovej domény ďalej naznačujú, že tieto domény sú funkčnými doménami týchto proteínov. Obrázky 5 a 6 sú schématické obrázky predpokladanej štruktúry PS1 a PS2 proteínov, v príslušnom poradí, so známymi mutačnými miestami ukázaných na obrázkoch. Ako je znázornené na obrázkoch, TM1->2 väzobná sekvencia je predpokladané jej umiestnenie na opačnej strane membrány než je N-koniec a TM6->7 slučka, a môže byť významná v transmembránovej komunikácii. Toto je podporované PS1 Y115H mutáciou, ktorá bola pozorovaná v rodokmeňoch s častým nástupom familiárnej AD (30 - 40 rokov) a ďalšími mutáciami v TM1/2 skrutkoviciach, u ktorých sa môže očakávať, že destabilizujú slučku. TM1->2 slučka je relatívne krátka (PS1: zvyšky 101 - 132; PS2: zvyšky 107 - 134), čo robí túto sekvenciu viac prístupnú pre konvenčnú syntézu peptidov. Sedem PS1 mutácií je zoskupených v regióne medzi kodonom 82 a kodonom 146, ktorý obsahuje putatívnu prvú transmembránovú doménu

(TM1), TM1->2 slučku a TM2 doménu v PS1. Obdobne, mutácia v kodone 141 PS2 je tiež umiestnená v TM2 doméne. Tieto mutácie pravdepodobne destabilizujú TM1->2 slučkovú doménu a jej kotviaci bod v TM1 a TM2. Dvanásť PS1 mutácií vedie k alterácii aminokyselín medzi kodonami 246 a 410, ktoré sú zahrnuté v TM6, TM6->7 slučke a TM7 doméne. Tieto mutácie môžu modifikovať štruktúru alebo stabilitu, TM6->7 slučky (buď priamo alebo modifikáciou konformácie TM6 alebo TM7).

Ďalší dôkaz pre významnú funkčnú rolu umiestnenú v TM6->7 slučke je divergencia sekvencie v centrálnej časti TM6->7 slučky (približne aminokyseliny 300 - 671) medzi rôznymi členmi presenilínovej rodiny proteínov. Podobne, pretože N-terminálna sekvencia členov presenilínovej rodiny proteínov je tiež divergentná, je pravdepodobné, že mierne divergentné sekvencie hrajú úlohu v určovaní špecificity funkcie pre každý z rôznych presenilínových proteínov, zatiaľ čo konzervované sekvencie určujú spoločné biologické aktivity. Tieto regióny môžu reprezentovať ligandové väzobné miesta. Ak je tomu tak, potom mutácia v TM6->7 regióne pravdepodobne modifikujú väzobnú aktivitu ligandu. TM1->2 slučka, ktorá je konzervovaná medzi rôznymi členmi presenilínovej rodiny proteínov, pravdepodobne reprezentuje efektorovú doménu na opačnej strane membrány. S výnimkou mutácie zostrihu exónu 10, väčšina z iných (chybných) mutácií je pripojená na rovnaké povrchy putatívnych transmembránových skrutkovic, čo naznačuje, že môžu ovplyvňovať väzbu ligandu a funkciu kanálov. Tak tieto domény (napr. TM6->7 a TM1->2 slučky) môžu byť použité ako miesta na vývoj špecifických väzobných agens na inhibíciu účinku mutácií a/alebo na znovunastolenie normálnej funkcie presenilínového proteínu u subjektu s Alzheimerovou chorobou.

Podobnosť medzi putatívnymi produktami *C. elegans* SPE-4 a PS1 génami implikuje, že môžu mať podobné aktivity. U SPE-4 proteínu sa zdá, že je zahrnutý v tvorbe a stabilizácii komplexu fibrózne telo - membránová organela (FBMO) počas spermatogenézy. FBMO je špecializovaná organela odvodená od Golgiho systému, ktorá sa skladá z membránovo viazaných váčkov pripojených na a čiastočne obklopených komplexom paralelných proteinových vlákien a môže byť zahrnutá v transporte a skladovaní solubilných a na membránu viazaných polypeptidov. Mutácie v SPE-4 narušujú FBMO komplexy a

ukončujú spermatogenézu. Preto môže byť fyziologickou funkciou SPE-4 buď stabilizácia medzi integrálnym membránovým pučaním a fúziami, alebo stabilizácia interakcií medzi membránovými a fibrilárnymi proteínami v priebehu intracelulárneho transportu FBMO komplexu počas spermatogenézy. O porovnateľných funkciách je možné uvažovať na preseniliny. Napríklad, PS1 môže byť zahrnutý buď v priestore iných na membránu viazaných proteínov ako je APP, alebo v axonálnom transporte a fúznym štepením membránovo viazaných vesikulách počas transportu proteínov, tak ako v Golgiho aparáte alebo systéme endosom-lysosom. Pokiaľ sú tieto hypotézy správne, potom môže byť pri mutáciách očakávané, že povedú k aberantnému transportu a spracovaniu APP a/alebo abnormálnym interakciám s proteínami cytoskeletu ako je s mikrotubulmi asociovaný proteín Tau. Abnormality v intracelulárnej a extracelulárnej dispozícii APP a Tau sú skutočne súčasťou neuropatologických vlastností Alzheimerovej choroby. Hoci umiestnenie PS1 a PS2 mutácií vo vysoko konzervovaných zvyškoch v konzervovaných doménach putatívnych proteínov naznačujú, že sú patogénne, sú aspoň tri z týchto mutácií sami konzervatívne, čo je v súlade s nástupom choroby v dospelosti. Keďže žiadna z týchto doposiaľ pozorovaných mutácií nie je delécia ani nezmyselná mutácia, u ktorých je predpokladané, že spôsobujú úplnú stratu exprese alebo funkcie, nemôžeme predpokladať, či tieto mutácie budú mať dominantný účinok nadobudnutia funkcie, čo navodí aberantné spracovanie APP alebo dominantný účinok straty funkcie, čo spôsobí zastavenie normálneho spracovania APP. Zostrihová mutácia exonu 10 spôsobuje fúziu v rámci exonu 9 na exon 10 a môže mať štrukturálny účinok na PS1 proteín, čo môže pozmeniť intracelulárne zameranie alebo väzbu ligandu, alebo to môže inak ovplyvniť funkciu PS1.

Alternatívnou možnosťou je, že produkt PS1 génu môže reprezentovať receptor alebo proteín kanálu. Mutácia takéhoto proteínu môže byť v príčinnom vzťahu k niekoľkým iným neurologickým chorobám ako u stavovcov (napr. malígna hypertermia, hyperkalemičná periodická paralýza u ľudí), tak aj u bezstavovcových organizmov (deg-1(d) mutanty *C. elegans*). Hoci sa patológia týchto iných ochorení nepodobá patológii Alzheimerovej choroby, existuje tu dôkaz na funkčné abnormality iontových kanálov u Alzheimerovej choroby. Napríklad, boli opísané anomálie v tetra-

-etylamónium-senzitívnom 113pS draslíkovom kanáli v homeostázii vápnika. Poruchy v transmembránovom prúde vápnika môžu byť predovšetkým relevantné vo svetlo slabej homológie medzi PS1 a -ID podjednotkou napäťovo závislého vápnikového kanálu a vo svetle pozorovania, že zvýšenie intracelulárneho vápnika v kultivovaných bunkách môže napodobniť niektoré biochemické vlastnosti Alzheimerovej choroby, ako je alterácia vo fosforylácii Tau-s mikrotubuly asociovaného proteínu a zvýšená produkcia A -peptidov.

B. Štruktúra hPS1

Ako je uvedené v SEQ ID NO: 2, najväčšia známa forma ľudského PS1 proteínu obsahuje 467 aminokyselín a má predpokladanú hmotnosť asi 51,37 kDa. Variant s vyššie opísaným alternatívnym zostrihaním exónu 4 (v ktorom sú deletované zostatky korešpondujúce pozíciám 26 - 29 SEQ ID NO: 2) bude obsahovať o 4 aminokyseliny menej a bude mať hmotnosť okolo 50,93 kDa. Podobne, variant s vyššie opísaným alternatívnym zostrihaním exónu 9 (v ktorom sú deletované zvyšky korešpondujúce pozíciám 258 -290 SEQ ID NO: 2) bude obsahovať o 33 aminokyselín menej a bude mať hmotnosť okolo 47,74 kDa.

Umiestnenie putatívnych domén je prezentované v tabuľke 2. Znovu si všimnite, že číslovanie pozície zvyškov je s ohľadom na SEQ ID NO: 2 a je približné (t.j. 2 zvyšky).

Schematické znázornenie putatívnej PS1 štruktúry je znázornené na obrázku 5. N-koniec je vysoko hydrofilný, negatívne nabitá doména s niekoľkými potenciálnymi fosforylačnými doménami, nasledovaná sekvenčne hydrofóbnou membránu preklenujúcou doménou s približne 19 zvyškami (TM1), nabitú hydrofilnou slučkou s 32 zvyškami (TM1->2), piatimi ďalšími membránu preklenujúcimi doménami (TM2 až TM6) oddelenými krátkymi (1 - 15 zvyškov) hydrofilnými doménami (TM2->3 až TM5->6) a ďalšou rozsiahlou, acidickou hydrofilnou nabitou slučkou (TM6->7) a aspoň jednou (TM7) a možno dvomi, inými hydrofóbnymi potencionálne membránu preklenujúcimi doménami, kulminujúcimi v polárnej doméne na C-konci.

Proteín tiež obsahuje veľa potenciálnych fosforylačných miest, kde jedným z nich je MAP kinasa konsenzuálne miesto, ktoré je tiež obsiahnuté v hyperfosforylácii Tau v priebehu konverzie normálneho Tau na neurofibrilárnu sieť. Táto konsenzuálna sekvencia môže poskytnúť putatívny element viažúci túto proteínovú aktivitu na iné biochemické aspekty Alzheimerovej choroby a môže reprezentovať pravdepodobný terapeutický cieľ. Prehliadka proteínovej štruktúry odhalila dve sekvencie YTPF (zvyšky 115 - 118, SEQ ID NO: 2) a STPE (zvyšky 353 - 356, SEQ ID NO: 2), ktoré reprezentujú 5/T-P motív, ktorý je MAP kinasa konsenzuálnej sekvencie. Niekoľko iných fosforylačných miest existuje s konsenzuálnymi sekvenciami pre proteín kinasa C (PKC) aktivitu. Pretože PKC aktivita je asociovaná s odlišnosťami metabolizmu APP, ktoré sú relevantné k Alzheimerovej chorobe, sú tieto miesta na PS1 proteíne a jeho homológoch taktiež cieľom pre terapeutika. Predbežné dôkazy ukazujú, že aspoň v transfektovaných bunkách, PS1 proteín je fosforylovaný iba v malej miere, zatiaľ čo PS2 proteín je signifikantne fosforylovaný.

Aspoň pre PS2 sa javí, že sa táto fosforylácia vyskytuje na serinových zvyškoch na N-terminálnej doméne mechanizmom, ktorý nevyždauje PKC (Capel et al., 1996).

Všimnite si, že alternatívny zostrih na konci exónu 4 odstraňuje 4 aminokyseliny s hydrofilnými N-terminálnymi doménami a môže sa očakávať, že odstraňuje konsenzuálnu fosforylačnú sekvenciu. Okrem toho, alternatívny zostrih exónu 9 vedie ku skrátenej izoforme PS1 proteínu, kde je neprítomných päť terminálnych hydrofóbných zvyškov TM6 a časť hydrofilnej negatívne nabitej TM6->7 slučky ihneď C-terminálne k TM6. Táto alternatívne zostrihaná izoforma je charakterizovaná zachovaním sekvencie z N-konca ďalej a tým, že obsahuje tyrosín v pozícii 256 SEQ ID NO: 2, zmenu aspartatu v pozícii 257 na alanín a zostrih C-terminálnej časti proteínu a tým, že obsahuje tyrozín 291. Takéto rozdiely v zostrihaní sú často asociované s dôležitými funkčnými doménami proteínov. Toto dokazuje, že táto hydrofilná slučka (a náväzne N-terminálna hydrofilná slučka s podobným aminokyselinovým nábojom) je/sú aktívne funkčné domény PS1 produktu a tak sú miestom pre terapeutický zásah.

C. Štruktúra ľudského PS2.

Ľudské PS1 a PS2 proteíny vykazujú 63% celkovú identitu aminokyselín a niekoľko domén vykazuje úplnú identitu. Ako sa preto môže očakávať, analýzu hydrofobicity naznačujú, že obidva proteíny taktiež majú podobnú štrukturálnu organizáciu. Tak je o obidvoch proteínoch predpokladané, že majú sedem hydrofóbných putatívnych transmembránových domén a obidva proteíny majú veľké acidické hydrofilné domény na N-konci a medzi TM6 a TM7. Ďalšia podobnosť bola zrejmá z vyššie opísanej štrukturálnej analýzy RT-PCR produktu z mozgovej a svalovej RNA, ktorá ukázala, že nukleotidy 1153 - 1250 PS2 transkriptu sú alternatívne zostrihané. Tieto nukleotidy kódujú aminokyseliny 263 - 296, ktoré sú umiestnené v TM6 → 7 slučkovej doméne putatívneho PS2 proteínu a ktoré majú 94% identitu sekvencie s alternatívne zostrihanými aminokyselinami 257 - 290 v PS1. Umiestnenie putatívnych domén hPS2 proteínu je prezentované v tabuľke 3. Všimnite si, že číslovanie pozícií zvyškov je s ohľadom na SEQ ID NO: 19 a je približné (t.j. 2 zvyšky).

Schématické znázornenie putatívnej PS2 štruktúry je ukázané na obrázku 6. Podobnosť medzi hPS1 a hPS2 je najväčšia v niekoľkých doménach proteínov korešpondujúcich intervalom medzi TM1 a TM6, a od TM7 do C-konca PS1 proteínu. Hlavné rozdiely medzi PS1 a PS2 sú vo veľkosti a sekvenciách aminokyselín negatívne nabitej hydrofilnej TM6 → 7 slučky a sekvenciách N-terminálnych hydrofilných domén.

Najzreteľnejšie rozdiely medzi dvomi predpokladanými aminokyselinovými sekvenciami sa vyskytujú v centrálnej časti TM6 → 7 hydrofilnej slučky (zvyšky 304 - 374 hPS1, 310 - 355 hPS2) a v N-terminálnej hydrofilnej doméne. Analogicky, táto doména je taktiež menej vysoko konzervovaná medzi myším a ľudským PS1 génom (identita = 47/60 zvyškov) a nevykazuje žiadnu podobnosť k ekvivalentným regiónom SPE-4.

7. Presenilinové mutanty.

A. PS1 mutanty

Bolo identifikovaných niekoľko mutácií v PS1 géne, ktoré spôsobujú vážny typ familiárnej Alzheimerovej choroby. Jedna

alebo kombinácia týchto mutácií môže byť zodpovedná za túto formu Alzheimerovej choroby, rovnako ako za niekoľko iných neurologických ochorení. Mutácie môžu byť akoukoľvek formou substitúcie, inzercie alebo delécie nukleotidovej sekvencie, ktoré smerujú ku zmenám v predpokladanej sekvencii aminokyselín alebo ktoré smerujú k aberantnému spracovaniu transkriptu, aberantnej hladine alebo stabilite. Špecifické choroby spôsobujú mutácie vo forme nukleotidových alebo aminokyselinových delécií alebo substitúcií, sú opísané nižšie, ale je predpokladané, že ďalšie mutácie môžu byť nájdené v iných rodinách. Skutočne, po počiatočnom objave piatich rôznych chybných mutácií u ôsmich rôznych rodokmeňoch (Sherrington et al., 1995) bolo očakávané zo skúseností z iných dedičných ochorení (napr. amyotrofickéj laterálnej skleróze asociovanej s mutáciou v Ca^{2+} superoxid dismutasovom géne), že budú identifikované ďalšie mutácie. Toto očakávanie bolo naplnené našim nasledujúcim objavom ďalších mutácií presenilínov (Rogaev et al., 1995) a podobnými pozorovaniami, ktoré uskutočnili iní (napr. Crust et al., 1995, Champion et al., 1995). Tak, ako je tu použité s ohľadom na PS1 gény a proteíny, teraz termín "mutantný" obmedzený na tieto mutácie, ale skôr je konštruovaný tak, ako je definované vyššie.

Priame sekventovanie prekrývajúcich sa RT-PCR produktov pokrývajúcich 2, 8 kb S182 transkript izolovaný od postihnutých členov šiestich veľkých rodokmeňov viazaných na chromozóm 14 viedlo najprv k objavu piatich chybných mutácií v každom zo šiestich rodokmeňov. Každá z týchto mutácií kosegregovala s ochorením v príslušnom rodokmeni a nebola prítomná v asi 142 nepríbuzných neurologicky normálnych subjektoch rovnakého etnického pôvodu ako FAD rodokmene (248 nepríbuzných chromozómov). Umiestnenie génu vo fyzikálnom intervale segregujúcom s AD3 rysom, prítomnosť ôsmich rôznych chybných mutácií, ktoré kosegregovali s rysom ochorení v šiestich rodokmeňoch definitívne viazaných na chromozóm 14 a neprítomnosť týchto mutácií v 284 nezávislých normálnych chromozómoch dohromady potvrdila, že PS1 gén je AD3 lokus. Ďalšia biologická podpora pre túto skutočnosť vychádza zo skutočnosti, že zvyšky nutované pri FAD príbuzných sú konzervované v evolúcii (napr. hPS1 v. mPS1), že mutácie sú umiestnené v doménach proteínu, ktoré sú taktiež vysoko konzervované pri homológoch iných

stavovcov a bezstavovcov a že produkt PS1 génu je exprimovaný vo vysokých hladinách vo väčšine regiónoch mozgu, vrátane tých, ktoré sú najväžnejšie postihnuté AD.

Od pôvodného objavu PS1 génu bolo zmapovaných mnoho ďalších génov mutácií asociovaných s rozvojom AD. Tabuľka 4 charakterizuje mnoho z nich. Každá z pozorovaných delécií alebo substitúcií nukleotidov sa vyskytla v putatívnom ORF PS1 transkripte a určuje zmenu kódovanej aminokyseliny v ukázanej pozícii. Mutácie sú uvedené s odkazom na ich nukleotidové umiestnenie v SEQ ID NO: 1 a s ohľadom na ich aminokyselinové umiestnenie v SEQ ID NO: 2. Vstup "NA" ukazuje, že dáta nie sú dostupné.

Ako bude zmienené v ďalšej sekcii, bolo taktiež nájdených veľa PS2 mutácií. Porovnanie hPS1 a hPS2 sekvencií je ukázané na obrázku 4 a ukazuje, že tieto patogénne mutácie sú v regiónoch PS2 proteínu, ktoré sú konzervované v PS1 proteíne. Preto, korešpondujúce mutácie v PS1 proteíne môžu taktiež byť očakávané ako patogénne a sú obsiahnuté v PS1 mutantoch tu poskytnutých. Ďalej, akékoľvek patogénne mutácie identifikované v akomkoľvek konzervovanom regióne génu pre presenilín môžu byť považované za reprezentujúci mutant iných presenilínov, ktoré nesú tento konzervovaný región.

Zaujímavé je, že mutácie A260V, C 263R, P264S, E280A, E280G, A285V, L286V, 291-319, G384A, L392V a C410Y sa všetky vyskytujú v alebo v blízkosti acidickej hydrofilnej slučky medzi putatívnymi transmembránovými doménami TM6 a TM7. Osem z týchto mutácií (A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280G, A285V, L286V) je taktiež umiestnených v alternatívne zostrihanej doméne (zvyšky 257 - 290 v SEQ ID NO: 2).

Všetky z týchto mutácií môžu byť testované mnohými stratégiami (priame sekventovanie nukleotidov, ligačná polymerasová reťazová reakcia, SSCP, RFLP, nové "DNA chip" technológie, atď.) pomocou použitia RT-PCR produktov reprezentujúcich zrelé mRNA/cDNA sekvencie alebo génomovú DNA.

Nakoniec, malo by byť uvedené, že bolo zistených niekoľko

polymorfizmov, ktoré nemali jasný škodlivý účinok. Jeden z nich, T->G zmena nukleotidu 863 SEQ ID NO: 1, spôsobuje F205L polymorfizmus v TM4. Iné (C->A v bp 1700., G->A v bp 2603, delécia bp2620) sú v 3' UTR.

B. PS2 mutanty

Silná podobnosť medzi PS1 a PS2 génovými produktami viedla k možnosti, že PS2 gén môže byť miestom ochorení spôsobujúcich mutácie v niektorých z malého počtu AD rodokmeňov s ranným nástupom, pri ktorých štúdie genetickej väzby vylúčili chromozómy 14, 19 a 21. RT-PCR bola použitá na izoláciu cDNA korešpondujúcich ku PS2 transkriptu z lymfoblastov, fibroblastov alebo mŕtveho mozgového tkaniva od postihnutých členov ôsmich rodokmeňov s ranným nástupom FAD pri ktorých boli mutácie v APP a PS1 génoch skôr vylúčené štúdiami priamym sekventovaním.

Vyšetrenie týchto RT-PCR produktov detekovalo heterozygótnu A->G substitúciu v nukleotide 1080 u všetkých štyroch postihnutých členov rozšíreného rodokmeňa talianskeho pôvodu (Flo10) so skorým nástupom patologicky potvrdenej FAD (nástup 50-70 rokov). O tejto mutácii sa môže predpokladať, že spôsobuje Met->Val chybnú mutáciu v kodóne 239 v TM5.

Druhá mutácia (A->T v nukleotide 787) spôsobuje Asn->Ile substitúciu v kodóne 141 v TM2 bola zistená pri postihnutých členoch skupiny príbuzných rodokmeňa Volga German pôvodu (reprezentovaný bunkovými líniami AG09369, AG09907, AG09952 a AG09905, Coriell Institute, Camden NJ). Signifikantne, jeden subjekt (AG09907) bol homozygótny pre túto mutáciu, čo je pozorovanie, ktoré je kompatibilné s prirodzeným krížením týchto rodokmeňov. Signifikantne, tento subjekt nemal signifikantne odlišný obraz od subjektov heterozygotných pre N141I mutáciu. Mutácie PS2 génov neboli zistené v 284 bormálnych kontrolách ani neboli prítomné pri postihnutých členoch rodokmeňa s AD3 typom AD.

Obidve tieto PS2 mutácie spôsobujú substitúcie zvyškov, ktoré sú vysoko konzervované v PS1/PS2 génovej rodine.

Ďalšia PS2 mutácia je spôsobená T->C substitúciou v páre báz 1624, čo spôsobuje substitúciu Ile na Thr v kodóne 420 C-konca. Táto mutácia bola zistená v ďalších prípadoch familiárnej AD s ranným nástupom (45 rokov).

Tieto hPS2 mutácie sú uvedené v tabuľke 5 s odkazom na ich nukleotidové umiestnenie v sekvencii SEQ ID NO: 18 a s odkazom na ich aminokyselinovú pozíciu v SEQ ID NO: 19. Vstup "NA" ukazuje, že dáta nie sú dostupné.

Ako bolo spomínané v predchádzajúcej sekcii, bolo tiež zistených veľa PS1 mutácií. Porovnanie hPS1 a hPS2 sekvencií je zobrazené na obrázku 4 a ukazuje, že tieto patogénne mutácie sú v regionoch PS1 proteínov, ktoré sú rozsiahle konzervované v PS2 proteíne. Preto, korešpondujúce mutácie v PS2 proteínoch môžu taktiež byť očakávané ako patogénne a sú obsiahnuté v PS2 mutantoch tu poskytnutých. Ďalej, akékoľvek patogénne mutácie identifikované v akomkoľvek konzervovanom regióne génu pre presenilín sa môžu považovať za reprezentujúci mutant iných presenilínov, ktoré obsahujú tento konzervovaný región.

Objavenie génu, o ktorého produkte sa usudzuje, že obsahuje významné aminokyselinové a štrukturálne podobnosti s produktom PS1 génu naznačuje, že tieto proteíny môžu byť vo funkčnom vzťahu ako nezávislé proteíny s prekrývajúcimi sa funkciami, ale snáď s mierne rozdielnymi špecifickými aktivitami, ako fyzikálne asociované podjednotky multimerického polypeptidu alebo ako nezávislé proteíny vykonávajúce nasledujúce funkcie v rovnakej dráhe.

Pozorovanie troch rôznych chybných mutácií v konzervovaných doménach PS2 proteínu u subjektov s familiárnou formou AD naznačuje, že tieto mutácie sú, podobne ako mutácie v PS1 géne, príčinné pre AD. Tento záver je významný pretože, hoci fenotyp ochorenia sociovaný s mutáciami v PS1 géne (nástup 30 - 50 rokov, trvanie 10 rokov) je nepatrne odlišný od fenotypu asociovaného s mutáciami PS2 génu (nástup 40 - 70 rokov, trvanie viac ako 20 rokov), všeobecné podobnosti jasne ukazujú, že biochemická dráha vyjadrovaná členmi tejto génovej rodiny je centrálna pre genézu aspoň AD s ranným nástupom. Jemné rozdiely vo fenotype

ochorenia môžu odrážať nižšiu hladinu expresie PS2 transkripta v CNS, alebo môžu odrážať odlišnú úlohu pre génový produkt PS2.

Analogicky k účinkom PS1 mutácií môže PS2, pokiaľ je mutovateľný, spôsobiť aberantné spracovanie APP /Prokurzorový proteín pre amyloid) na A peptid, hyperfosforyláciu Tau s mikrotubulami asociovaného proteínu a abnormality v intracelulárnej homeostáze vápnika. Interferencia s týmito abnormálnymi interakciami poskytuje cieľ pre terapeutické intervencie pri AD.

Nakoniec, bol zistený aspoň jeden nukleotidový polymorfizmus u jedného normálneho individua, ktorého PS2 c DNA mala T->C zmenu v bp 626 SEQ ID NO: 18, bez akejkoľvek zmeny v kódovanej sekvencii aminokyselín.

III. Preferované uskutočnenia

Čiastočne na základe objavov tu opísaných sú poskytnuté nasledujúce preferované uskutočnenia predkladaného vynálezu.

1. Izolované nukleové kyseliny

V jednej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález izolované nukleové kyseliny korešpondujúce k , alebo vo vzťahu k, sekvencii nukleovej kyseliny pre presenilín, ktorá je tu opísaná. Ako je podrobnejšie opísané ďalej, tieto sekvencie obsahujú normálne PS1 a PS2 sekvencie od ľudí a od iných druhov cicavcov, homológne sekvencie z necicavčích druhov ako je *Drosophila* a *C. elegans*, podsady týchto sekvencií použiteľné ako skúšky a PCR primery, podsady týchto sekvencií kódujúce fragmenty presenilínových proteínov alebo korešpondujúcich jednotlivých štrukturálnych domén alebo polymorfných regiónov, komplementárne alebo antisenzné sekvencie korešpondujúce fragmentom presenilínových génov, sekvencie v ktorých bol presenilín kódujúci región operatívne pripojený na exogénne regulačné regióny a sekvencie kódujúce fúzne proteíny častí presenilínových proteínov fúzovaných na iné proteíny použiteľné ako markery expresie, ako "ciele" pre purifikáciu alebo vo vyšetreniach a testoch pre proteíny interagujúce s presenilínmi.

Tak v prvej sérii uskutočnení sú poskytnuté izolované sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú normálnu alebo mutantnú verziu PS1 a PS2 proteínov. Príklady takýchto sekvencií nukleových kyselín sú tu opísané. Tieto nukleové kyseliny môžu byť genómové sekvencie (napr. SEQ ID NO: 5 - 15) alebo môžu byť cDNA sekvencie (napr. SEQ ID NO: 1, 3, 16 a 18). Okrem toho, nukleové kyseliny môžu byť rekombinantné gény alebo "minigény", v ktorých všetky alebo niektoré intróny rôznych kombinácií intrónov a exónov a lokálne cis účinkujúcich regulačných elementov môžu byť zapracované v propagácii alebo expresii konštruktov alebo vektorov. Tak, napríklad, vynález poskytuje sekvencie nukleovej kyseliny, v ktorej sú inkorporované alternatívne zostrihané variácie tu opísané na DNA úrovni, čo umožňuje bunkám obsahujúcim tieto sekvencie exprimovať iba jeden z alternatívne zostrihaných variantov v každej pozícii zostrihu. Napríklad, môže byť produkovaný rekombinantný gén v ktorom 3' koniec exonu 1 PS1 génu (bp 1337 SEQ ID NO: 5) je pripojený priamo na 5' koniec exónu 3 (bp 588 SEQ ID NO:) takže je produkovaný iba transkript korešpondujúci predominantnému transkriptu. Nezávisle na tom môže byť vytvorený rekombinantný gén "posilujúci" alternatívny zostrih exónu 2 a exónu 3. Podobne, môžu byť produkované rekombinantné gény, v ktorých sú inkorporované exon 4 alebo exon 9 zostrihovej varianty PS1 (alebo korešpondujúce TM6->7 zostrihovej varianty PS2) do DNA, takže bunky obsahujúce tento rekombinantný gén môžu exprimovať iba jednu z týchto variant. Za účelom redukcie veľkosti rekombinantného génu pre presenilín môže byť využitá cDNA alebo môžu byť rôzne kombinácie netranslatovaných exónov a intrónov odstránené z DNA konštruktu. Nakoniec môžu byť produkované rekombinantné gény, v ktorých je 5' UTR pozmenený, takže transkripčný prebieha nutne od jedného alebo od druhého z dvoch transkripčných iniciačných miest. Takéto konštrukty môžu byť zjavne užitočné, ako je to opísané nižšie, v identifikácii zlúčenín, ktoré môžu indukovať alebo reprimovať expresiu presenilínov. Mnoho variácií týchto uskutočnení je teraz poskytnutých detailným opísaním génov pre presenilíny, ktorý je tu poskytnutý.

Okrem opísaných sekvencií pre presenilín je odborník v odbore teraz schopný identifikovať a izolovať nukleové kyseliny reprezentujúce gény pre presenilín alebo cDNA, ktoré sú alelické k opísaným sekvenciám alebo ktoré sú heterošpecifické homológy.

Tak, predkladaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny korešpondujúce k týmto alelám a homológom, rovnako ako rôzne vyššie opísané rekombinantné konštrukty odvodené z týchto sekvencií, prostriedkami, ktoré sú v odbore dobre známe. Stručne, odborník v odbore môže teraz vyšetrovať prípravky genómové alebo cDNA, vrátane vzoriek pripravených z jednotlivých organizmov (napr. ľudských AD pacientov alebo členov ich rodiny) rovnako ako bakteriálne, vírusové, kvasinkové a iné knižnice na genómovú alebo cDNA, pomocou použitia skúšok alebo PCR primérov pre identifikáciu alelických alebo homológnych sekvencií. Pretože je žiadúce identifikovať ďalšie mutácie génu pre presenilín, ktoré môžu prispievať k rozvoju AD alebo iných ochorení, pretože je žiadúce identifikovať ďalšie presenilínové polymorfizmy, ktoré nie sú patogénne a pretože je taktiež žiadúce vytvoriť rôzne zvieracie modely, ktoré môžu byť použité pre štúdium AD a pre vyhľadávanie potenciálnych terapeutík, je predovšetkým predpokladané, že ďalšie presenilínové sekvencie budú izolované z iných prípravkov alebo knižníc ľudských nukleových kyselín a z prípravkov alebo knižníc od zvierat vrátane krysí, myší, škrečkov, morčiat, králikov, psov, mačiek, kôz, oviec, prasiat, a ne-ľudských primátov. Ďalej, homológy presenilínu od kvasieniek alebo iných druhov bezstavovcov, vrátane *C. elegans* alebo iných hlístov, rovnako ako *Drosophila* alebo iného hmyzu, môžu byť najmä užitočné pre vyšetrovanie liečiv. Napríklad, bezstavcové nesúce mutantné presenilínové homológy (alebo cicavčie presenilínové transgény), ktoré spôsobujú rýchle sa vyskytujúci a ľahko odčítateľný fenotyp (napr. abnormálnu vulvu alebo vývoj oka po niekoľkých dňoch) môžu byť pre vyhľadávanie liečiv, ktoré obklopujú účinok mutantného génu. Takéto bezstavovce môžu slúžiť oveľa rýchlejšie a účinnejšie pre hromadné vyšetrovanie ako stavovce. Pokiaľ je takýmto spôsobom zistená zlúčenina, môže byť testovaná na vyšších zvieratách.

Štandardné hybridizačné vyšetrenie alebo PCR techniky môžu byť použité (ako sú použité, napríklad v identifikácii mP51 génu) pre identifikáciu a/alebo izoláciu takých alelických a homológnych sekvencií pomocou použitia relatívne krátkej sekvencie génu pre presenilín. Sekvencie môžu obsahovať 8 alebo menej nukleotidov v závislosti na charaktere cieľovej sekvencie, použitej metódy a požadovanej špecificite. Budúci vývoj techniky môže umožniť

použitie ešte kratších sekvencií. S doteraz dostupnou technológiou sú preferované sekvencie 9 - 50 nukleotidov, a lepšie okolo 18 - 24 nukleotidov.

Tieto sekvencie môžu byť vybrané z tých, ktoré sú tu opísané, alebo môžu byť odvodené od alelických alebo heterošpecifických homológov tu opísaných. Pri skúšaní mRNA alebo pri vyšetrovaní cDNA knižníc sú preferovane použité skúšky a priméry z kódujúcich sekvencií (skôr iba intróny) a sekvencie, ktoré sú vynechané v alternatívne zostrihaných variantách sú typicky vypustené, pokiaľ nie je špecificky požadovaná identifikácia týchto variant. Alelické varianty génov pre presenilín budú pravdepodobne hybridizovať na opísané sekvencie za prísnych hybridizačných podmienok, ako sú tu definované, zatiaľčo podmienky nízkej prítomnosti môžu byť použité pre identifikáciu heteroskopických homológov.

V inej sérii uskutočnení poskytuje predkladaný vynález izolované nukleové kyseliny, ktoré obsahujú subsady sekvencií pre presenilín alebo ich komplementy. Ako bolo vyššie uvedené, takéto sekvencie majú uplatnenie ako próby a PCR priméry pre identifikáciu a izoláciu alelických alebo homológnych variant génov pre presenilín. Subsekvencie korešpondujú k polymorfným regiónom presenilínov, ako je opísané vyššie, budú taktiež mať uplatnenie vo vyšetrovanej a/ alebo genotypizácii jedincov pre diagnostické účely, ako je opísané v ďalšom. Okrem toho, a taktiež ako je opísané ďalej, takéto subsady budú mať uplatnenie pre kódovanie

1) fragmentov presenilínových proteínov pre obsiahnutie vo fúznych proteínoch,

2) fragmentov, ktoré obsahujú funkčné domény presenilínových proteínov pre použitie vo väzbových štúdiách,

3) fragmentov presenilínových proteínov, ktoré môžu byť použité ako imunogény pre vznik protilátok proti presenilínovým proteínom, a

4) fragmenty presenilínov, ktoré môžu účinkovať ako kompetitívne inhibítory alebo ako napodobovači presenilínov

pre inhibíciu alebo napodobnenie ich fyziologických funkcií.

Nakoniec, takéto subsady môžu kódovať alebo reprezentovať komplementárne alebo antisenzne sekvencie, ktoré sa môžu hybridizovať na gény pre presenilíny alebo na presenilínové mRNA transkripty počas fyziologických podmienok pre inhibíciu transkripcie alebo translácie týchto sekvencií. Preto, v závislosti na zamýšľanom použití, predkladaný vynález poskytuje subsekvencie nukleových kyselín génov pre presenilíny, ktoré môžu mať dĺžku v rozsahu od 8 - 10 nukleotidov (napr. pre použitie ako PCR priméry) do takmer plnej veľkosti genómovej alebo cDNA. Takto predkladaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny obsahujúce sekvencie korešpondujúce aspoň 8 - 10 , lepšie 15 a najlepšie aspoň 20 susediacim nukleotidom génov pre presenilíny, ako sú tu opísané alebo inak poskytnuté, alebo ich komplementy. Ako bolo uvedené vyššie, nemenej , kratšie sekvencie môžu byť užitočné s inými technológiami.

V inej sérii uskutočnení predkladaný vynález poskytuje nukleové kyseliny, v ktorých sú sekvencie kódujúce presenilín, s alebo bez intrónov alebo rekombinantne spracované ako bolo opísané vyššie, operatívne pripojené na endogénne alebo exogénne 5' a/alebo 3' regulačné regióny. Endogénne regulačné regióny hPS1 génu sú tu opísané a detailne uvedené. Pomocou použitia predkladaného objavu a štandardných genetických techník (napr. PCR extenzia, cieleného "gene walking"), je odborník v odbore teraz taktiež schopný klonovania korešpondujúcich 5' a/alebo 3' endogénnych regulačných regiónov. Obdobne, alelické varianty hPS1 a hPS2 endogénnych regulačných regiónov, rovnako ako endogénne regulačné regióny z iných cicavčích homológov, sú podobne poskytnuté bez zbytočného experimentovania.

Alternatívne, exogénne regulačné regióny (t.j. regulačné regióny z iných konšpecifických génov alebo heterošpecifické regulačné regióny) môžu byť operatívne pripojené na sekvencie kódujúce presenilín tak, aby riadili expresiu. Vhodné 5' regulačné regióny budú zahrňovať promotorové elementy a môžu taktiež zahrňovať ďalšie elementy ako je operátorová alebo enhancerová sekvencia, ribozómová väzobná sekvencia, RNA čiapočkovacia sekvencia, a podobne. Regulačný región môže byť vybratý zo sekvencií, ktoré kontrolujú expresiu génov prokaryotických alebo

eukaryotických buniek, ich vírov alebo ich kombinácií. Takéto regulačné regióny obsahujú, ale nie sú obmedzené na , lac systém, trp systém, tac systém, a trc systém; hlavný operátor a promotorové regióny fágu lambda; kontrolný región fd obalového proteínu; skorý a neskorý promotor SV40; promotory odvodené od polyomavíru, adenovíru, retrovíru, bakulovíru a opičieho víru; 3-fosfoglycerát kinasový promotor; promotory kvasinkové kyslé fosfatázy; kvasinkové alfa-rozmnožovacie faktory; promotorové elementy iných eukaryotických génov exprimované v neurónoch alebo iných typoch buniek; a ich kombinácie. Predovšetkým môžu byť vybraté tie regulačné elementy, ktoré sú indukovateľné alebo reprivovateľné (napr. B-galaktosidasový promotor) pre umožnenie kontroly a/alebo manipulovateľnosti expresie génov pre presenilín v bunkách transformovaných týmito nukleovými kyselinami. Alternatívne môžu byť kódujúce regióny pre presenilín operatívne spojené s regulačnými elementami, ktoré umožňujú tkanivovo špecifickú expresiu v mnohobunkovom organizme. Takéto konštrukty sú predovšetkým užitočné pre produkciu transgénnych organizmov pre zabezpečenie expresie génov pre presenilín iba vo vhodných tkanivách. Voľba vhodných regulačných regiónov je v možnostiach odborníka a rekombinantné použitie mnohých takýchto regulačných regiónov je teraz v odbore zavedených.

V inej sérii uskutočnení predkladaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny kódujúce celé alebo časti presenilínových proteínov vo forme fúzného proteínu. V týchto uskutočneniach je regulačný región nukleovej kyseliny (endogénny alebo exogénny) operatívne pripojený na prvý kódujúci región, ktorý je kovalentne naviazaný v rámčeku na druhý kódujúci región. Druhý kódujúci región môže byť voliteľne naviazaný na jeden alebo viac ďalších kódujúcich regiónov a posledný kódujúci región je pripojený na terminačný kodón a, voliteľne, na vhodné 3' regulačné regióny (napr. polyadenylačné signály). Sekvencie pre presenilín vo fúznom proteíne môžu reprezentovať prvý, druhý alebo akýkoľvek ďalší kódujúci región. Sekvencie pre presenilín môžu byť konzervované alebo nekonzervované domény a môžu byť umiestnené v ktoromkoľvek kódujúcom regióne fúzie. Non-presenilínové sekvencie fúzie môžu byť vybrané podľa potreby a úvahy predvádzajúcej osoby a nie sú obmedzené predkladaným vynálezom. Užitočné non-presenilínové sekvencie, nemenej, zahŕňujú krátke sekvencie

"slučiek" ako sú antigénne determinanty alebo poly-His slučky, ktoré môžu byť použité pri purifikácii alebo identifikácii vzniknutého fúzneho proteínu. Alternatívne môže non-presenilínový kódujúci región kódovať veľký proteín alebo proteínový fragment, ako je enzým alebo väzobný proteín, ktorý môže taktiež asistovať pri identifikácii a purifikácii proteínu, alebo môže byť užitočný v testoch ako sú opísané ďalej. Jednotlivé predpokladané presenilínové fúzne proteíny zahrňujú poly-His a GST (glutathion S-transferasa) fúzie, ktoré sú užitočné pri izolácii a purifikácii presenilínov, a kvasinkovej dvojhybridovej fúzii, opísané ďalej, ktoré sú užitočné v testoch pre identifikáciu iných proteínov, ktoré sa viažu na alebo interagujú s presenilínmi.

V inej sérii uskutočnenia predkladaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny vo forme rekombinantných DNA konštruktov, v ktorých je markerový alebo reporterový gén (napr. -galaktosidáza, luciferáza) operatívne pripojený na 5' regulačný región génu pre presenilín tak, že expresia markerového génu je pod kontrolou regulačných sekvencií pre presenilín. Pomocou použitia regulačných regiónov pre presenilín opísaných alebo inak uvedených v predkladanom vynáleze, vrátane regulačných regiónov z PS1 a PS2 génov od ľudí alebo iných cicavčích druhov, je odborník v odbore teraz schopný produkovať takéto konštrukty. Ako je podrobnejšie uvedené ďalej, takéto izolované nukleové kyseliny môžu byť použité pre produkciu buniek, bunkových línií alebo transgénnych zvierat, ktoré sú užitočné pri identifikácii zlúčenín, ktoré môžu, priamo alebo nepriamo, rôzne ovplyvňovať expresiu presenilínov.

Konečne, izolované nukleové kyseliny podľa predkladaného vynálezu zahrňujú akúkoľvek z vyššie uvedených sekvencií, pokiaľ je obsiahnutá vo vektore. Vhodné vektory obsahujú klonovacie vektory a expresné vektory všetkých typov, vrátane plazmidov, fagemidov, kosmidov, epozómov a podobne, rovnako ako integračné vektory. Tieto vektory môžu taktiež obsahovať rôzne markerové gény (napr. gény pre rezistenciu alebo citlivosť na antibiotiká), ktoré sú užitočné pri identifikácii buniek úspešne transformovaných vektorom. Okrem toho, vektory môžu obsahovať regulačné sekvencie, na ktoré sú nukleové kyseliny podľa vynálezu operatívne pripojené a/alebo môžu taktiež obsahovať kódujúce

regióny tak, že nukleové kyseliny podľa vynálezu, pokiaľ sú vhodne ligované do vektoru, sú exprivované ako fúzne proteíny. Takéto vektory môžu taktiež obsahovať vektory pre použitie v kvasinkkovom "dvojhybridovom" bakulovírovom a fag-vystavenom systéme. Vektory môžu byť vybraté tak, aby boli použiteľné pre prokaryotnú, eukaryotnú alebo vírovú expresiu, ako je nevyhnutné alebo potrebné pre jednotlivé aplikácie. Napríklad, vektor víru vakcínie alebo vektor opičieho víru s SV40 promotorom (napr. pSV2), alebo Herpes simplex vírus alebo adenoasociovaný vírus môžu byť užitočné pre transfekciu cicavčích buniek vrátane neurónov v kultúre in vivo, a bakulovírový vektor môže byť použitý pri transfekcii buniek hmyzu (napr. buniek motýlov). Veľký počet rôznych vektorov je teraz komerčne dostupný a inak v odbore známy, a voľba vhodného vektoru je na schopnostiach a rozvahe odborníka.

2. V podstate čisté proteíny

Predkladaný vynález poskytuje v podstate čisté prípravky presenilínových proteínov, fragmentov presenilínových proteínov a fúzných proteínov obsahujúcich presenilíny alebo ich fragmenty. Proteíny, fragmenty a fúzie majú význam, ako je to tu opísané, pri generovaní protilátok k normálnym alebo mutantným presenilínom, v identifikácii väzbových proteínov pre presenilíny, a v diagnostických a terapeutických metódach. Preto, v závislosti na zamýšľanom použití, poskytuje predkladaný vynález v podstate čisté proteíny alebo peptidy obsahujúce aminokyselinové sekvencie, ktoré sú podsekvenciami kompletných presenilínových proteínov a ktoré môžu mať dĺžku v rozsahu 4 - 10 aminokyselín (napr. pre použitie ako imunogény), alebo 10 - 100 aminokyselín (napr. pre použitie v testoch väzby), kompletných presenilínových proteínov. Tak poskytuje predkladaný vynález v podstate čisté proteíny alebo peptidy obsahujúce sekvencie korešpondujúce aspoň 4 - 5, lepšie 6 - 10 a najlepšie aspoň 50 alebo 100 nasledujúcim aminokyselinám presenilínových proteínov, ako sú tu opísané alebo inak uvedené.

Proteíny alebo peptidy podľa predloženého vynálezu môžu byť izolované a purifikované akoukoľvek z mnohých metód vybraných na základe vlastností vykazovaných ich proteínovými sekvenciami.

Keďže majú presenilíny vlastnosti integrálnych alebo membránu preklenujúcich proteínov, môže byť membránová frakcia buniek, v ktorých je presenilín normálne vysoko exprivovaný (napr. neurónoch, oligodendroglíách, svaloch, slinivke) izolovaná a proteíny môžu byť extrahované, napríklad, solubilizáciou detergentom. Alternatívne môže byť presenilínový proteín, fúzny proteín alebo jeho fragment purifikovaný z buniek transformovaných alebo transfekovaných expresnými vektormi (napr. bakulovírovým systémom ako sú pPbac a pMbac vektory (Stratagene, La Jolla, CA); kvasinkovými expresnými systémami ako je pYESHIS Xpress vektor (Invitrogen, San Diego, CA); eukaryotickými expresnými systémami ako je pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), ktorý má konštantnú konštitutívnu expresiu, alebo LacSwitch (Stratagene, La Jolla, CA), ktorý je indukovateľný; alebo prokaryotnými expresnými vektormi ako je pKK233-3 (Clontech, Palo Alto, CA). Pri tej situácii, že proteín alebo fragmenty integrujú do endoplazmatického retikula alebo plazmatickej membrány rekombinantných buniek (napr. imortalizovaných ľudských bunečných línií alebo iných eukaryotických buniek), môže byť proteín purifikovaný z membránovej frakcie. Alternatívne, pokiaľ nie je proteín správne lokalizovaný alebo agreguje v inklúzných telieskach v rekombinantných bunkách (napr. prokaryotických bunkách), potom môže byť proteín purifikovaný z kompletného lysátu buniek alebo zo solubilizovaných inklúzných teliesok.

Purifikácia môže byť uskutočnená pomocou použitia štandardných techník purifikácie proteínov vrátane, ale nie len, gelovej filtračnej chromatografie, iontovej výmennej chromatografie, vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie /RP-HPLC, iontová výmenná HPLC, HPLC s vylučovaním podľa veľkosti, vysoko účinná chromatofokuzácia chromatografia, hydrofóbná interakčná chromatografia, imunoprecipitácia alebo imunofinitná purifikácia. Gelová elektroforéza (napr. PAGE, SDS-PAGE) môže byť taktiež použitá pre izolovanie proteínov alebo peptidov na základe ich molekulovej hmotnosti, charakteru náboja a hydrofobicity.

Presenilínový proteín, alebo jeho fragment môže byť taktiež konvenčne purifikovaný vytvorením fúzneho proteínu obsahujúceho požadovanú presenilínovú sekvenciu fúzovanú na iný peptid ako je antigénna determinanta alebo poly-His slučka (napr. QIAexpress

vektory, QIAGEN Corp. Chatsworth, CA), alebo väčší proteín (napr. GST využívajúci pGEX-27 vektor (Amrad, USA) alebo zelený fluorescentný proteín využívajúci Green Lantern vektor (Gibco/BRL. Gaithersburg, MD). Fúzny proteín môže byť exprivovaný a získaný z prokaryotických alebo eukaryotických buniek a môže byť purifikovaný pomocou použitia akejkoľvek štandardnej metódy založenej na sekvencii fúzného vektoru. Napríklad, fúzny proteín môže byť purifikovaný imunoafinitne alebo imunoprecipitačne s protilátkou k non-presenilínovej časti fúzie alebo, v prípade poly-His slučky, afinitnou väzbou na niklovú kolónu. Požadovaný presenilínový proteín alebo fragment môže potom byť ďalej purifikovaný z fúzného proteínu enzymatickým štiepením fúzného proteínu. Metódy na prípravu a použitie takýchto fúzných konštruktov pre purifikáciu proteínov sú v odbore dobre známe a niekoľko kitov pre tento účel je teraz komerčne dostupných. Vo svetle predkladaného vynálezu je teraz umožnené použitie takýchto fúzných konštruktov s presenilínmi.

3. Protilátky k presenilínom

Predkladaný vynález takto poskytuje protilátky a metódy pre výrobu protilátok, ktoré sa selektívne viažu na presenilínové proteíny alebo ich fragmenty. Predovšetkým, identifikovaním funkčných domén presenilínov a polymorfných regiónov asociovaných s AD poskytuje predkladaný vynález protilátky a metódy pre výrobu protilátok, ktoré sa budú selektívne viazať na a, preto, identifikovať a/alebo rozlišovať normálne a mutantné (t.j. patogénne) formy presenilínových proteínov. Protilátky podľa vynálezu majú použitie ako laboratórny reagens pre, inter alia, imunoafinitnú purifikáciu presenilínov, Western blotting pre identifikáciu buniek alebo tkanív exprivujúcich presenilíny a imunocytochemické alebo imunofluorescenčné techniky pre stanovenie subcelulárnej lokalizácie proteínu. Okrem toho, ako je opísané ďalej, protilátky podľa vynálezu môžu byť použité ako diagnostické nástroje pre identifikáciu nosičov presenilínových alel spojených s AD alebo ako terapeutický nástroj pre selektívnu väzbu a inhibíciu patogénnych foriem presenilínových proteínov in vivo.

Protilátky podľa predkladaného vynálezu môžu byť generované

pomocou použitia celých presenilínových proteínov podľa vynálezu alebo pomocou použitia akéhokoľvek presenilínového epitopu, ktorý je charakteristický pre tento proteín a ktorý je významne odlišný od ostatných hostiteľských proteínov. Takéto epitopy môžu byť identifikované, napríklad, porovnaním sekvencie 4 - 10 aminokyselinových zvyškov zo sekvencie pre presenilín s počítačovou databázou proteínových sekvencií od relevantného hostiteľa. Preferovane sú epitopy vybrané z N- a C- koncov, alebo zo slučkových domén, ktoré spájajú transmembránové domény proteínov. Konkrétne, predpokladá sa, že protilátky k polymorfnému N-terminálnemu regiónu, TM1->2 slučke alebo TM6->7 slučke majú fragment obsahujúci 310 - 314 epitopov môže obsahovať zvyšky 308 - 316, alebo 307 - 317. Taktiež väčšie fragmenty, obsahujúce napríklad celé funkčné domény alebo mnohotné funkčné domény (napr. TM1, TM1->2, a TM2 alebo TM6, TM6->7 a TM7) môžu byť taktiež preferované. Pre iné presenilínové proteíny (napr. pre mPS1 alebo pre iné non-ludské homológy, alebo pre PS1) môžu byť vybraté homológne miesta.

Presenilínové imunogénne prípravky môžu byť produkované zo surových extraktov (napr. membránové frakcie buniek vysoko exprivujúcich proteín), z proteínov alebo peptidov významne purifikovaných z buniek, ktoré ich rekombinantne alebo prirodzene exprivujú alebo, pre krátke imunogény, chemickou syntézou peptidov. Presenilínové imunogény môžu taktiež byť vo forme fúzných proteínov v ktorých je non-presenilínový región vybraný pre svoje adjuvantné vlastnosti. Ako je to tu použité, presenilínový imunogén by mal byť definovaný ako prípravok obsahujúci peptid obsahujúci aspoň 4 - 8, a lepšie aspoň 9 -15 nasledujúcich aminokyselinových zvyškov presenilínových proteínov, ako sú opísané alebo inak uvedené. Sekvencie s menšími zvyškami môžu, samozrejme, taktiež byť užitočné v závislosti na zamýšľanom použití a budúcom vývoji techniky. Preto, akékoľvek od presenilínov odvodené sekvencie, ktoré sú použité pre generovanie protilátok k presenilínom by mali byť považované za presenilínové imunogény.

Protilátky podľa vynálezu môžu byť polyklonálne alebo monoklonálne, alebo to môžu byť fragmenty protilátok, vrátane Fab fragmentov, $F(ab')_2$ a jednoreťazových fragmentov protilátok. Okrem

toho, na identifikáciu užitočných protilátok metódou podľa vynálezu, môžu byť generované rekombinantné protilátky, vrátane akýchkoľvek fragmentov protilátky uvedených vyššie, rovnako ako humanizované protilátky na základe non-ludských protilátok ku presenilínovým proteínom. Vo svetle predkladaných objavov presenilínových proteínov, rovnako ako charakterizovanie iných presenilínov ako je tu uvedené, môže odborník v odbore produkovať vyššie uvedené protilátky akýmkoľvek z mnohých štandardných prostriedkov v odbore dobre známych. Pre prehľad protilátkových techník, viď. Antibody Engineering: A Practical Guide, Borrebaek, ed., W.H. Freeman and Company, NY (1992), alebo Antibody Engineering, 2. vyd., Borrebaek, ed., Oxford University Press, Oxford (1995).

Všeobecne, polyklonálne protilátky môžu byť generované najprv imunizáciou myší, králikov, kôz alebo iných vhodných zvierat presenilínovým imunogénom vo vhodnom nosičovi. Pre zvýšenie imunogenicity prípravku môže byť imunogén pripojený na proteínový nosič alebo môže byť zmiešaný s adjuvans (napr. Freundovým adjuvans). Dosycovacie injekcie, i keď nie sú nevyhnutné, sú doporučované. Po vhodnej dobe pre umožnenie vývoja protilátkovej odpovedi, preferovane po niekoľkých týždňoch, môže byť zvieratám odobratá krv a sérum môže byť purifikované pre izolovanie imunoglobulínových zložiek.

Podobne, všeobecne, anti-presenilínové monoklonálne protilátky môžu byť produkované najprv injekovaním myší, králikov, kôz alebo iných vhodných zvierat presenilínovým imunogénom vo vhodnom nosičovi. Rovnako ako vyššie môže byť použitý proteínový nosič alebo adjuvans a dosycovacia injekcia (napr. dva- alebo trikrát týždenne počas 8 až 10 týždňov) sú doporučované. Po umožnení vývoja protilátkovej odpovedi sú zvieratá usmrtené a ich sleziny sú odstránené a resuspendované v, napríklad, fosfátom pufrovanom salinickom roztoku (PBS). Bunky sleziny slúžia ako zdroj lymfocitov, z ktorých niektoré produkujú protilátky vhodnej špecificity. Tieto bunky sú potom fúzované s imortalizovanou bunkovou líniou (napr. myelomovou) a produkty fúzie sú umiestnené do mnohých tkanivových kultivačných jamiek počas prítomnosti selektívneho agens ako je HAT. Jamky sú potom sériovo vyšetrované a znovu umiestnené na platne, kde sa vždy selektujú bunky

vytvárajúce požadovanú protilátku. Typicky je uskutočnených niekoľko vyšetrení a opakovaných umiestnení, pokiaľ viac ako 90% jamiek neobsahuje jeden klon, ktorý je pozitívny na produkciu protilátok. Monoklonálne protilátky produkované takýmito klonmi môžu byť purifikované štandardnými metódami ako je afinitná chromatografia pomocou použitia Protein A sepharozy, iontovou výmennou chromatografiou alebo variáciami a kombináciami týchto techník.

Protilátky podľa vynálezu môžu byť označené alebo konjugované s inými zlúčeninami alebo materiálmi pre diagnostické a/alebo terapeutické použitie. Napríklad, môžu byť naviazané na rádionuklidy, fluroscentné zlúčeniny alebo enzýmy pre zobrazenie alebo terapiu, alebo na lipozómy pre zacielenie zlúčenín obsiahnutých v lipozómoch na špecifické tkanivo.

4. Transformované bunkové línie.

Predkladaný vynález taktiež poskytuje bunky alebo bunkové línie, ako prokaryotické, tak eukaryotické, ktoré boli transformované nukleovými kyselinami podľa predkladaného vynálezu, čo spôsobilo klonálnu propagáciu týchto nukleových kyselín a/alebo expresiu proteínov alebo peptidov nimi kódovaných. Takto bunky alebo bunkové línie budú mať využitie nielen v propagácii a produkcii nukleových kyselín a proteínov podľa predkladaného vynálezu, ale taktiež, ako je opísané ďalej, ako modelové systémy pre diagnostické a terapeutické testy. Ako je tu použité, termín "transformované bunky" je mienený tak, aby zahrňoval akúkoľvek bunku, alebo potomstvo akejkoľvek bunky, do ktorej bola zavedená akákoľvek kyselina podľa predkladaného vynálezu, buď transformáciou, transfekciou, infekciou alebo inými prosriedkami. Metódy pre produkciu vhodných vektorov, transformovanie buniek týmito vektormi a identifikovanie transformantov sú dobre známe v odbore a sú tu iba stručne uvedené (viď. napr. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vydanie, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Prokaryotické bunky použiteľné pre produkciu transformovaných buniek podľa vynálezu zahrňujú členov bakteriálnych rodov *Escherichia* (napr. *E.coli*), *Pseudomonas* (napr. *P.aeruginosa*), a

GBacilus (napr. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*), rovnako ako mnoho iných a často v odbore používaných. Prokaryotické bunky sú predovšetkým užitočné pre produkciu veľkého množstva proteínov a peptidov podľa vynálezu (napr. normálnych a mutantných presenilínov, fragmentov presenilínov, fúzných proteínov presenilínov). Bakteriálne bunky (napr. *E. coli*) môžu byť použité v mnohých expresných vektorových systémoch vrátane, napr. plazmidov s T7 RNA polymaráza/promotor systémom, bakterifág lambda regulačnými sekvenciami, alebo M13 fág mGPI-2. Bakteriálni hostitelia môžu taktiež byť transformovaní fúznymi proteínovými vektormi, ktoré tvoria napr. *lacZ*, *trpE*, maltóza-väzobný proteín, poly-His slučky, alebo glutathion-S-transferáza fúzne proteíny. Všetky z týchto, rovnako ako mnoho iných prokaryotných expresných systémov, sú dobre známe v odbore a sú bežne komerčne dostupné (napr. pGEX-27 (Amrad, USA) pre GST fúzie).

Eukaryotné bunky a bunkové línie použiteľné pre produkciu transformovaných buniek podľa vynálezu zahrňujú cicavčie bunky a bunkové línie (napr. PC12, COS, CHO, fibroblasty, myelomové bunky, neuroblastómy, hybridómy, bunky ľudskej embryonálnej ľadviny 293, oocyty, embryonálne kmeňové bunky), bunkové línie hmyzu (napr. pomocou použitia bakulovírusového vektoru ako je pPbac alebo pMbac (Stratagene, La Jolla, CA), kvasinky (pomocou použitia kvasinkového expresného vektoru ako je pYESHIS (Invitrogen, CA), a huby. Eukaryotné bunky sú predovšetkým užitočné pre uskutočnenia, v ktorých je nevyhnutné, aby presenilínové proteíny, alebo ich funkčné fragmenty, vykonávali funkciu a/alebo podliehali intracelulárnym interakciám asociovaným s buď normálnymi, alebo mutantnými proteínmi. Tak, napríklad, transformované eukaryotické bunky sú preferované pre použitie ako modely funkcie alebo interakcie presenilínov a testy na vyšetrovanie kandidátov terapeutík preferovane využívajú transformované eukaryotické bunky.

Pre realizáciu expresie v eukaryotických bunkách môže byť vyvinutá rada vektorov a sú komerčne dostupné, ktoré umožňujú indukovateľnú (napr. LacSwitch expresné vektory, Stratagene, La Jolla, CA) alebo príbuznú (napr. pcDNA3 vektory, Invitrogén, Chatsworth, CA) expresiu presenilínových nukleotidových sekvencií pod reguláciou arteficiálneho promotorového elementu. Takéto

promotorové elementy sú často odvodené od CMV alebo SV40 vírových génov, i keď iné silné promotorové elementy, ktoré sú aktívne v eukaryotických bunkách môžu byť taktiež použité pre indukciu transkripcie presenilínových nukleotidových sekvencií. Typicky tieto vektory taktiež obsahujú arteficiálne polyadenylačné sekvencie a 3' UTR, ktoré môžu byť taktiež odvodené od exogénnych vírových génových sekvencií alebo od iných eukaryotických génov. Ďalej, v niektorých konštruktoch sú taktiež vo vektore obsiahnuté arteficiálne, nekódujúce, zostrihovateľné intróny a exóny pre posilnenie expresie požadovanej nukleotidovej sekvencie (v tomto prípade sekvencií pre presenilíny). Tieto expresné systémy sú bežne dostupné z komerčných zdrojov a sú typizované vektory ako je pCDNA3 a pZeoSV (Invitrogen, San Diego, CA). Obidva posledné vektory boli úspešne použité pre spôsobenie expresie presenilínových proteínov v transfektovaných COS, CHO a PC12 bunkách (Levesque et al, 1996). Nespočetne komerčne dostupných, rovnako ako na zákazku projektovaných vektorov je dostupných z komerčných zdrojov na umožnenie expresie akéhokoľvek požadovaného presenilínového transkriptu vo viacmenej akomkoľvek type buniek, buď konštitutívne, alebo po vystavení určitým exogénnym stimulom (napr. odstránenie tetracyklínu alebo expozície IPTG).

Vektory môžu byť zavedené do buniek príjemcu alebo do "hostiteľských" buniek rôznymi metódami dobre v odbore známymi vrátane, ale nielen, transfekciou fosforečnanom vápenatým, transfekciou fosforečnanom stroncia, DEAE dextranovej transfekcie, elektroporácie, lipofekcie (napr. Dosper Liposomal transfekčný reagens, Boehringer Mannheim, Germany), mikroinjekcie, balistická insercia na mikrogorálky, protoplastová fúzia alebo, pre vírové alebo fágové vektory, infekcia rekombinantným vírom alebo fágom.

5. Modely transgénnych zvierat.

Predkladaný vynález taktiež poskytuje produkciu transgénnych non-ludských zvieracích modelov pre štúdium Alzheimerovej choroby, pre vyšetrovanie kandidátov farmaceutických zlúčenín, pre vytvorenie explantovaných cicavčích CNS bunkových kultúr (napr. neuronálnych, gliálnych, organotypických alebo zmiešaných bunkových kultúr), v ktorých je mutantný alebo divoký typ

presenilínových sekvencií exdrirovany alebo v ktorých boli gény pre presenilín aktivované (napr. "knock-out" delece), a na hodnotenie potencionálnych terapeutických intervencií. Pred predkladaným vynálezom existoval čiastočný zvierací model pre Alzheimerovu chorobu prostredníctvom inzercie a nadmernej exprese mutantnej formy ľudského génu pre proteínový prekurzor amyloidu ako minigénu pod reguláciou promotorového elementu receptora pre doštičkový rastový faktor (Games et al., 1995). Tento mutant (APP₇₁₇, Val →Ile) spôsobuje objavenie synaptickéj patológie a depozit amyloidového peptidu v mozgu transgénnych zvierat nesúcich tento transgén vo veľkom množstve kópií. Tieto zmeny v mozgu transgénnych zvierat sú veľmi podobné tým, ktoré sú pozorované pre ľudskú AD (Games et al., 1995). Je stále nejasné, či sa tieto zvieratá stanú dementnými, ale existuje obecný konsenzus, že je teraz možné vytvoriť aspoň niektoré aspekty AD u myší.

Zvieracie druhy, ktoré sú vhodné na použitie vo zvieracích modeloch podľa predkladaného vynálezu zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na, krysy, myši, škrečkov, morčatá, králiky, psi, mačky, kozy, ovce, prasatá, a non-ľudské primáty (napr. opice Rhesus, šimpanzy). Pre použitie v počiatočných štúdiách sú preferovaní transgénni hlodavci (napr. myši) s ohľadom na relatívnu jednoduchosť covu a krátkemu životu. Okrem toho, ako bolo uvedené vyššie, transgénne kvasinky alebo bezstavovce (napr. hlísty, hmyz) môžu byť preferované pre niektoré štúdie, pretože umožňujú ešte rýchlejšie a lacnejšie vyšetovanie. Transgénni non-ľudský primáti môžu byť preferovaní pre dlhodobé štúdie vzhľadom k ich väčšej podobnosti k ľuďom a ich vyšším kognitívnym schopnostiam.

Pomocou použitia nukleových kyselín opísaných alebo inak uvedených v tomto vynáleze existuje niekoľko dostupných prístupov na vytvorenie transgénnych zvieracích modelov pre Alzheimerovu chorobu. Tak poskytnuté zvieracie modely zahŕňujú:

- 1) Zvieratá, u ktorých bol rekombinantne zavedený normálny ľudský gén pre presenilín do genómu ako ďalší gén, pod reguláciou buď exogénnych, alebo endogénnych promotorových elementov, a buď ako minigén, alebo ako väčší genómový fragment, u ktorých bol

normálny ľudský gén pre presenilín rekombinantne substituovaný za jednu alebo obidve kópie zvieracieho homológneho génu pre presenilín homológnu rekombináciou alebo zameraním génu; a/alebo u ktorých bola jedna alebo obidve kópie zvieracích homológnych génov pre presenilín rekombinantne "humanizovaná" čiastočnou substitúciou sekvencií kódujúcich ľudský homológ homológnu rekombináciou alebo zameraním génu. Tieto zvieratá sú užitočné pre hodnotenie účinku transgénnych postupov a účinkov zavedenia alebo substitúcie ľudských alebo humanizovaných génov pre presenilín.

2) Zvieratá, na ktorých bol rekombinantne zavedený mutantný (t.j.patogénny) ľudský gén na presenilín do genómu ako ďalší gén, pod reguláciou buď exogénnych, alebo endogénnych promotorových elementov, a buď ako minigén, alebo ako väčší genómový fragment; pri ktorých bol mutantný ľudský gén pre presenilín rekombinantne substituíovaný pre jednu alebo obidve kópie zvieracieho homológneho géna pre presenilín homológnu rekombináciu alebo zaameranie génu: alebo zameraním génu: a/alebo na ktorých bola jedna alebo dve kópie zvieracích homológnych génov pre presenilín rekombinantne "humanizovaná" čiastočnou substitúciou sekvencií kódujúcich mutantný ľudský homológ homológnej rekombinácie alebo zameraním na gén. Tieto zvieratá sú užitočné ako modely, ktoré budú ukazovať niektoré alebo všetky charakteristiky, na biochemickej, fyziologickej úrovni správania, ľudí majúcich jednu alebo viacej aliel, ktoré sú patogénne pre Alzheimerovú chorobu alebo iné ochorenia asociované s génmi pre presenilín.

3) Zvieratá na ktorých bola rekombinantne zavedená mutantná verzia jedného zo zvieracích génov pre presenilín (majúce, napríklad, špecifickú mutáciu korešpondujúcu, alebo podobnú, jednej z patogénnych mutácií ľudských presenilínov) do genómu ako ďalší gén, pod reguláciou buď exogénnych, alebo endogénnych promotorových elementov, a buď ako minigén, alebo ako väčší genómový fragment, a/alebo pri ktorých bola mutantná verzia jedného zo zvieracích génov pre presenilín (napr. majúca špecifickú mutáciu korešpondujúcu, alebo podobnú, jednej z patogénnych mutácií ľudských presenilínov) rekombinantne substituovaná pre jednu alebo obidve kópie zvieracieho homológneho génu pre presenilín homológny rekombinácii alebo

zameraním génu. Tieto zvieratá sú užitočné ako modely, ktoré budú ukazovať niektoré alebo všetky charakteristiky, na biochemickej, fyziologickej úrovni alebo na úrovni chovania, ľudí majúcich jednu alebo viacej aliely, ktoré sú patogénne pre Alzheimerovú chorobu alebo iné ochorenia asociované s génami pre presenilín.

4) "Knock-out" zvierat, na ktorých bola jedna alebo obidve kópie génov pre zvierací presenilín parciálne alebo kompletne deletovaná homológna rekombináciou alebo zameraním génu, alebo bola inaktivovaná inzerciou alebo substitúciou exogénnej sekvencie homologickej rekombinácie alebo zameraním génu exogénnej sekvencie (napr. stop kodónu, lox p miest). Takéto zvieratá sú použiteľné ako modely pre štúdium účinkov, ktoré môžu mať stratu expresie génu pre presenilín, pre hodnotenie toho, či strata funkcie je preferovateľná pre pokračovanie expresie mutantných foriem a pre vyšetrenie toho, či môžu byť vyvolané iné gény pre nahradenie mutantných presenilínov (napr. substitúcie PS1 PS2) alebo pre intervenciu s účinkami iných génov (napr. APP alebo ApoE ϵ) spôsobujúcich AD pre liečbu AD a iných chorôb. Napríklad normálny gén pre presenilín môže byť nevyhnutný pre účinok mutantných APP génov pre ich aktuálne vyjadrenie ako AD a, preto, transgénne presenilínové zvieracie modely môžu byť užitočné v hodnotení takýchto mnogogénových interakcií.

Pre vytvorenie zvieracieho modelu (napr. transgénne myši) môže byť normálny alebo mutantný gén pre presenilín (napr. normálny alebo mutantný hPS1, mPS1, hPS2, mPS2 atď.), alebo normálna mutantná verzia rekombinantnej nukleovej kyseliny kódujúcej aspoň funkčnú doménu presenilínu (napríklad rekombinantný konštrukt obsahujúci mPS1 sekvenciu, do ktorej bola substituovaná nukleotidová sekvencia korešpondujúca ľudské mutantné sekvencie) inzertovaná do buniek zárodočnej línie alebo do kmeňových buniek pomocou použitia štandardných techník mikroinjekcie do oocyty, alebo transfekcie alebo mikroinjekcia do embryálnych kmeňových buniek. Zvieratá produkované týmito alebo podobnými procesmi sú označované ako transgénne. Podobne, pokiaľ je vyžadované inaktivovať alebo nahradiť endogénny gén pre presenilín, môže byť použitá homológna rekombinácia pomocou použitia embryonálnych kmeňových buniek. Zvieratá produkované týmito alebo podobnými

procesmi sú označované ako transgénne. Podobne, pokiaľ sa vyžaduje inaktivovať alebo nahradiť endogénny gén pre presenilín, môže byť použitá homológna rekombinácia pomocou použitia embryonálnych kmeňových buniek. Zvieratá produkované týmito alebo podobnými procesmi sú označované ako "knock-out" (inaktivovácia) alebo "knock-in" (nahradenie) modely.

Pre injikovanie do oocyту môže byť jedna alebo viacej kópií rekombinantných DNA konštruktov podľa predkladaného vynálezu insertovaná do pronuklea práve fertilizovaného oocytu. Tento oocyt je potom reimplantovaný do pseudo-tehotnej náhradnej matky. Živo narodené zvieratá sú vyšetrované na intergranty pomocou použitia analýzy DNA (napr. z chvostových žíl myšieho potomstva) na prítomnosť insertovaných rekombinantných transgénnych sekvencií. Transgéны môžu byť buď kompletne genómové sekvencie injikované ako YAC, BAC, PAC alebo iné chromozomálne DNA fragmenty, cDNA s buď prirodzeným promotorom alebo s heterológnym promotorom, alebo minigén obsahujúci všetky kódujúce regióny alebo iné elementy, ktoré sú nevyhnutné pre optimálnu expresiu.

Retrovírová infekcia skorých embryí môže byť taktiež vykonaná pre inzerciu rekombinantných DNA konštruktov podľa vynálezu. V tejto metóde je transgén (napr. normálny alebo mutantný hPS1 alebo PS2 sekvencie) inzertovaný do retrovírového vektora, ktorý je použitý pre infikovanie embryí (napr. myších alebo embryí non-ludských primátov) priamo v priebehu ranných štádií vývoja počas generovania chimér, z ktorých niektoré smerujú k transmisii zárodočnej línie.

Homológna rekombinácia pomocou použitia kmeňových buniek umožňuje vyšetrovanie buniek s preneseným génom pre identifikovanie vzácnych homológnych rekombinácií. Pokiaľ sú identifikované, môžu byť použité pre generovanie chimér pomocou injikovania blastocýst a časť vzniknutých zvierat bude vykazovať transmisiu zárodočnej línie z rekombinantnej línie. Táto metóda je zrejme užitočná, pokiaľ je požadovaná inaktivácia génu pre presenilín. Napríklad, inaktivácia mPS1 génu na myšiach môže byť uskutočnená projektovaním DNA fragmentu, ktorý obsahuje sekvencie y mPS1 exónu spolu so selektovateľným markerom. Homológna

rekombinácia vedie k insercii markerovej sekvencie do prostriedku exónu, čím spôsobí inaktiváciu mPS1 génu/alebo delecii vnútorných sekvencií. DNA analýzy jednotlivých klonov môže potom byť použitá pre rozpoznanie homológnej rekombinácie.

Techniky pre generovanie transgénnych zvierat, rovnako ako techniky pre homológnu rekombináciu alebo pre zameranie génu, sú široko akceptovateľné a realizované. Je dostupný laboratórny manuál pre manipuláciu s myšimi embryami, napríklad, ktorý podrobne opisuje štandardné laboratorné techniky pre produkciu transgénnych myší (Hoga et al., 1986). Pre vytvorenie transgénu je vyžadovaná cieľová sekvencia (napr. mutantná alebo prirodzená sekvencia pre presenilín) typicky ligovaná do klonovacieho miesta umiestneného downstream od istého promotorového elementu, ktorý bude regulovať expresiu RNA zo sekvencie pre presenilín. Downstream od sekvencie pre presenilín je typicky arteficiálna polyadenylačná sekvencia. V transgénnych modeloch, ktoré boli použité pre úspešné vytvorenie zvierat, ktoré napodobňujú aspekty dedičných ľudských neurodegeneratívnych ochorení, boli najúspešnejšie promotorové elementy promotor génu pre β podjednotku receptora pre doštičkový rastový a škrečkový promotor génu pre prionový proteín, i keď iné promotorové elementy, ktoré riadia expresiu v bunkách centrálného nervového systému môžu byť taktiež užitočné. Alternatívnym prístupom pre vytvorenie transgénu je použitie endogenného presenilínového promotora a regulačných sekvencií pre riadenie expresie presenilínového transgénu. Nakoniec, je možné vytvoriť transgén pomocou použitia veľkých genómových DNA fragmentov ako sú YAC, ktoré obsahujú celý gén pre presenilín rovnako ako jeho vhodné regulačné sekvencie. Takéto konštrukty boli s úspechom použité pre riadenie ľudskej APP expresie v transgénnych myšiach (Lamb et al., 1993).

Zvieracie modely môžu byť taktiež vytvorené zameraním endogenného génu pre presenilín tak, aby sa alternovala endogenná sekvencia pre presenilín homológnu rekombináciou. Toto zacielenie môže mať za následok odstránenie endogénnej sekvencie (knock-out) alebo pozmenenie endogénnej sekvencie za vytvorenie aminokyselinovej zmeny asociovej s ľudským onemocnením alebo inak abnormálna sekvencia (napr. sekvencia, ktorá je viac podobná ľudskej sekvencii ako pôvodná zvieracia sekvencia) (knock-in

zvieracie modely). Je dostupné veľké množstvo vektorov pre vykonanie tohoto a taktiež dostupné vhodné zdroje genómovej DNA pre myšie a iné zvieracie genómy, ktoré môžu byť zamerané, od spoločností AKO JE Genome Systems Inc. (St. Louis, Missouri, USA). Typickou vlastnosťou týchto zameriavacích vektorových konštruktov je to, že 2 až 4 kb genómovej DNA je ligované 5' na selektovateľný marker (napr. bakteriálny gén pre rezistenciu na neomycín pod kontrolou jeho vlastného promotorového elementu nazývaného "neomycínová kazeta"). Druhý DNA fragment z požadovaného génu je potom ligovaný downstream od neomycínovej kazety, ale upstream od druhého selektovateľného markeru (napr. thymidin kinázy). DNA fragmenty sú vybrané tak, že mutantné sekvencie môžu byť zavedené do zárodočnej línie zameraného zvieraťa homológny nahradením endogénnych sekvencií jednej zo sekvencií obsiahnutých vo vektore. Alternatívne, sekvencia môže byť vybratá tak, aby spôsobila delecii sekvencie, ktorá je normálne umiestnená medzi ľavým a pravým ramenom vektora obklopujúcom neomycínovú kazetu. Prvý je známy ako knock in, druhý je známy ako knock-out. Opäť, nespočetnosť modelových systémov bolo vytvorených, zrejme pre zameranie knock-outu génov obsahujúcich tie, ktoré sú relevantné ku neurodegeneratívnym ochoreniam (napr. zameranie deliaceho myšieho APP génu Zhengem et al., 1995, zameranie deliaceho myšieho prionového génu asociovaného s degeneráciou CNS pri ľuďoch s nástupom v dospelosti, ktoré vykonal Bueler et al., 1996).

Nakoniec, ekvivalenty transgénnych zvierat, vrátane zvierat s mutovanými alebo inaktivovanými génmi pre presenilín, môžu byť produkované pomocou použitia chemickej alebo rentgenovej mutagenézy gamiet, nasledovanej oplodnením. Pomocou použitia izolovaných nukleových kyselín, ktoré sú tu opísané alebo inak dané, môže odborník v odbore rýchle vyšetriť vzniknuté potomstvo pomocou, napríklad priameho sekvencovania, RFLP, PCR, alebo hybridizačnej analýzy pre detektovanie mutantov, alebo Southern blottingu pre demonštrovanie straty jednej alely dávkou.

6. Testy pre liečivá, ktoré ovplyvňujú expresiu presenilínu.

V inej sérii realizácie predkladaný vynález poskytuje testy pre identifikáciu malých molekúl alebo iných zlúčenín, ktoré sú

schopné indukcie alebo inhibície expresie presenilínových génov alebo proteínov (napr. PS1 alebo PS2). Testy môžu byť vykonané in vitro pomocou použitia netransformovaných buniek, immortalizovaných bunčkových línií alebo rekombinantných bunčkových línií, alebo in vivo pomocou použitia transgénnych zvieracích modelov, ktoré sú tu dané.

Konkrétne, testy môžu detektovať prítomnosť zvýšenej alebo zníženej expresie PS1, PS2 alebo iných s presenilínmi spojených génov alebo proteínov na základe zvýšenej alebo zníženej expresie mRNA (pomocou použitia, napr., prob nukleových kyselín, ktoré sú tu opísané), zvýšenej alebo zníženej hladiny PS1, PS2 alebo iných s presenilínmi príbuzných proteínových produktov (pomocou použitia, napr. antipresenilínových protilátok, ktoré sú tu opísané), alebo zvýšenej alebo zníženej expresie markerového génu (napr. β galaktosidázy alebo luciferázy) operatívne pripojeného k presenilín 5' regulačnému regiónu v rekombinantnom konštrukte.

Tak, napríklad, je možné kultivovať bunky, o ktorých je známe, že exprimujú určitý presenilín a pridať do kultivačného média jednu alebo viacej testovaných zlúčenín. Po ponechaní dostatočne dlhej doby (napr. 0 - 72 hodín) pre to, aby sa mohla zlúčenina indukovať alebo inhibovať expresiu presenilínu môže byť akákoľvek zmena v expresii od stanovenej hladiny detekovaná pomocou použitia akékoľvek techniky opísanej vyššie a v odbore známej. V jednotlivých preferovaných uskutočneniach sú bunky z immortalizovanej bunčovej línie ako je ľudská neuroblastomová, glioblastomová alebo hybridomná bunčová línia. Pomocou použitia prob nukleových kyselín a/alebo protilátok opísaných v tomto vynáleze je detekcia zmien v expresii presenilínov, a tak identifikácia zlúčenín, ktoré indukujú alebo reprimujú expresiu presenilínov, iba rutinným experimentovaním.

V jednotlivých preferovaných uskutočneniach je využitý rekombinantný test, v ktorom je repertovaný gén ako -galaktosidáza, zelený fluorescentný proteín, alkalická fosfatáza alebo luciferáza operatívne pripojený na 5' regulačné regióny génov pre presenilín. Preferované vektory zahrňujú Green Lantern 1 vektor (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) a Great ASCAPE pSEAP vektor (Clontech, Palo Alto). hPS1 regulačné regióny tu

opísané, alebo iné presenilínové regulačné regióny, môžu byť ľahko izolované a klonované odborníkom vo svetle predkladaných objavov kódujúcich regionov týchto génov. Reporterový gén a regulačné regióny sú pripojené v rámci (alebo v jednom z troch možných čitateľných rámcov) tak, že transkripcia a translácia reporterového géna môže prebehnúť pod kontrolou regulačných elementov pre presenilín. Rekombinantný konštrukt môže potom byť zavedený do akéhokoľvek vhodného typu buniek, i keď cicavčie bunky sú preferované, a ľudské bunky sú najviac preferované. Transformované bunky môžu byť kultivované v kultúre a, po stanovení základnej hladiny expresie reportérového génu, môže byť testovaná zlúčenina do média. Ľahká detekcia expresie reportérového génu poskytuje rýchly, vysoko dokonalý test pre identifikáciu induktorov a represorov génu pre presenilín.

Zlúčeniny identifikované touto metódou budú mať potenciálne použitie pri modifikácii expresie PS1, PS2 alebo iných s presenilínmi spojených génov in vivo. Tieto zlúčeniny môžu byť ďalej testované na zvieracích modeloch tu opísaných pre identifikáciu tých zlúčenín, ktoré majú najsilnejší in vivo účinok. Okrem toho, ako je to tu opísané s ohľadom na malé molekuly majúce väzbovú aktivitu pre presenilíny, môžu tieto molekuly slúžiť ako "úvodné zlúčeniny" pre ďalší vývoj farmaceutických zlúčenín, napríklad, podrobením týchto zlúčenín sekvenčným modifikáciám, molekulárnemu modelovaniu a iným bežným postupom využívaným pri racionálnom vývoji liečiv.

7. Identifikácia zlúčenín s väzbovou kapacitou pre presenilín

Vo svetle predkladaných objavov bude odborník v odbore schopný vykonávať nové vyšetrovacie metódy pre identifikáciu proteínov a iných zlúčenín, ktoré sa viažu na, alebo inak interagujú s presenilínmi. Proteíny a zlúčeniny budú zahrňovať endogénne bunkové zložky, ktoré interagujú s presenilínmi in vivo a ktoré preto poskytujú nové ciele pre farmaceutické a terapeutické intervencie, rovnako ako budú zahrňovať rekombinantné, syntetické a iné exogénne zlúčeniny, ktoré môžu mať väzbovú kapacitu pre presenilín a preto môžu byť kandidátmi na farmaceutický agens. Tak, v jednej sérii uskutočnení, bunkové lysáty alebo tkanivové homogenizáty (napr. homogenizát ľudského mozgu, lyzát lymfocytu)

môže byť vyšetrovaný na proteíny alebo iné zlúčeniny, ktoré sa viažu na normálny alebo mutantný presenilín.

Alternatívne, akákoľvek z mnohých exogénnych zlúčenín, prirodzene sa vyskytujúca a/alebo syntetická (napr. knižnice malých molekúl alebo peptidov) môže byť vyšetrovaná na väzbovú aktivitu pre presenilín. Malé molekuly sú v tomto kontexte najmä preferované, pretože môžu byť lepšie absorbované pre orálne podávanie, majú menej potenciálnych antigénnych determinantov a/alebo s väčšou pravdepodobnosťou prekonávajú hematencefalickú bariéru ako väčšie molekuly ako sú nukleové kyseliny alebo proteíny. Metódy podľa predkladaného vynálezu sú najmä užitočné v tom, že môžu byť použité pre identifikáciu molekúl, ktoré sa selektívne alebo preferovane viažu na mutantnú formu presenilínového proteínu (viac ako na normálnu formu a preto môžu mať najmä význam v liečbe heterozygotných obetí tejto dominantnej autosomálnej choroby).

Pretože normálne fyziologické role PS1 a PS2 sú doteraz neznáme, môžu mať zlúčeniny, ktoré sa viažu na normálne, mutantné alebo na obidve formy týchto presenilínov využitie v liečbe a diagnostike. Zlúčeniny, ktoré sa viažu iba na normálny presenilín môžu, napríklad, účinkovať ako enhancery ich normálnej aktivity a preto aspoň čiastočne kompenzovať stratenú alebo neprítomnú aktivitu mutantných foriem presenilínov pri obetiach Alzheimerovej choroby. Zlúčeniny, ktoré sa viažu ako na normálne, tak na mutantné formy presenilínov môžu byť užitočné, pokiaľ rôzne ovplyvňujú aktivitu dvoch foriem tak, že zmierňujú celkovú odchýlku do normálnej funkcie. Alternatívne, blokovanie aktivít ako normálnych, tak mutantných foriem ako PS1, tak PS2 môže mať menej vážne fyziologické a klinické následky ako normálna progresia choroby a preto zlúčeniny, ktoré sa viažu na a inhibujú ako normálne, tak mutantné formy presenilínov, môžu byť terapeuticky použiteľné. Preferovane sú, predovšetkým, identifikované zlúčeniny, ktoré majú vyššiu väzbovú afinitu k mutantným presenilínom ako k normálnym presenilínom (napr. aspoň 2 - 10 krát vyššie K_d) a ktoré selektívne alebo preferovane inhibujú aktivitu mutantnej formy. Takéto zlúčeniny môžu byť identifikované pomocou použitia akýchkoľvek techník tu opísaných a potom porovnaním väzbových afínít pre normálne a mutantné formy PS1 a PS2 zlúčeniny, ktorá je kandidátom.

Účinok agens, ktoré sa viažu na presenilíny (normálne alebo mutantné formy) môžu byť monitorované buď priamym monitorovaním tejto väzby pomocou použitia prístroja (napr. BIAcore, LKB Pharmacia,. Sweden) pre detekciu tejto väzby, napríklad, podľa zmeny vo fluorscencii, podľa molekulovej hmotnosti alebo podľa koncentrácie alebo väzbového agens alebo presenilínovej zložky, alebo v rozpustnej fáze alebo v na substrát viazanej fáze.

Po identifikáciu metódou opísanou vyššie môže byť zlúčenina, ktorá je kandidátom produkovaná v množstvách dostatočných pre farmaceutické podanie a testovanie (napr. g alebo mg alebo väčšie množstvo) a môže byť formulovaná vo farmaceuticky akceptovateľných nosičoch (viď.napr. Remington's Pharmaceutical sciences, Gennaro, A., vyd., Mack Pub., 1990). Títo kandidáti zlúčenín môžu potom byť predložený k transformovaným buňkám podľa vynálezu, k transgenným zvieracim modelom podľa vynálezu, k buňkovým líniam odvodeným od zvieracích modelov alebo od ľudských pacientov alebo pacientom trpiacim Alzheimerovou chorobou. Zvieracie modely tu opísané sú najmä užitočné v testovaní kandidátových zlúčenín, ktoré sa viažu na normálny alebo mutantný presenilín na ich terapeutickú účinnosť.

Okrem toho, po identifikácii metódou opísanou vyššie môže zlúčenina, ktorá je kandidátom, slúžiť taktiež ako "úvodná zlúčenina" v projektovaní a vývoji nových liečív. Napríklad, ako je odbore dobre známe, sekvenčné modifikácie malých molekúl (napr. nahradenie aminokyselínového zvyšku s peptidmi, nahradenie funkčných skupín peptidovými alebo non-peptidovými zlúčeninami) je štandardný prístup vo farmaceutickom priemysle pre vývoj nových farmaceutických zlúčenín. Takýto vývoj všeobecne prebieha od " úvodnej zlúčeniny", o ktorej je známe, že má aspoň neakú aktivitu (napr. väzbu na PS1 alebo blokovaciu schopnosť) vyžadovanej farmaceutickej látky. Konkrétne, pokiaľ je identifikovaná jedna alebo viacej zlúčenín, ktoré majú aspoň dajakú vyžadovanú aktivitu (napr. moduláciu aktivity presenilínu), potom môže štruktúálne porovnanie molekúl značne informovať odborníka naznačením častí úvodných zlúčenín, ktoré by mali byť konzervované a častí, ktoré môžu byť zamieňané pri rojektovaní novej kandidátovej zlúčeniny. Tak poskytuje predkladaný vynález taktiež prostriedky pre identifikáciu úvodných zlúčenín, ktoré

môžu byť sekvenčne modifikované počas produkcie nových kandidátových zlúčenín pre použitie v liečbe Alzheimerovej choroby. Tieto nové zlúčeniny potom môžu byť testované ako na väzbu na presenilín, tak na blokovanie (napr. v testoch väzby opísaných vyššie) a na terapeutickú účinnosť (napr. na zvieracích modeloch tu opísaných. Tento postup môže byť opakovaný dokiaľ nie sú identifikované zlúčeniny, ktoré majú požadovanú terapeutickú aktivitu a/alebo účinnosť.

V každej prezentovanej sérii uskutočnení je vykonaný test pre detekciu väzby medzi "presenilínovou zložkou" a dajakou inou skupinou. Predovšetkým užitočné budú sekvenčné testy, v ktorých sú zlúčeniny testované na schopnosť väzby na iba normálne alebo na iba mutantné formy presenilínových funkčných domén pomocou použitia mutantných a normálnych presenilínových zložiek vo väzbovom teste. Pri takýchto zlúčeninách sa očakáva, že budú mať najväčší terapeutický účinok, ako je podrobne opísané ďalej.

"Presenilínovou zložkou" v teste môže byť kompletná normálna alebo mutantná forma presenilínového proteínu (napr. hPS1 alebo hPS2 varianta), ale nemusí byť. Skôr môžu byť využité jednotlivé funkčné domény presenilínov, ako boli opísané vyššie, buď ako separátne molekuly alebo ako časť fúzneho proteínu. Napríklad pre izoláciu proteínov a zlúčenín, ktoré interagujú s týmito funkčnými doménami môže byť vyšetrenie uskutočnené pomocou použitia fúznych konštruktov a/alebo syntetických peptidov korešpondujúcich k týmto regiónom. tak, pre PS2, môžu byť vyrobené GST-fúzne peptidy obsahujúce sekvencie korešpondujúce približne aminokyselinám 1 až 87 (N-koniec), alebo 269 - 387 (TM6->7 slučka), alebo akýmkoľvek iným vyžadovaným konzervovaným doménam. Pre kračšie funkčné domény môže byť produkován syntetický peptid korešpondujúci, napríklad, približne aminokyselinám 107 až 134 (TM1 ->2 slučka). Podobne, pre PS1, môžu byť vyrobené GST- alebo iné fúzne peptidy obsahujúce sekvencie korešpondujúce približne aminokyselinám 1 až 81 (N-koniec), alebo 266 - 410 (TM6->7 slučka), alebo syntetické peptidy korešpondujúce, napríklad, približne aminokyselinám 101 až 131 (TM1->2 slučka). Voliteľne, sú možné rôzne kombinácie fúznych proteínov a presenilínových funkčných domén a tu sú uvedené mnohé príklady. Okrem toho, funkčné domény môžu byť pozmenené pre tento test, napríklad, zavedením reaktívnej skupiny alebo aminokyselinového zvyšku (napr. cysteínu) do funkčnej domény, aby sa uľahčila imobilizácia

domény na substráte (napr. za použitie sulfhydrylových reakcií). Tak bol napríklad syntetizovaný TM1->2 slučkový fragment (31-mer) obsahujúci ďalší C- terminálny cysteinový zvyšok. Tento peptid bol použitý pre vytvorenie afinitného substrátu pre afinitnú chromatografiu (Sulfo-link, Pierce! pre izoláciu väzbových proteínov pre mikrosekvencovanie. Podobne môžu byť vytvorené iné funkčné domény alebo antigénne fragmenty s modifikovanými zvyškami (viď., napr. príklad 10).

Proteíny a iné zlúčeniny identifikované týmito metódami môžu byť purifikované a charakterizované akýmikoľvek štandardnými metódami známymi v odbore. Proteíny môžu, napríklad, byť purifikované a separované pomocou použitia elektroforetických (napr. SDS-PAGE, 2D-PAGE) alebo chromatografických (napr. HPLC) techník a môžu potom byť mikrosekvencované. Pre proteíny s blokovaným N-koncom je použité štiepenie (napr. CNBr a/alebo trypsinom) určitého väzbového proteínu pre uvoľnenie peptidových fragmentov.

Nasledujúca purifikácia/charakterizácia HPLC a mikrosekvencovaním a/alebo spektrometriou hmoty konvenčnými metódami poskytuje dáta vnútornej sekvencie takýchto blokovaných proteínov. Pre neproteínové zlúčeniny môžu byť použité štandardné analytické techniky organickej chémie (napr. IR, NMR a hmotová spektrometria, analýzy funkčných skupín, rentgenová kryštalografia) pre určenie ich štruktúry a identity.

Metódy pre vyšetrenie bunkových lysátov, tkanivových homogenizátov, alebo knižníc malých molekúl na kandidáty väzbových molekúl pre presenilíny sú v odbore dobre známe a, vo svetle predkladaného objavu môžu byť teraz využité pre identifikáciu zlúčenín, ktoré sa viažu na normálne alebo mutantné presenilínové zložky alebo ktoré modulujú aktivitu presenilínu ako je definovaná nešpecifickými meraniami (napr. zmenami intracelulárneho Ca^{2+} , pomeru GTP/GDP) alebo špecifickými meraniami (napr. zmena v A β peptidovej produkcii alebo zmenami v expresii iných downstream génov, ktoré môžu byť monitorované rôznymi metódami, 2D gélovou elektroforézou, rôznou hybridizáciou alebo SAGE metódami). Preferované metódy obsahujú variácie nasledujúcich techník:

- 1) priame extrakcie afinitnej chromatografie
- 2) ko-izoláciu presenilínových zložiek a naviazaných proteínov

alebo iných zlúčenín imunoprecipitáciou,

- 3) Biomolecular Interaction Assay (BiaCore), a
- 4) kvasinkových dvojhybridových systémov

A. Afinitná chromatografia

Vo svetle predkladaných objavov môže byť využitých mnoho afinitných väzbových techník známych v odbore pre izoláciu proteínov alebo iných zlúčenín, ktoré sa viažu na presenilíny tu opísané. Všeobecne, presenilínová zložka musí byť imobilizovaná na substráte (napr. kolone alebo filtri) a roztok obsahujúci testovanú zlúčeninu je uvedený do kontaktu s presenilínovým proteínom, fúziou alebo fragmentom za podmienok, ktoré sú permissívne pre väzbu. Substrát je potom premytý roztokom pre odstránenie nenáväzných alebo slabo naviazaných molekúl.

Druhé premytie môže potom eluovať tie zlúčeniny, ktoré sa silne viažu na imobilizované normálne alebo mutantné presenilínové zložky. Alternatívne, testované zlúčeniny môžu byť imobilizované a roztok obsahujú jednu alebo viacej zložiek presenilínov môže byť uvedený do kontaktu s kolónou, filtrom alebo iným substrátom. Schopnosť presenilínových zložiek viazať sa na testované zlúčeniny môže byť určená rovnako, ako bolo uvedené vyššie alebo môže byť použitá označená forma presenilínovej zložky (napr. radiozaučená alebo chemiluminiscentná funkčná doména) pre rýchlejšie hodnotenie väzby na substráte imobilizovaných zlúčenín. Okrem toho, pretože ako o PS1, tak o PS2 sa posudzuje, že to sú s membránou asociované proteíny, môže byť preferované, aby presenilínové proteíny, fúzie alebo fragmenty boli inkorporované do lipidových dvojvrstiev (napr. lipozómu) pre navodenie ich správneho zloženia. Toto predovšetkým platí, pokiaľ je použitá presenilínová zložka obsahujúca aspoň jednu transmembránovú doménu. Takéto presenilín-lipozómy môžu byť imobilizované na substrátoch (buď priamo alebo prostredníctvom iného elementu v lipozómovej membráne), môžu prechádzať cez substrát s imobilizovanými testovanými zlúčeninami, alebo môžu byť použité v akejkoľvek z mnohých dobre známych väzbových testov pre membránové proteíny. Alternatívne môže byť presenilínová zložka izolovaná v membránovej frakcii z buniek produkujúcich zložku a táto membránová frakcia môže byť použitá vo väzbovom teste.

B. Ko-imunoprecipitácia

Inou dobre charakterizovanou technikou pre izoláciu presenilínových zložiek a ich asociovaných proteínov alebo iných zlúčenín je priama imunoprecipitácia s protilátkami. Táto technika bola úspešne použitá so synpatickými vačkami (Phizicky and Fields, 1994). Tak, buď normálne alebo mutantné, voľné alebo membránovo viazané zložky presenilínov môžu byť zmiešané v roztoku so zlúčeninami, ktoré sú kandidátmi, za podmienok, ktoré sú premisívne pre väzbu a presenilínové zložky môžu byť imunoprecipitované štandardnými technikami ako je opísané vyššie. Všeobecné techniky pre imunoprecipitáciu môžu sa nachádzať v, napríklad, Harlow and Lane, (1998) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Protilátky použité v tomto teste, ako je to tu opísané, môžu byť polyklonálne alebo monoklonálne, a zahrňujú rôzne fragmenty protilátok (napr. Fab, $F(ab^1)_2$), rovnako ako jednoreťazcové protilátky a podobne.

C. Biomolecular Interaction Assay

Inou použiteľnou metódou pre detekciu a izoláciu väzbových proteínov je Biomolecular Interaction Assay alebo "BAIcore" systém vyvinutý Pharmacia Biosensor a opísaný v protokole výrobcu (LKB Pharmacia, Sweden). Vo svetle predkladaného vynálezu je odborník teraz schopný využiť tento systém, alebo systém v podstate ekvivalentný, pre identifikáciu proteínu alebo iných zlúčenín majúcich väzbovú kapacitu pre presenilíny. BIAcore systém využíva afinitne purifikované anti-GST protilátky pre imobilizáciu GST-fúzných proteínov na senzorovom čípe. Voliteľne, iné fúzne proteíny a korešpondujúce protilátky môžu byť substituované. Senzor využíva povrchové plazmonové rezonancie, čo je optický fenomén, ktorý detekuje zmeny v indexoch lomu. Homogenizát vyžadovanej látky prebieha cez imobilizovaný fúzny proteín a interakcie proteín-proteín sú registrované ako zmeny v indexe lomu. Tento systém môže byť použitý pre určenie kinetiky väzby a pre hodnotenie toho, či je pozorovaná väzba fyziologicky relevantná.

D. Kvasinkový dvojhybridový systém

Kvasinkové "dvojhybridové" systémy majú výhodu v transkripčných faktoroch, ktoré sú zložené z dvoch fyzikálne separovateľných, funkčných domén (Phizicky and Fields, 1994). Najbežnejšie používaný je kvasinkový GAL4 transkripčný aktivátor skladajúci sa z DNA väzbovej domény a transkripčné aktivátorové domény. Dva rôzne klonovacie vektory sú použité pre generovanie separátnych fúzií GAL4 domén na gény kódujúce potenciálne väzbové proteíny. Fúzne proteíny sú ko-exprívané, zamerané na jadro a, pokiaľ sa interakcie vyskytnú, produkuje aktiváciu reporterového génu (napr. lacZ) detekovateľný fenotyp. napríklad ,Clontech Matchmaker Systém-2 môže byť použitý s Clontech mozgovou cDNA GAL4 aktivačnou doménovou fúznou knižnicou s presenilín-GAL4 väzbovými doménovými fúznymi klonmi (Clontech, Palo Alto, CA). Vo svetle týchto objavov je teraz odborník v odbore schopný produkovať mnoho presenilínových fúzií, vrátane obsahujúcich buď normálne alebo mutantné funkčné domény presenilínových proteínov, a vyšetriť také fúzne knižnice, aby identifikoval presenilínové väzbové proteíny.

E. Iné metódy

Sekvencie nukleotidov a proteínových produktov, vrátane mutantných a normálnych foriem týchto nukleových kyselín a ich korešpondujúcich proteínov, môžu byť použité vo vyššie uvedených technikách pre izoláciu iných interagujúcich proteínov a pre identifikáciu iných génov, ktorých expresia je alterovaná nadmernou expresiou normálnych presenilínových sekvencií, alebo zníženou expresiou presenilínových sekvencií, alebo expresiou mutantných presenilínových sekvencií. Identifikácia týchto interagujúcich proteínov, rovnako ako identifikácia ich génov, ktorých úroveň exprese je alternovaná pôsobením mutantných presenilínových sekvencií (napríklad) bude identifikovať iné génové ciele, ktoré budú mať priamy vplyv na patogenézu tejto choroby v jej klinickej alebo patologickej forme. Presnejšie, budú identifikované iné gény, ktoré môžu samy byť miestom iných mutácií spôsobujúcich Alzheimerovu chorobu, alebo ktoré môžu samostatne byť cieľom cieleného terapeutického zásahu (napr. pre redukciu hladín exprese k normálu alebo pre farmakologický blok

účinku ich nadmernej expresie) ako potencionálnej liečby tejto choroby. Presnejšie, tieto techniky spočívajú na PCR-založených a/alebo na hybridizácii založených metódach pre identifikáciu génov, ktoré sú rôzne exprivované medzi dvomi stavmi (bunková línia exprivujúca normálne presenilíny v porovnaní s rovnakou bunkovou líniou exprivujúcou mutantné presenilínové sekvencie). Tieto techniky zahrňujú rôzne zobrazenia, sériové analýzy génovej expresie (SAGE), a hmotovú spektrometriu proteínových 2D-gelov a subtraktívnu hybridizáciu (opísanú Nowakom, 1995 a Kahnom, 1995).

Podľa voľby odborníka v odbore tu existuje veľa iných metód a vyšetrení pre jednotlivé proteíny a iné zlúčeniny, rovnako ako existujú rozsiahle knižnice proteínov a iných zlúčenín (napr. fágové zobrazovacie knižnice a klonovacie systémy od Stratagene, La Jolla, CA) pre identifikáciu molekúl, ktoré sa viažu na normálne alebo mutantné zložky presenilínov. Všetky z týchto metód obsahujú krok zmiešaného normálneho alebo mutantného presenilínového proteínu, fúzie alebo fragmentu s testovanými zlúčeninami, umožnenie väzby (pokiaľ sa dájaká vyskytne) a testovania naviazaných komplexov. Všetky takéto metódy sú teraz dostupné vďaka predkladanému objavu v podstate čistých presenilínov, fragmentov funkčných domén v podstate čistých presenilínov, presenilínových fúzných proteínov, protilátok k presenilínom, a metód pre ich výrobu a použitie.

8. Metódy pre identifikáciu zlúčenín pre moduláciu aktivity presenilínov.

V inej sérii uskutočnenia poskytuje predkladaný vynález metódy pre identifikáciu zlúčenín so schopnosťou modulovať aktivitu normálnych a mutantných presenilínov. Ako je to tu použité s ohľadom na túto sériu uskutočnení zahrňuje termín "aktivita" široko génovú a proteínovú expresiu, post-translačné spracovanie presenilínového proteínu, prenos a lokalizáciu, a akúkoľvek funkčnú aktivitu (napr. enzymatickú, receptorovú-efektorovú, väzbovú, kanálovú), rovnako ako downstream účinky ktorejkoľvek z nich. Presenilíny sa javia ako integrálne membránové proteíny normálne asociované s endoplazmatickým retikulom a/alebo Golgiho aparátom a môžu mať funkcie zapojené v transporte alebo prenose APP a/alebo v regulácii intracelulárnej hladiny vápnika. Okrem

toho, je známe, že presenilínové mutácie sú asociované so zvýšenou produkciou AB peptidu, s objavením sa plakov amyloidu a neurofibrilárnych zmesí, so zníženou kognitívnou funkciou a s apoptotickou smrťou buniek. Preto, pomocou použitia transformovaných buniek a modelov transgénnych zvierat podľa predkladaného vynálezu, buniek získaných od subjektu majúceho mutantný gén pre presenilín alebo zvieracích alebo ľudských subjektov majúcich prirodzene sa vyskytujúce presenilínové mutácie je teraz možné vyšetrovať farmaceutických a terapeutických kandidátov na ich liečebné účinky detektovaním zmien v jednej alebo vo viacerých funkčných charakteristikách alebo fenotypových manifestáciách normálnej alebo mutantnej presenilínovej expresie.

Takto poskytuje predkladaný vynález metódy pre vyšetrovanie alebo testovanie proteínov, malých molekúl alebo iných zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu presenilínu uvedením buniek in vivo alebo in vitro do kontaktu so slúčeninou, ktorá je kandidátom a testovaním zmien v markeroch asociovaných s normálnou alebo mutantnou aktivitou presenilínu. Marker asociovaný s aktivitou presenilínu môže byť akákoľvek merateľná biochemická, fyziologická, histologická a/alebo behaviorálna charakteristika asociovaná s expresiou presenilínu. Konkrétne, užitočné markery zahrňujú akúkoľvek merateľnú biochemickú, fyziologickú, histologickú a/alebo behaviorálnu charakteristiku, ktorá odlišuje bunky, tkanivá, zvieratá alebo jednotlivcov nesúcich aspoň jeden mutantný gén pre presenilín od ich normálnych náprotivkov. Okrem toho, markerom môže byť akékoľvek špecifické alebo nešpecifické meranie aktivity presenilínu. Presenilín špecifické merania zahrňujú meranie expresie presenilínu (napr. hladín presenilínovej mRNA alebo proteínov), ktoré môžu využívať próby nukleových kyselín alebo protilátok podľa predkladaného vynálezu. Nešpecifické merania zahrňujú zmeny v bunkovej fyziológii ako je pH, intracelulárny vápnik, hladiny cyklického AMP, pomery GTP/GDP, aktivita fosfatidylinositolu, fosforylácia proteínov, atď., čo môže byť monitorované prostriedkami ako je cytosenzorový mikrofyzíometer (Molecular Devices Inc., Spojené štáty americké). Aktivácia alebo inhibícia aktivity presenilínu v jeho mutantnej alebo normálnej forme môže byť tiež monitorovaná vyšetrením zmien v expresii iných génov, ktoré sú špecifické pre presenilínovú dráhu vedúcu k Alzheimerovej chorobe. Toto môže byť zobrazené

takými technikami ako je diferenciálne zobrazenie, diferenciálna hybridizácia a SAGE (sekvenčná analýza génovej expresie), rovnako ako dvojrozmernou gelovou elektroforézou bunkových lysátov. V každom prípade, rôzne exprivované gény môžu byť objasnené identickými štúdiami pred a po aplikácii zlúčeniny, ktorá je kandidátom. Ďalej, jednotlivé gény, ktorých expresia je modulovaná podaním kandidátnych zlúčenín, môžu byť zistené klonovaním, sekventovaním nukleotidov, sekventovaním aminokyselín alebo hmotovou spektrometriou (viď. Nowak, 1995).

Obece, bunky môžu byť uvedené do kontaktu so zlúčeninou, ktorá je kandidátom a, po vhodnej dobe (napr. 0 - 72 hodín pre väčšinu biochemických meraní kultivovaných buniek, môže byť testovaný marker aktivity presenilínu a ten môže byť potom porovnaný so základným meraním. Základné meranie môže byť vykonané pred uvedením buniek do kontaktu so zlúčeninou, ktorá je kandidátom,

alebo to môže byť externý základ stanovený inými pokusmi alebo inak známy v odbore. Buňky môžu byť transformované buňky podľa predkladaného vynálezu alebo to môžu byť explantáty od zvierat či jednotlivcov. Konkrétne, buňky môžu byť explantáty od nosičov mutácií presenilínov (napr. ľudských subjektov s Alzheimerovou chorobou), alebo môžu byť zo zvieracieho modelu podľa predkladaného vynálezu (napr. transgénne hlísty alebo myši majúce mutantné gény pre presenilín). Pre zvýšenie účinku presenilínových mutácií na β dráhu môžu byť použité transgénne buňky alebo zvieratá, ktoré majú zvýšenú β produkciu. Preferované buňky zahŕňujú tie, ktoré sú z neurologických tkanív ako sú neuronálne, gliálne alebo zmiešané bunkové kultúry, a kultúry fibroplastov, pečene, obličiek, sleziny alebo kostnej drene. Buňky môžu byť uvedené do kontaktu so zlúčeninami, ktoré sú kandidátmi v kultúre in vitro, alebo môžu byť podané in vivo živým zvieratám alebo ľudským jedincom. Pre živé zvieratá a ľudské jedince môže byť testovaná zlúčenina podaná orálne alebo parenterálnym spôsobom vhodným pre zlúčeninu. Pre klinické testy ľudských subjektov môže byť meranie uskutočnené periodicky (napr. denne, týždenne alebo mesačne) po dobu niekoľkých mesiacov alebo rokov.

Pretože väčšina nosičov presenilínových mutácií bude heterozygotných (t.j. majúcih jednu normálnu a jednu mutantnú

presenilínovú alelu) môžu byť zlúčeniny testované na svoju schopnosť modulovať normálnu, rovnako ako presenilínovú aktivitu.

Tak, napr., zlúčenina, ktorá zvyšuje funkciu normálnych presenilínov môže byť užitočná v liečbe s presenilínmi asociovaných chorôb ako je Alzheimerova choroba. Alternatívne, pretože supresia aktivity ako normálnych, tak mutantných presenilínov pri heterozygotných jedincoch môže mať menej závažné klinické následky než progresia asociovaných ochorení, môže byť žiadúca identifikovať zlúčeniny, ktoré inaktivujú alebo suprivujú všetky formy presenilínov. Preferovane, predsa len sú identifikované zlúčeniny, ktoré selektívne a špecificky inaktivujú alebo suprivujú aktivitu mutantných presenilínov bez porušenia funkcie normálneho presenilínového génu alebo proteínu.

Vo svetle identifikácie, charakterizácie a objavov presenilínových génov a proteínov, nukleokyselinových prób pre presenilíny a protilátok pre presenilíny, a presenilínových transformovaných buniek a transgénnych zvierat podľa predkladaného vynálezu je teraz odborník v odbore schopný robiť mnoho testov, ktoré budú detekovať modulovanie aktivity presenilínu zlúčeninami, ktoré sú kandidátmi. Predovšetkým preferované a uvažované uskutočnenia sú ďalej opísané a o niečo podrobnejšie.

A. Expresia presenilínov

V jednej sérii uskutočnení sú využité špecifické merania expresie presenilínov pre vyšetrovanie kandidátových zlúčenín pre ich schopnosť ovplyvňovať aktivitu presenilínov. Tak, pomocou použitia presenilínových nukleových kyselín a protilátok tu opísaných je možné použiť hladiny mRNA alebo proteínov ako merkeru pre schopnosť zlúčeniny, ktorá je kandidátom, modulovať aktivitu presenilínov. Použitie takýchto prób a protilátok pre meranie génovej a proteínovej expresie je dobre v odbore známe a je tu opísané na inom mieste. Predovšetkým žiadúca môže byť identifikácia zlúčenín, ktoré môžu meniť relatívne hladiny rôznych zostrihaných variant presenilínov. Mnoho z týchto presenilínových mutácií asociovaných s Alzheimerovou chorobou,

napríklad, je umiestnených v regióne putatívnom TM6->7 slučky, ktorá je subjektom alternatívneho zostrihu v niektorých periférnych tkanivách (napr. v bielych krvinkách). Zlúčeniny, ktoré môžu zvyšovať relatívnu frekvenciu tohoto zostrihu môžu byť preto účinné v zabránení expresie mutácií v tomto regióne.

B. Intracelulárna lokalizácia

V inej sérii uskutočnení môžu byť zlúčeniny vyšetrované na svoju schopnosť modulovať aktivitu presenilínov na základe ich účinku na prenos a intracelulárnu lokalizáciu presenilínov. Imunocytochemicky bolo na presenilínoch ukázané, že sú lokalizované v membránových štruktúrach asociovaných s endoplazmatickým retikulom a Golgiho aparátom, a jeden presenilínový mutant (H163R), ale žiadny iný, bol vizualizovaný v malých cytoplazmatických vesikulách neznámej funkcie. Rozdiely v lokalizácii normálnych a mutantných presenilínov môžu preto prispievať k etiológii s presenilínmi spriahnutých ochorení. Zlúčeniny, ktoré môžu ovplyvňovať lokalizáciu presenilínov môžu preto byť identifikované ako potenciálne terapeutiká. Štandardné techniky známe v odbore môžu byť využité pre detekciu lokalizácie presenilínov. Všeobecne, tieto techniky budú využívať protilátky podľa predkladaného vynálezu a predovšetkým protilátky, ktoré sa selektívne viažu na jeden alebo viacej mutantov presenilínov, ale nie na normálne presenilíny. Ako je dobre známe v odbore, takéto protilátky môžu byť značené akoukoľvek z mnohých techník (napr. fluorescentnou alebo radioaktívnou značkou, značenými sekundárnymi protilátkami, avidin-biotinom, atď.) pre vizualizáciu intracelulárneho umiestnenia presenilínu. Presenilíny môžu byť ko-lokalizované na určité štruktúry, ako je v odbore známe, pomocou použitia protilátok k markerom týchto štruktúr (napr. TGN38 pre Golgiho receptor pre transferín pre post-Golgiho transportné vaky, AMP2 pre lyzozómy). Western bloty purifikovaných frakcií z bunňových lyzátov obohatených na rôzne intracelulárne membránovo viazané organely (napr. lyzozómy, synaptozómy, Golgiho aparát) môžu byť taktiež použité. Okrem toho, relatívna orientácia rôznych domén presenilínov cez bunňové domény môže byť testovaná, napríklad, elektrónovou mikroskópiou a protilátkami namierenými na tieto domény.

B. Iontová regulácia/metabolizmus

V inej sérii uskutočnení môžu byť zlúčeniny testované na ich schopnosť modulovať aktivitu presenilínov na základe meraní intracelulárnych hladín Ca^{2+} , Na^+ alebo K^+ alebo ich metabolizmu. Ako bolo uvedené vyššie, presenilíny sú s membránou asociované proteíny, ktoré môžu slúžiť ako, alebo interagovať s, iontovými receptormi alebo iontovými kanálmi. Tak, zlúčeniny môžu byť vyšetrované na svoju schopnosť modulovať s presenilínmi spojený vápnik alebo iné iontové metabolizmy meraním buď in vivo, alebo in vitro prietoku iontovými kanálmi a/alebo transmembránové napätie alebo prúd pomocou použitia náplastových svoriek, napäťových svoriek a fluorescentného farbiva senzitívneho na intracelulárny vápnik alebo transmembránové napätie. Iontový kanál alebo funkcia receptora môže byť taktiež testovaná meraním aktivácie druhých poslov ako je cyklický AMP, cGMP tyrosín kinas, fosfatas, zvýšením intracelulárneho vápnika a podobne. Rekombinantne vyrobené proteíny môžu taktiež byť rekonštruované v artificielných membránových systémoch pre štúdium konduktancie iontových kanálov a, preto, buňka použitá v tomto teste môže obsahovať artificciálnu membránu alebo buňku. Testy na zmenu v iontovej regulácii alebo metabolizme môžu byť uskutočnené na kultivovaných buňkách exprimujúcich endogénne normálne alebo mutantné presenilíny. Takéto štúdie môžu taktiež byť vykonané na buňkách transfektovaných vektormi schopných expresie jedného z presenilínov, alebo funkčné domény jedného z presenilínov, v normálnej alebo v mutantnej forme. Okrem toho, pre zvýšenie signálu meraného v takýchto testoch môžu byť buňky kontrtransfektované génmi kódujúcimi proteíny iontových kanálov. Napríklad, *Xenopus* oocytárnej buňky alebo krysej obličky (HEK293) buňky môžu byť kontrtransfektované normálnymi alebo mutantnými sekvenciami pre presenilíny a sekvenciami kódujúcimi krysiu mozgovú $\text{Na}^+\beta 1$ podjednotku, Ca^{2+} 1 podjednotku králičieho kostrového svalu, alebo K^+ 1 podjednotku krysieho srdca. Zmeny v s presenilínom spojené alebo presenilínom sprostredkovanej aktivity iontového kanálu môžu byť merané dvomi mikroelektrodovými napäťovými svorkami v prípade oocyty alebo celobuňkovými náplastovými svorkami zaznamenávajúcimi HEK293 buňky.

C. Apoptóza alebo bunková smrť

V inej sérii uskutočnení môžu byť zlúčeniny testované na ich schopnosť modulovať aktivitu presenilínov na základe ich účinku na s presenilínmi spojenú alebo presenilínmi sprostredkovanú apoptózu alebo smrť buniek. Tak, napríklad, môže byť stanovená základná hladina apoptózy alebo bunkovej smrti pre bunky v kultúre, alebo môže byť po smrti určený základný stupeň straty neurónu v určitom veku pre zvieracie modely alebo pre ľudské subjekty, a schopnosť zlúčeniny, ktorá je kandidátom suprimovať alebo inhibovať apoptózu alebo bunkovú smrť môže byť meraná. Bunková smrť môže byť meraná štandardnými mikroskopickými technikami (napr. svetelnou mikroskópiou) alebo môže byť presnejšie meraná apoptóza pomocou charakteristickej morfológie jadra alebo charakteristickej fragmentácie DNA, ktorá vytvára jadrové oká (viď Gavrieli et al., 1992, Jacobson et al., 1993, Vito et al., 1996). TUNEL môže byť taktiež použitý pre hodnotenie smrti buniek v mozgu (viď napr. Lassmann et al., 1995). V preferovaných uskutočneniach sú zlúčeniny vyšetrované na svoju schopnosť suprimovať alebo inhibovať stratu neurónu v transgénnych zvieracích modeloch podľa predkladaného vynálezu. Transgénne myši, ktoré majú napríklad, mutantný ľudský, mutantný myšší alebo humanizovaný mutantný presenilínový gén môžu byť použité pre identifikáciu alebo pre hodnotenie zlúčenín, ktoré môžu oddialiť alebo zabrániť neurodegeneráciu asociovanú s Alzheimerovou chorobou. Podobný model transgénnych myší, majúcich mutantný APP gén, bol nedávno opísaný Gamesom et al., (1995).

D. A β peptidová produkcia

V inej sérii uskutočnení môžu byť zlúčeniny vyšetrované na ich schopnosť modulovať s presenilínmi spojenú alebo presenilínmi sprostredkovanú zmenu v spracovaní APP. A peptid je produkovaný v niekoľkých izoformách vznikajúcich rozdielov v spracovaní APP. A β peptid je od 39 do 43 aminokyselinový derivát β APP, ktorý je progresívne deponovaný v difúznych a senilných plátoch a v krvných cievach subjektov s AD. V ľudskom mozgu sú A β peptidy heterogénne ako v N-, tak v C-konci. Niekoľko pozorovaní, predsa len, naznačilo, že ako kompletne, tak

N-terminálne skrátené formy dlhých A β peptidov končiacich zvyškami 42 alebo 43 (t.j. A β 1-42/43 a A x-42/43 majú významnejšiu úlohu pri AD než peptidy končiace zvyškom 40. Tak, A β 1-42/43 a A β x-42/43 sú ranným a významným rysom ako senilných plakov, tak difúzných plakov, zatiaľ čo peptidy končiacie zvyškom 40 (t.j. A β 1-40 a A x-40) sú predominantne asociované s podsadou zreých plakov a s amyloidovými krvnými cievami (viď. napr. Iwatsubo et al., 1995, Gravinga et al., 1995, Tamaoka et al., 1995, Podlisny et al., 1995). Okrem toho, izoformy s dlhou koncovou časťou majú väčšiu náchylnosť na tvorbu vrások, a je preto mienené, že sú viac neurotoické ako A β -40 peptidy (Pike et al., 1993, Hilbich et al., 1991). Nakoniec, chybné mutácie v kodóne 717 BAPP géne asociované s ranným nástupom FAD vedú k nadprodukcii A β s dlhým koncom v mozgu postihnutých nosičov mutácie, v periférnych bunkách a plazme ako postihnutých, tak presymptomatických jedincov a v bunčových líniách transfektovaných BAPP₇₁₇ mutantná cDNA (Tamaoka et al., 1994, Suzuki et al., 1994) ako je opísané v príklade 18 nižšie, teraz sme objavili, že zvýšená produkcia A β peptidov s dlhým koncom je taktiež asociovaná s mutáciami v génoch pre presenilíny.

Takto v jednej sérii uskutočnení poskytuje predkladaný vynález metódy pre vyšetrenie kandidátových zlúčenín na ich schopnosť blokovat' alebo inhibovat' zvýšenú produkciu dlhých izoforiem A β peptidov v bunkách a v transgénnych zvieratách exprivujúcich mutantný gén pre presenilín. Konkrétne, predkladaný vynález poskytuje také metódy, v ktorých boli kultivované cicavčie bunky, ako sú mozgové bunky alebo fibroblasty, transformované podľa metód tu opísaných, alebo v ktorých boli transgénne zvieratá, ako sú hlodavci alebo non-ľudský primáti, produkovaný metódami, ktoré sú tu opísané tak, že exprivujú relatívne vysoké hladiny mutantných presenilínov. Voliteľne môžu byť takéto bunky alebo transgénne zvieratá transformované tak, aby exprivovali normálnu formu BApp proteínu v relatívne vysokých hladinách.

V tejto sérii uskutočnení je zlúčenina, ktorá je kandidátom, podaná k buňkovej línii alebo k transgénnym zvieratám (napr. pridáním do média buniek v kultúre, alebo orálnym alebo parenterálnym spôsobom zvieratám) a, po vhodnej dobe (napr. 0-72 hodín pre bunky v kultúre, dňoch alebo mesiacoch pre zvieracie

modely) je odobratá biologická vzorka (napr. supernatant bunčkovej kultúry alebo bunčový lysát z buniek v kultúre, tkanivový homogenizát alebo plazma od zvierat) a je testovaná na hladinu dlhých izoforiem A β peptidov. Môžu byť určené absolútne hladiny peptidov (napr. nMol/ml) alebo relatívne hladiny (napr., pomer dlhých a krátkych A β izoforiem). A β izoformy môžu byť detekované akýmkoľvek spôsobom v odbore známym) napr. elektroforetickou separáciou alebo sekvencovaním) ale, preferovane, sú využité protilátky, ktoré sú špecifické k dlhým izoformám pre určenie absolutných alebo relatívnych hladín A β -42/43 alebo A β x-42/43 peptidov. Kandidáti farmaceutík alebo terapeutík, ktoré redukujú absolutnú alebo relatívnu hladinu týchto dlhých A β izoforiem, predovšetkým v modeloch transgénnych zvierat podľa predkladaného vynálezu, budú pravdepodobne mať terapeutický účinok v liečbe Alzheimerovej choroby, alebo iných chorôb spôsobených mutáciami presenilínov alebo aberáciami v APP metabolizme.

E. Fosforylácia mikrotubulárnych asociovaných proteínov

V inej sérii uskutočnení môžu byť zlúčeniny, ktoré sú kandidátmi vyšetrované na svoju schopnosť modulovať aktivitu presenilínov hodnotením účinku zlúčenín na úroveň fosforylácie mikrotubulárnych asociovaných proteínov (MAP) ako je Tau. Abnormálna fosforylácia Tau a iných MAP v mozgu obetí Alzheimerovej choroby je v odbore dobre známa. Takto zlúčeniny, ktoré môžu zabrániť alebo inhibovať abnormálnu fosforyláciu MAP môžu mať účinok v liečbe s presenilínmi asociovaných ochorení ako je AD. Ako je uvedené vyššie, buňky od normálnych alebo mutantných zvierat alebo subjektov, alebo transformované bunčové línie a zvieracie modely podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité. Preferované testy budú využívať bunčové línie alebo zvieracie modely transformované mutantnými ľudskými alebo humanizovanými mutantnými génami pre presenilín. Základný stav fosforylácie MAP v týchto bunkách môže byť stanovený a potom môže byť zlúčenina, ktorá je kandidátom, testovaná na svoju schopnosť zabrániť, inhibovať alebo pôsobiť proti hyperfosforylácii asociovanej s mutantmi. Stav fosforylácie MAP môže byť určený akoukoľvek štandardnou metódou známou v odbore, ale preferovane sú využité protilátky, ktoré sa viažu selektívne

na fosforylované alebo nefosforylované epitopy. Takéto protilátky k fosforylovaným epitopom Tau proteínov sú známe v odbore (napr. ALZ50).

9. Vyšetrovanie a diagnostika Alzheimerovej choroby

A. Všeobecné diagnostické metódy

Gény pre presenilíny a génové produkty, rovnako ako od presenilínov odvodené próby, priméry a protilátky, ktoré sú tu opísané, sú užitočné pri vyšetrovaní nosičov aliel asociovaných s Alzheimerovou chorobou, pre diagnostiku obetí Alzheimerovej choroby, a pre vyšetrovanie a diagnostiku príbuzných presenilínových a senilných demencií, psychiatrických ochorení ako je schizofrénia a depresia a neurologických ochorení ako je mŕtvica a mozgové krvácanie, kde všetky sú pozorované vo väčšom alebo menšom rozsahu pri symptomatických subjektoch majúcich mutácie PS1 alebo PS2 génov alebo APP génu. Jedinci rizikovní na Alzheimerovu chorobu, ako sú tí s AD prítomnou v rodinnom rodokmeni, alebo jedinci, ktorí nie sú známi ako rizikovní, môžu byť rutinne vyšetrení pomocou použitia prób pre detekciu prítomnosti mutantných presenilínových génov alebo proteínov rôznymi technikami. Diagnostika dedičných prípadov týchto chorôb môže byť uskutočnená technikami založenými na nukleových kyselinách (vrátane genómových a mRNA/cDNA sekvenciách), proteínoch a/alebo protilátkach tu opísaných, vrátane testov projektovaných pre detekciu zlyhania alebo zvýšenia normálnej presenilínovej aktivity a/alebo prítomnosti špecifických nových aktivít spôsobených mutantnými presenilínmi. Preferované sú metódy a produkty založené na ľudských PS1 alebo PS2 nukleových kyselinách, proteínoch alebo protilátkach ako sú tu opísané. Ako bude odborníkom v odbore predsa len jasné, významná evolučná konzervácia veľkých častí PS1 a PS2 nukleotidových a aminokyselinových sekvencií, aj v druhých tak odlišných ako sú ľudia, myši, *C. elegans* a *Drosophila*, umožňuje odborníkom použiť také non-ľudské homológne nukleové kyseliny, proteíny a protilátky aj pre aplikáciu zameranú na ľudské alebo iné zvieracie subjekty. Tak bude, pre stručnosť, ale bez obmedzenia rozsahu vynálezu, nasledujúci popis zameraný na použitie ľudských homológov PS1 a PS2. Bude predsa len jasné, že homológne

sekvencie z iných druhov, vrátane tých, ktoré sú tu opísané, budú pre mnohé účely ekvivaletné.

Ako bude odborníkom ocenené, voľba diagnostickej metódy podľa predkladaného vynálezu bude ovplyvnená charakterom dostupných biologických vzoriek, ktoré budú testované a charakterom požadovanej informácie. PS1, napríklad, je vysoko exprimovaný v mozgovom tkanive, ale mozgové biopsie sú invazívne a nákladné postupy, predovšetkým pre rutinné vyšetovanie. Iné tkanivá, ktoré exprimujú signifikantné hladiny PS1, predsa len, môžu demonštrovať alternatívny zostrih (napr. lymfocyty) a preto, PS1 mRNA alebo proteín z trakových buniek môže byť menej informatívny. Takto môže byť preferovaný test založený na genómovej PS1 DNA, pretože žiadna informácia nebude závisieť na alternatívnom zostrihu a pretože v podstate všetky jadrové bunky môžu poskytnúť použiteľnú vzorku. Diagnostika založená na iných presenilínoch (napr. hPS2, mPS1) sú subjektom podobných úvah: dostupnosti tkanív, hladín exprese v rôznych tkanivách a alternatívnych mRNA a proteinových produktov vzniknutých z alternatívneho zostrihu.

B. Na proteínoch založené vyšetrenia a diagnostika

Pokiaľ je diagnostický test založený na presenilínových proteínoch, potom je veľa možných spôsobov, napríklad: diagnóza môže byť dosiahnutá monitorovaním rozdielov v elektroforetickej mobilite normálnych a mutantných proteínov. Takýto prístup bude predovšetkým užitočný pre identifikáciu mutantov, v ktorých je prítomná substitúcia náboja, alebo v ktorých insercia, delecia alebo substitúcia viedli k signifikantnej zmene v elektroforetickej migrácii vzniknutého proteínu. Alternatívne, diagnóza môže byť založená na rozdieloch charakteru proteolytického štiepenia normálnych a mutantných proteínov, rozdieloch v morálnych pomeroch rôznych aminokyselinových zvyškov alebo na funkčných testoch demonštrujúcich pozmenenú funkciu génových produktov.

V preferovaných uskutočneniach bude na proteínoch založená diagnostika využívať rozdiely v schopnosti protilátok viazať sa na normálne a mutantné presenilínové proteíny (najmä na hPS1 alebo hPS2). Takéto diagnostické testy môžu využívať protilátky,

ktoré sa viažu na normálne proteíny, ale nie na mutantné proteíny, alebo naopak. Jednotlivo, môže byť použitý test, v ktorom je veľa monoklonálnych protilátok, každá schopná väzby na mutantný epitop. Hladina naviazanej anti-mutantnej protilátky vo vzorke získanej od testovaného subjektu (vizualizovaná napríklad radioznančením, ELISA alebo chemiluminiscenciou) môže byť porovnaná s hladinou väzby v kontrolnej vzorke. Alternatívne, môže byť použitá protilátka, ktorá sa viaže na normálne, ale nie na mutantné presenilíny a znížená hladina väzby protilátky môže byť použitá pre odlíšenie homozygotných normálnych jedincov od mutantných heterozygotov alebo homozygotov. Takáto protilátková diagnostika môže byť použitá pre in situ imunochistochémiu pomocou použitia bioptických vzoriek z tkanív CNS získaných antemortom alebo postmortom, vrátane neuropatologických štruktúr asociovaných s týmito chorobami ako sú neurofibrilárne oká a plaky amyloidu, alebo môže byť použitá zo vzorky kvapaliny ako je mozgovomiechový mok alebo z periférnej tkaniny ako sú biele krvinky.

C. Na nukleových kyselinách založené vyšetrenia a diagnostika

Pokiaľ je diagnostický test založený na nukleových kyselinách zo vzorky, potom môže byť test založený na mRNA, cDNA alebo genómovej DNA. Pokiaľ je použitá mRNA zo vzorky, potom musí byť vykonaných mnoho rovnakých úvah s ohľadom na zdroj tkaniva a pravdepodobnosť alternatívneho zostrihu. To znamená, že tu musí byť malá alebo žiadna expresia transkriptu, pokiaľ nie sú vybrané alebo dostupné vhodné zdroje, a alternatívny zostrih môže viesť ku strate dakej informácie alebo k obtiažnej interpretácii. Predsa len, už sme ukázali (Sherrington et. al., 1995, Rogaev, 1995), že mutácie v 5'UTR, 3'UTR, otvorenom sčítacom rámcu a miestach zostrihu ako PS1, tak PS2 môžu byť spoľahlivo identifikované v mRNA/cDNA izolované z bielych krviniek a/alebo kožných fibroblastov. Pokiaľ je testovaná mRNA, cDNA alebo genomová DNA, môžu byť použité štandardné metódy dobre známe v odbore pre detekciu prítomnosti určitej sekvencie buď in situ alebo in vitro (viď napr. Sambrook et al.(1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.vydanie, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Všeobecne môže predsa len byť vyšetrované akékoľvek

tkanivo alebo jadrová bunka.

Genómová DNA použitá pre diagnózu môže byť získaná z telesných buniek, ako sú tie, ktoré sú prítomné v krvi, tkanivových biopsiách, chirurgických vzorkách alebo autoptickom materiály. DNA môže byť izolovaná a použitá priamo pre detekciu špecifickej sekvencie, alebo môže byť amplifikovaná polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) pred analýzou. Podobne, RNA alebo cDNA môžu byť taktiež použité, s alebo bez PCR amplifikácie. Pre detekciu špecifickej sekvencie nukleových kyselín môže byť použité priame sekvencovanie nukleotidov, hybridizácia pomocou použitia špecifických oligonukleotidov, trávenie restriktčnými enzýmami a mapovanie, PCR mapovanie, RNAsová protekcie, chemické chybné štiepenie, lifazou sprostredkovaná detekcia a rôzne iné metódy. Oligonukleotidy špecifické pre jednotlivé sekvencie môžu byť chemicky syntetizované a radioaktívne alebo neradioaktívne (napr. biotinom, ethidiumbromid) označené a hybridizované na jednotlivé vzorky imobilizované na membránach alebo na iných pevných nosičoch (napr. "dot-blot" alebo prenosom z gelu po elektroforéze), alebo v roztoku. Prítomnosť alebo absencia cieľových sekvencií môže byť potom vizualizovaná pomocou metód ako je autoradiografia, fluorometria alebo kolorimetria. Tieto postupy môžu byť automatizované pomocou použitia mnohých krátkych oligonukleotidov známe sekvencie fixovaných v známej hustote na silikonové plátky.

1. Vhodné próby a priméry

Pre hybridizáciu, RNAsovú protekciu, ligasou sprostredkovanú detekciu, PCR amplifikáciu alebo pre akúkoľvek inú štandardnú metódu bude mnoho subsekvencií sekvencií pre presenilíny tu opísanú použiteľných ako próby a/alebo priméry. Tieto sekvencie a subsekvencie budú zahrňovať ako normálne presenilínové sekvencie, tak poškodzujúce mutantné sekvencie. Všeobecne, použiteľné sekvencie budú obsahovať aspoň 8 - 9, skôr 10 - 50, najlepšie 18 - 24 súvislých nukleotidov z presenilínových intrónov, exónov alebo intro/exon spojení. V závislosti na cieľovej sekvencii, vyžadovanej špecificite a budúcom vývoji techniky môžu mať význam taktiež kratšie sekvencie. Preto,

akákoľvek od presenilínu odvodená sekvencia, ktorá je použitá pre izoláciu, klonovanie, amplifikáciu, identifikáciu alebo inú manipuláciu s presenilínovou sekvenciou môže byť považovaná za vhodnú próbu alebo primér. Predovšetkým budú považované za užitočné sekvencie obsahujúce nukleotidové pozície z génov pre presenilíny o ktorých je známe, že sú tu prítomné chorobu spôsobujúce mutácie, alebo sekvencie, ktoré susedia s týmito pozíciami.

(a) PS1 próby a priméry

Ako bolo uvedené vyššie, bolo teraz identifikovaných veľa chorôb spôsobujúcich mutáciu v ľudskom PS1 gène. Detekcia týchto a iných PS1 mutácií je teraz umožnená pomocou použitia izolovaných prôb nukleových kyselín alebo primérov odvodených od normálnych alebo od mutantných PS1 génov. Predovšetkým užitočné sú próby alebo priméry, odvodené od sekvencií kódujúcich N-koncom, TM1-TM2 region a TM6-TM7 region. Ako bolo uvedené vyššie, jednako, boli už identifikované mutácie, ktoré ovplyvňujú iné regióny PS1 proteínu a, pomocou použitia metód tu opísaných, ich bude viac jednoznačne identifikovaných. Preto, predkladaný vynález poskytuje izolované próby a priméry nukleových kyselín korešpondujúcich normálnym a mutantným sekvenciám z akejkoľvek časti PS1 génu, vrátane intrónov a 5' a 3' UTR, pri ktorých môže byť ukázané, že sú asociované s vývojom Alzheimerovej choroby. Iba ako príklad, a bez obmedzenia vynálezu môžu byť využité próby a priméry odvodené od hPS1 DNA segmentu bezprostredne susediaceho C410Y mutáciou vo vyšetrovacích a diagnostických metódach. Táto mutácia vzniká, aspoň pri niektorých jedincoch, zo substitúcie A pomocou G v pozícii 1477 SEQ ID NO: 1. Tak, genómová DNA, mRNA alebo cDNA získaná zo vzoriek periférnej krvi od jedinca môžu byť vyšetrované pomocou použitia oligonukleotidových prôb alebo primérov obsahujúcich toto potenciálne miesto mutácie. Pre hybridizačné próby pre túto mutáciu môžu byť využité próby o 8 50 a lepšie próby o 18 - 24 bázach preklenujúcich miesto mutácie (napr. bp 1467 - 1487 v SEQ ID NO: 1). Pokiaľ má byť próba použitá s mRNA, potom by samozrejme mala byť komplementárna k mRNA (a preto korešpondujúce nekódujúcemu reťazcu PS1 génu). Pre próby použité s genómovou DNA alebo s cDNA môže byť

komplementárna k obidvom reťazcom. Pre detekciu sekvencií obsahujúcich túto mutáciu PCR metódou by mali vhodné priméry obsahovať sekvencie o 8 - 50, a radšej 18 - 24 nukleotidoch dĺžky odvodené od regiónov susediacich s mutáciami na ktorúkoľvek stranu, a ktoré korešpondujú pozíciám kdekoľvek od 1 do 1000bp, alebo lepšie od 1 - 200bp, vzdialené od miesta mutácie. PCR priméry, ktoré sú 5' od miesta mutácie (na kódujúcom reťazci) by mali korešpondovať v sekvencii kódujúceho reťazcu PS1 génu, zatiaľčo PCR priméry, ktoré sú 3' k miestu mutácie (na kódujúcom reťazci) by mali korešpondovať nekódujúceho alebo anti-sens reťazcu (napr. 5' primér korešpondujúci bp 1451 - 1468 SEQ ID NO: 1 a 3 primér korešpondujúci komplementu 719 - 699 SEQ ID NO" 14).

Podobné priméry môžu byť vybraté pre iné PS1 mutácie alebo pre mutácie "hot-spots" všeobecne. Napríklad, 5' PCR primér pre M14L mutáciu (A->C v bp 684) môže obsahovať sekvenciu korešpondujúcu približne bp 601 - 620 SEQ ID NO: 1 a 3' primér môže korešpondovať komplementu o približne 1328 - 1309 SEQ ID NO: 8. Povšimnite si, že tento príklad využíva primér tak z intronových, tak z exonových sekvencií. Ako iný príklad, vhodný 5' primér pre A246E mutáciu (C->A v bp 985) môže obsahovať sekvencie korešpondujúce približne bp 907 - 925 SEQ ID NO: 1 alebo 3' primér môže korešpondovať komplementu o približne 1010 - 990 SEQ ID NO: 1. Ako iný príklad, 5' primér pre H163R mutáciu (A->G v bp 736 SEQ ID NO: 1 alebo v bp 419 SEQ ID NO: 9) môže obsahovať sekvencie korešpondujúce približne bp 354 - 375 SEQ ID NO: 9 alebo 3' primér môže korešpondovať komplementu o približne 581 - 559 SEQ ID NO: 1. Podobne, môžu byť využité intrónové alebo exónové sekvencie, napríklad, pre produkciu 5' priméru pre L286V mutáciu (C->G v bp 1104 SEQ ID NO: 1 alebo v bp 398 SEQ ID NO: 11) obsahujúci sekvenciu korešpondujúcu približne bp 249 - 268 SEQ ID NO: 11 alebo bp 1020 - 1039 SEQ ID NO: 1, a 3' priméry korešpondujúce komplementu približne bp 510 - 491 SEQ ID NO: 11.

Malo by byť uvedené, že próby a priméry môžu obsahovať špecificky mutované nukleotidy. Tak, napríklad, hybridizačná próba alebo 5' primér môžu byť produkované pre C410Y mutáciu tak, že obsahujú sekvenciu korešpondujúcu približne bp 1468 -

1486 SEQ ID NO: 1 pre vyšetrenie alebo pre amplifikáciu normálnych aliel, alebo korešpondujúcu rovnakej sekvencii, ale s bp korešpondujúcu bp 1477 pozmenenú (G->T) pre vyšetrenie alebo amplifikáciu mutantných aliel.

(b) PS2 próby a priméry

Rovnako všeobecné úvahy ako boli opísané vyššie s ohľadom na próby a priméry pre PS1 môžu byť rovnako aplikované na próby a priméry pre PS2. Konkrétne, próby a priméry môžu korešpondovať intrónovým, exónovým alebo intron/exónovým väzbovým sekvenciám, môžu korešpondovať sekvenciám z kódujúcich alebo nekódujúcich (antisenzia) reťazcov, a môžu korešpondovať normálnym alebo mutovaným sekvenciám.

Len ako príklad, PS1 N141I mutácia (A->T v bp 787) môže byť vyšetrovaná PCR amplifikáciou susedného DNA fragmentu pri použití 5' priméru korešpondujúceho približne bp 733 - 751 SEQ ID NO: 18 a 3' priméru korešpondujúceho komplementu približne bp 846 - 829 SEQ ID NO: 18. Podobne, 5' primér pre M239V mutáciu (A->T v bp 1080) môže obsahovať sekvenciu korešpondujúceho približne bp 1009 - 1026 a 3' primér môže korešpondovať komplementu približne bp 1118 - 1101 SEQ ID NO: 18. Ako iný príklad, sekvencia kódujúca región susediaci s I420T mutáciou (T->C v bp 1624) môže byť vyšetrovaná PCR amplifikáciou genómovej DNA pri použití 5' priméru korešpondujúceho približne bp 1576 - 1593 SEQ ID NO: 18 a 3' priméru korešpondujúceho komplementu približne bp 1721 - 1701 SEQ ID NO: 18 pre generovanie produktu so 146 pármí báz. Tento produkt, napríklad, môže byť potom skúšaný alelovo špecifickými oligonukleotidami pre divoký typ (napr. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18) a/alebo pre mutantný typ (napr. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18 s (T->C v bp 1624) sekvencie.

(2) Hybridizačné vyšetrovanie

Pre in situ detekciu normálnych alebo mutantných PS1, PS2 alebo iných s presenilínami spojených sekvencií nukleových kyselín môže byť štandardnými technikami pripravená vzorka tkaniva a potom môže byť uvedená do kontaktu s jednou alebo viacerými z vyššie opísanými skúškami, preferovane s takou, ktorá

je značená pre uľahčenie detekcie a test pre hybridizáciu nukleových kyselín je vykonaný za prísnych podmienok, ktoré umožňujú hybridizáciu len medzi próbou a vysoko alebo presne komplementárnymi sekvenciami. Pretože sa väčšina z doposiaľ detekovaných mutácií PS1 a PS2 skladá zo substitúcie jednej nukleovej kyseliny, budú požadované hybridizačné podmienky vysokej prísnosti na odlíšenie normálnych sekvencií od väčšiny mutantných sekvencií. Pokiaľ je známy presenilínový genotyp rodičov subjektu, potom môžu byť skúšky vybrané podľa nich. Alternatívne môžu byť využité skúšky pre mnoho mutantov sekvenčne alebo v kombinácii. Pretože väčšina jedincov majúcich mutácie presenilínu bude heterozygotných, môžu byť tiež použité skúšky k normálnym sekvenciám a homozygotné normálne individua môžu byť odlíšené podľa množstva väzby (napr. podľa intenzity rádioaktívneho signálu). V istom variante môže byť využitý test kompetitívnej väzby, v ktorom sú použité ako normálne, tak aj mutantné próby, ale len jedna z nich je značená.

(3) Reštrikčné mapovanie

Alterácie sekvencie môžu tiež tvoriť alebo rušiť náhodné miesta pre reštrikčné enzýmy, ktoré sú odhalené použitím trávenia vhodným enzýmom, ktoré je nasledované "gel-blot" hybridizáciou. DNA fragmenty nesúce miesto (normálne alebo mutantné) sú detekované zväčšením alebo zmenšením ich veľkosti, alebo zvýšením alebo znížením počtu korešpondujúcich reštrikčných fragmentov. Taká analýza polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP), alebo reštrikčné mapovanie, môže byť použité s genómovou DNA, mRNA alebo cDNA. Sekvencie pre presenilíny môžu byť amplifikované PCR pri použití vyššie opísaných primérov pred reštrikciou, a v tomto prípade môže dĺžka PCR produktov poukazovať na prítomnosť alebo absenciu jednotlivých reštrikčných miest, a/alebo môžu byť podrobené reštrikcii po amplifikácii. Fragmenty presenilínov môžu byť vizualizované bežnými prostriedkami (napr. UV svetlom za prítomnosti etídium bromidu).

Len ako príklad je tu uvedené, že PS1 M146L mutácia (A->C v bp 684 SEQ ID NO: 1) ruší PspHI miesto; H163R mutácia (A->G v bp 736) ruší NlaIII miesto; A246E mutácia (C->A v bp 985) vytvára DdeI miesto; a L286V mutácia (C->G v bp 1104) vytvára PvuIII

miesto. Odborník v odbore si ľahko môže vybrať z mnohých komerčne dostupných reštrikčných enzýmov a na základe normálnych a mutantných sekvencií opísaných v predkladanom vynáleze, môže vykonať analýzu reštrikčného mapovania, ktorá bude detekovať v podstate akúkoľvek mutáciu presenilínov.

(4) PCR mapovanie

V inej sérii vyhotovení môže byť mutácia substitúcie jednej bázy detekovaná v PCR na základe rôznej dĺžky alebo produkcie PCR produktu. Tak, priméry, ktoré preklenujú miesta mutácie alebo ktoré, preferovane, majú 3' konce v miestach mutácie, môžu byť využité na amplifikáciu vzorky genómovej DNA, mRNA alebo cDNA od subjektu. Pri chybe v mieste mutácie sa môže očakávať, že zmení schopnosť normálnych a mutantných primérov navodiť polymerasovú reakciu a, preto, môže viesť k profilom produktov, ktoré sa líšia medzi normálnymi subjektami a heterozygotnými a/alebo homozygotnými presenilínovými mutantmi. PCR produkty normálneho a mutantného génu môžu byť rôzne separované a detekované štandardnými technikami, ako je polyakrylamidová alebo agarosová gelová elektroforéza a vizualizácia so značenými skúškami, etídium bromidom a podobne. Vzhľadom k možnému nešpecifickému primingu alebo preskočeniu miest mutácie, rovnako ako s ohľadom na fakt, že väčšina nosičov mutantných alel bude heterozygotných, môže byť účinnosť tejto techniky znížená.

(5) Elektroforetická mobilita

Genetické testovanie založené na odlišnostiach DNA sekvencie môže byť tiež dosiahnuté detekciou alterácií elektroforetickej mobility DNA, mRNA alebo cDNA fragmentov v geloch. malé delécie a inzercie sekvencie, napríklad, môžu byť vizualizované gelovou elektroforézou s vysokou rozlišovacou schopnosťou jedno alebo dvoj reťazcovej DNA, alebo ako zmeny v charaktere migrácie DNA heteroduplexov v non-denaturačnej gelovej elektroforéze. Mutácie presenilínov alebo polymorfizmus môže byť tiež detekovaný metódami, ktoré využívajú posuny mobility počas jednoreťazcového konformačného polymorfizmu (SSCP) asociovaného so sekundárnou štruktúrou mRNA alebo jednoreťazcovej DNA.

(6) Chemické štiepenie chýb

Mutácie v presenilínoch môžu byť tiež detekované využitím metódy chemického štiepenia chýb (CCM) (viď. napr. Saleeba and Cotton, 1993, a referencie tam uvedené). V tejto technike môžu byť próby (väčšie než 1 b) zmiešané so vzorkou genómovej DNA, cDNA alebo mRNA získanej od subjektu. Vzorka a próby sú zmiešané a podrobené podmienkam, ktoré umožňujú tvorbu heteroduplexov (pokiaľ sa nejaké tvoria). Preferovane sú ako próby, tak aj vzorky nukleových kyselín dvojreťazcové, alebo môžu byť próba a vzorka spoločne amplifikované PCR, na zaistenie tvorby všetkých možných chybných heteroduplexov. Chybne spárované T zvyšky sú reaktívne s oxidom osmičelým a chybne spárované C zvyšky sú reaktívne s hydroxylamínom. Pretože každý chybne spárovaný A bude doprevádzaný chybne spárovaným T a každý chybne spárovaný G bude doprevádzaný chybne spárovaným C, vedie akýkoľvek rozdiel v nukleotidoch medzi próbou a vzorkou (vrátane malých inzercií a delécií) k tvorbe aspoň jedného reaktívneho heteroduplexu. Po ošetrení oxidom osmičelým a/alebo hydroxylamínom pre modifikáciu akýchkoľvek miest chybného párovania, je zmes podrobená chemickému štiepeniu v akomkoľvek modifikovanom chybne spárovanom mieste, napríklad, reakciou s piperidínom. Zmes môže byť potom analyzovaná štandardnými technikami ako je gelová elektroforéza na detekciu produktov štiepenia, ktoré budú ukazovať chybné párovanie medzi próbou a vzorkou.

(7) Iné metódy

Rôzne iné metódy na detekciu mutácií presenilínov, založené na sekvenciách presenilínov tu opísaných, budú jasné odborníkom v obore. Ktorákoľvek z týchto môže byť využitá v súlade s predkladaným vynálezom. Tieto zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, nukleasové protekčné testy (S1 alebo ligasou sprostredkované), ligovaný PCR, denaturačnú gradientovú gelovú elektroforézu (DGGE; viď. napr. Fischer and Lerman, 1983), vyhľadávanie reštrikčnými endonukleázami v kombinácii s SSCP (REF-SSCP; viď. napr. Liu and Sommer, 1995), a podobne.

D. Iné vyšetrenia a diagnostika

V dedičných prípadoch, ako primárna udalosť, a v nededičných prípadoch ako sekundárna udalosť spôsobená stavom choroby, sa môže vyskytnúť abnormálne spracovanie PS1, PS2, APP alebo proteínov reagujúcich s PS1, PS2 alebo APP. Toto môže byť detekované ako abnormálna fosforylácia, glykosylácia, glykačná amidácia, alebo proteolytické štiepne produkty v telesných tkanivách alebo tekutinách (napr. CSF alebo krvi).

Diagnóza môže byť tiež urobená pozorovaním alterácií v presenilínovej transkripcii, translácii a posttranslačnej modifikácii a spracovanie, rovnako ako alteráciou v intracelulárnom a extracelulárnom prenose produktu génu pre presenilín v mozgu a periférnych bunkách. Takéto zmeny budú obsahovať alterácie v množstve presenilínovej messengerovej RNA a/alebo proteínu, alterácie vo fosforylačnom stave, abnormálne intracelulárne umiestnenie/distribúciu, atď. Takéto testy budú zahŕňať: Northern Blots (s presenilín špecifickými a nešpecifickými nukleotidovými próbami), Western Blots a enzýmovo viazaný imunosorbentný test (ELISA) (s protilátkami namierenými špecificky k presenilínu alebo k presenilínovej funkčnej doméne, vrátane rôznych post-translačných modifikačných stavov vrátane glykosylovaných a fosforylovaných izoform). Tieto testy môžu byť vykonané na periférnych tkanivách (napr. krvných bunkách, plazme, kultivovaných alebo iných fibroblastových tkanivách, atď.) rovnako ako na biopsiách CNS tkanivách získaných antemortom alebo postmortom, a na mozgovomiechovej tekutine. Takéto testy môžu tiež obsahovať in situ hybridizáciu a imunohistochemické vyšetrenie (pre lokalizáciu messengerovej RNA a proteínu do špecifických subcelulárnych kompartmentov a/alebo v neuropatologických štruktúrach asociovaných s týmito chorobami ako sú neurofibrilárne oči alebo plaky amyloidu).

E. Vyšetrovacie a diagnostické kity

V súlade s predkladaným vynálezom sú tiež poskytnuté diagnostické kity, ktoré obsahujú reagens nevyhnutné pre vyššie opísané diagnostické vyšetrenia. Napríklad, môžu byť poskytnuté kity obsahujúce protilátky alebo sady protilátok, ktoré sú špecifické pre jeden alebo viacej mutantných epitopov. Tieto protilátky môžu byť v jednotlivom vyhotovení značené akýmikoľvek štandardnými

prostriedkami, ktoré uľahčujú vizualizáciu a väzbu. Alternatívne, môžu byť poskytnuté kity, v ktorých sú prítomné oligonukleotidové próby alebo PCR priméry, ako boli opísané vyššie, na detekciu a/alebo amplifikáciu mutantných PS1, PS2 a iných, s presenilínmi spojených sekvencií. Opäť, takéto próby môžu byť značené pre jednoduchšiu detekciu špecifickej hybridizácie. Podľa vhodnosti pre rôzne diagnostické vyšetrenia opísaných vyššie, oligonukleotidové próby a protilátky v takých kitoch môžu byť imobilizované na substrátoch a môžu byť poskytnuté vhodné kontroly.

10. Metódy liečby

Predkladaný vynález teraz poskytuje základ pre terapeutický zásah u ochorení, ktoré sú spôsobené, alebo ktoré môžu byť spôsobené, mutáciami presenilínov. Ako bolo podrobne opísané vyššie, mutácie v PS1 a PS2 génoch sú asociované s vývojom foriem Alzheimerovej choroby so skorým nástupom a preto je predkladaný vynález najmä zameraný na liečbu subjektov s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou, alebo tých, u ktorých je riziko jej rozvoja. Vo svetle expresie PS1 a PS2 génov v rôznych tkanivách je však dosť pravdepodobné, že účinok mutácií v tomto lokuse nie je obmedzený na mozog a preto môžu byť príčinou iných chorôb než Alzheimerovej choroby. Preto je predkladaný vynález tiež zameraný na choroby manifestujúce sa v iných tkanivách, ktoré môžu vznikáť z mutácií, chybnéj expresie, chybného metabolizmu alebo iných zdedených alebo získaných alterácií génov pre presenilíny a génových produktov. Okrem toho, aj keď sa Alzheimerova choroba manifestuje ako neurologické ochorenie, môže byť táto manifestácia spôsobená mutáciami v presenilínoch, ktoré najprv ovplyvňujú iné orgánové tkanivá (napr. pečeň), ktoré potom uvoľňujú faktory, ktoré ovplyvňujú mozgovú aktivitu a nakoniec spôsobujú Alzheimerovu chorobu. Preto po zvážení rôznych terapií uvedených ďalej, je chápané, že takéto terapie môžu byť zamerané na iné tkanivá ako je mozgová, ako je srdce, placenta, pľúca, pečeň, kostrový sval, ľadvina a slinivka, kde sú PS1 a/alebo PS2 tiež expriované.

Bez väzby na akúkoľvek jednotlivú teóriu podľa vynálezu sa účinok mutácií spojených s Alzheimerovou chorobou zdá byť výsledkom získania novej funkcie alebo akcelerácie normálnej funkcie, čo priamo alebo nepriamo spôsobuje aberantné spracovanie

prekurzorového proteínu pre amyloid (APP) na A β peptid, abnormálnu homeostázu fosforylácie, a/alebo abnormálnu apoptózu v mozgu. Takéto získanie funkcie alebo akcelerácie funkčného modelu bude konzistentné s nástupom symptómov v dospelosti a s dominantnou dedičnosťou Alzheimerovej choroby. Avšak, mechanizmus, ktorým môžu mutácie v presenilínoch spôsobiť tieto účinky zostáva neznámy.

Je známe, že APP môže byť metabolizovaný dvomi cestami. Pri prvej je APP metabolizovaný pasážou cez Golgiho sieť a potom sekrečnou dráhou prostredníctvom clathrinom potiahnutých váčkov. Zrelý APP je potom pasážovaný do plazmatickej membrány, kde je štiepený -sekretáziou za produkcie solubilnej frakcie (Proteasa Nexin II) plus non-amyloidogénneho C-terminálneho peptidu (Selkoe et al., 1995; Gandy et al., 1993). Alternatívne môže byť zrelý APP nasmerovaný do endosom-lyzozomovej dráhy, kde podlieha štiepeniu β a γ -sekretázie za produkcie A β peptidu. A β peptidové deriváty APP sú neurotoxické (Selkoe et al., 1994). Fosforylačný stav bunky určuje relatívnu rovnováhu medzi -sekretáziovou (non-amyloidogénnou) a A β dráhou (amyloidogénnou dráhou) (Gandy et al., 1993) a môže byť modifikovaný farmakologicky forbololovými esterami, agonistami muskarínu a inými agens. Fosforylačný stav bunky sa zdá byť ovplyvnený faktormi cytosolu (najmä proteín kinasu C) účinkujúcimi pod jedným alebo viacerými integrálnymi membránovými proteínami v Golgiho sieti.

Bez väzby na akúkoľvek jednotlivú teóriu podľa vynálezu, presenilíny, najmä hPS1 a hPS2 (ktoré nesú niekoľko konsenzuálnych sekvencií pre proteín kinasu C) môžu byť integrálne membránové proteíny, ktorých fosforylačný stav určuje relatívnu rovnováhu medzi -sekretázovou a A β dráhou. Tak mutácie v PS1 alebo PS2 génoch môžu spôsobovať alterácie v štruktúre a funkcii ich produktov smerujúce k defektným interakciám s regulačnými elementami (napr. proteín kinasou C) alebo s APP, čo spôsobí, že APP je nasmerovaný k amyloidogénnej endosom-lyzozomovej dráhe. Faktory prostredia (napr. víry, toxíny alebo vek) môžu mať tiež podobný účinok na PS1 alebo na PS2.

Opäť bez väzby na akúkoľvek jednotlivú teóriu podľa vynálezu, je tiež zaznamenané, že obidva PS1 a PS2 proteíny majú významnú

homológiu sekvencie aminokyselín s ľudskými proteínami iontových kanálov a receptorov. Napríklad, PS2 proteín vykazuje významnú homológiu k - podjednotke ľudského sodíkového kanálu ($E = 0,18$, $P = 0,16$, identity = 22 - 27% v dvoch regiónoch s aspoň 35 aminokyselinovými zvyškami) pri použití BLASTP vzorca podľa Altschula et al., (1990). Iné ochorenia (ako je malígna hypertermia a hyperkalemická periodická paralýza u ľudí, a degenerácia mechanosenzorických neurónov u *C. elegans*) vznikajú z mutácií iontových kanálov alebo receptorových proteínov. Mutácie PS1 alebo PS2 génu môžu, preto, postihovať podobné funkcie a viesť k Alzheimerovej chorobe a/alebo iným psychiatrickým a neurologickým ochoreniam.

Terapia pre liečbu s presenilínmi asociovaných ochorení ako je AD môžu byť založené na:

- 1) podávanie normálnych PS1 alebo PS2 proteínov,
- 2) génovej terapii normálnymi PS1 alebo PS2 génmi pre kompenzáciu alebo nahradenie mutantných génov,
- 3) génovej terapii založenej na antisenzii sekvenčných k mutantným PS1 alebo PS2 génom alebo na tých, ktoré "knock-outujú" mutantné gény,
- 4) génovej terapii založenej na sekvenciách, ktoré kódujú proteín, ktorý blokuje alebo napravnúje škodlivý účinok PS1 alebo PS2 mutantov,
- 5) imunoterapii založenej na protilátkach k normálnym a/alebo mutantným PS1 alebo PS2 proteínom, alebo
- 6) na malých molekulách (liečivách), ktoré alterujú expresiu PS1 alebo PS2, blokujú abnormálne interakcie medzi mutantnými formami PS1 alebo PS2 a inými proteínami a ligandmi, alebo ktoré inak blokujú aberantnú funkciu mutantných PS1 alebo PS2 proteínov alteráciou štruktúry mutantných proteínov, zvýšením ich metabolickej clearance alebo inhibíciou ich funkcie.

A. Proteínová terapia

Liečba Alzheimerovej choroby spojenej s presenilínmi, alebo iných ochorení vzniknutých z mutácií presenilínov, môže byť vykonaná nahradením mutantného proteínu normálnym proteínom, modulovaním funkcie normálneho proteínu pre redukciu akejkoľvek aberantnej funkcie mutantných proteínov.

Na realizáciu tohto je nevyhnutné získať, ako je tu opísané, veľké množstvá v podstate čistých PS1 proteínu alebo PS2 proteínu zo systému kultivovaných buniek, ktoré môžu exprimovať tento proteín. Dopravenie proteínu do postihnutých oblastí mozgu môže byť uskutočnené pri použití vhodných obalových alebo podávacích systémov vrátane, napríklad, lipozómami sprostredkovaného podania proteínov cieľovým bunkám.

B. Génová terapia

V jednej sérii uskutočnenia môže byť využitá génová terapia, v ktorej sú normálne kópie PS1 génu alebo PS2 génu zavedené pacientovi pre úspešné kódovanie normálneho proteínu v jednom alebo viacerých typoch postihnutých buniek. Gén musí byť týmto bunkám dopravený v takej forme, v ktorej môže byť vychytávaný a môže dostatočne kódovať proteín pre poskytnutie efektívnej funkcie. Tak je preferované, aby rekombinantný gén bol operatívne pripojený na silný promotor tak, aby bola poskytnutá vysoká hladina expzie, ktorá bude kompenzovať, alebo prevažovať, mutantné proteíny. Ako je uvedené vyššie, rekombinantné konštrukty môžu obsahovať endogénne alebo exogénne regulačné elementy, indukovateľné alebo reprimovateľné regulačné elementy alebo tkanivové špecifické regulačné elementy.

V inej sérii realizácie môže byť génová terapia využitá pre nahradenie mutantného génu homológnu rekombináciou a rekombinantným konštruktom.

Rekombinantný konštrukt môže obsahovať normálnu kópiu cieľového génu pre presenilín, a v tom prípade je defekt korigovaný in situ, alebo môže obsahovať "knock-out" konštrukt, ktorý zavádza stop kodón, chybnú mutáciu alebo deléciu, ktorá ruší funkciu mutantného génu. S ohľadom na toto by sa malo zmieniť o tom, že

takýto konštrukt môže vyradiť jednak normálne, tak aj mutantné kópie cieľového génu pre presenilín u heterozygotného jedinca, ale celková strata funkcie génu pre presenilín môže byť menej škodlivá pre jedinca než trvalý progres chorobného stavu.

V inej sérii uskutočnenia môže byť využitá antisense génová terapia. Antisense terapia je založená na skutočnosti, že sekvenčne špecifická supresia génovej expresie môže byť dosiahnutá intracelulárnou hybridizáciou medzi mRNA alebo DNA a komplementárnymi antisense druhmi. Tvorba hybridného duplexu môže potom interferovať s transkripciou génu a/alebo so spracovaním, transportom, transláciou a/alebo stabilitou cieľovej presenilínovej mRNA. Antisense stratégia môže využívať mnoho prístupov vrátane podávania antisense oligonukleotidov alebo antisense oligonukleotidových analógov (napr. analógov s fosforylovanou kostrou) alebo transfekcia s antisense RNA expresnými vektormi. Opäť, takéto vektory môžu obsahovať endogénne alebo exogénne regulačné elementy, indukovateľné alebo reprivovateľné regulačné elementy alebo tkanivové špecifické regulačné elementy.

V inej sérii uskutočnenia môže byť génová terapia použitá pre zavedenie rekombinantného konštraktu kódujúceho proteín alebo peptid, ktorý blokuje alebo inak koriguje aberantnú funkciu spôsobenú mutantným génom pre presenilín. V jednom vykonaní môže rekombinantný gén kódovať peptid, ktorý korešponduje mutantnej doméne presenilínu, o ktorej bolo zistené, že abnormálne interaguje s iným bunecným proteínom alebo s iným bunecným ligandom. Tak, napríklad, pokiaľ je o mutantnej TM6->7 doméne zistené, že interaguje s určitým bunecným proteínom, ale že korešpondujúca normálna TM6->7 doména nepodlieha tejto interakcii, môže byť génová terapia použitá pre poskytnutie prebytku mutantnej TM6->7 domény, ktorá môže súťažiť s mutantným proteínom a inhibovať alebo blokovat' aberantnú interakciu. Alternatívne, časť proteínu, ktorá interaguje s mutantným, ale nie s normálnym presenilínom, môže byť kódovaná a expriovaná rekombinantným konštruktom tak, aby súťažila s, a preto inhibovala alebo blokovala aberantnú interakciu. Nakoniec, v inom vyhotovení, rovnaký účinok môže byť dosiahnutý inzerciou druhého mutantného proteínu génovou terapiou v prístupe podobnom korekcii "Deg 1(d)" a "Mec 4(d)" mutácií u *C. elegans* inzerciou mutantných

transgénov.

Retrovírové vektory môžu byť použité na génovú terapiu pre somatické bunky najmä pre ich vysokú účinnosť infekcie a stabilnú integráciu a expresiu. Cieľová bunka musí byť schopná sa deliť a hladiny expresie normálneho proteínu by mali byť vysoké, pretože ochorenie je dominantné. Kompletné PS1 alebo PS2 gény, subsekvencie kódujúce funkčné domény presenilínov alebo akékoľvek iné terapeutické peptidy opísané vyššie môžu byť klonované do retrovírového vektoru a riadené z jeho endogénneho promotora, z retrovírového dlhého terminálneho repeatu, alebo z promotora špecifického pre požadovaný typ cieľových buniek (napr. neurónov). Iné vírové vektory, ktoré môžu byť použité, obsahujú adeno-asociované víry, vírus vakcínie, hovädzí papiloma vírus, alebo herpetické víry ako je vírus Epstein-Barrvej.

C. Imunoterapia

Imunoterapia je pre Alzheimerovu chorobu tiež možná. Protilátky sú namierené proti mutantným PS1 a PS2 proteínom (alebo ich častiam) a sú pacientovi podávané pre väzbu alebo na blokovanie mutantného proteínu a na zabránenie jeho škodlivých účinkom. Simultánne, expresia normálneho proteínového produktu môže byť podporená. Alternatívne sú protilátky namierené proti špecifickým komplexom medzi mutantným alebo divokým typom PS1 alebo PS2 a ich interakčnými partnermi.

Ďalším prístupom je stimuláci endogénnej produkcie protilátok k požadovanému antigénu. Podanie môže byť vakonané vo forme jednorazového imunogénneho prípravku alebo vakcínovej imunizácie. Imunogénna kompozícia môže byť pripravená ako injikovateľná, ako kvapalný roztok alebo ako emulzia. PS1 a PS2 proteín alebo iný antigén môže byť zmiešaný s farmaceuticky akceptovateľným excipients kompatibilným s proteínom. Takéto excipients môžu zahrňovať vodu, salinický roztok, dextrózu, glycerol etanol a ich kombinácie. Imunogénna kompozícia a vakcíny môžu tiež ďalej obsahovať prídavné substancie ako sú emulzifikačný agens alebo adjuvans na zvýšenie účinnosti. Imunogénne kompozície a vakcíny môžu byť podávané parenterálne injekciou subkutánne alebo intramuskulárne.

Imunogénne prípravky a vakcíny sú podávané v takom množstve, aby boli terapeuticky účinné, ochranné a imunogénne. Dávkovanie závisí od spôsobu podávania a bude sa veľmi líšiť podľa veľkosti pacienta.

D. Terapeutika malých molekúl

Ako je tu opísané, poskytuje predkladaný vynález mnoho metód na identifikáciu malých molekúl a iných zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe Alzheimerovej choroby a iných ochorení spôsobených presenilínmi. Tak napríklad, predkladaný vynález poskytuje metódy na identifikáciu proteínov a iných bunkových zložiek, ktoré sa viažu na alebo inak interagujú s mutantnými presenilínmi, ale nie s normálnymi presenilínmi. Vynález tiež poskytuje metódy na identifikáciu malých molekúl, ktoré môžu byť použité pre narušenie amerantných interakcií medzi mutantnými presenilínmi a takými proteínami alebo inými bunkovými zložkami.

Takéto interakcie, vyžadujúce mutantné, ale nie normálne presenilíny, neposkytujú len informáciu užitočnú na pochopenie biochemickej dráhy narušenej mutáciou v presenilínoch, a kauzálne pre Alzheimerovu chorobu, ale tiež poskytujú bezprostredný terapeutický cieľ pre intervenciu v etiológii ochorení. Identifikáciou týchto proteínov a analýzou týchto interakcií je možné vyšetrovať alebo projektovať zlúčeniny, ktoré pôsobia proti alebo bránia interakciám, čo poskytuje možnú liečbu pre abnormálne interakcie. Táto liečba bude meniť interakcie presenilínov s ich partnermi, meniť funkciu interagujúceho proteínu, meniť množstvo alebo tkanivovú distribúciu expresie interakčných partnerov alebo meniť podobné vlastnosti u presenilínov samotných.

Terapie môžu byť projektované pre moduláciu týchto interakcií a tak pre moduláciu Alzheimerovej choroby a iných stavov asociovaných so získanými alebo dedičnými abnormalitami PS1 alebo PS2 génov alebo ich génových produktov. Potenciálna účinnosť tejto terapie môže byť testovaná analyzovaním afinity a funkcie týchto interakcií po expozícii terapeutického agens štandardnému farmakokinetickému meraniu afinity (K_d a V_{max} atď.) pri použití syntetických peptidov alebo rekombinantných korešpondujúcich funkčnými doménami PS1 génu, PS2 génu alebo inými

presenilínovými homológmi. Iná metóda na testovanie účinku takých interakcií obsahujúcich funkčné domény ako sú hydrofilné slučky je monitorovanie zmien v intracelulárnom prenose a posttranslačnej modifikácii relevantného génu in situ hybridizácií, imunohistochemií, Western blotom a metabolickými pulznými rádioaktívne značenými štúdiami za prítomnosti alebo pri absencii terapeutických agens. Ďalšou metódou je monitorovanie účinkov "downstream" dejov, ako sú (i) zmeny v intracelulárnom metabolizme, prenose a zameraní APP a jeho produktov; (ii) zmeny v dejoch druhého posla, napr. cAMP intracelulárny Ca^{2+} , aktivity proteín kinas atď.

Ako bolo uvedené vyššie, môžu byť presenilíny zahrnuté v metabolizme APP a fosforylačný stav presenilínov môže byť zásadný pre rovnováhu medzi -sekretasovou a A β dráhou v spracovaní APP. Pri použití transformovaných buniek a zvieračích modelov podľa predkladaného vynálezu je možné ľahšie pochopiť tieto dráhy a aberantné deje, ktoré sa vyskytujú u presenilínových mutantov. Použitím týchto znalostí je možné projektovať terapeutické stratégie pôsobiace proti škodlivým účinkom presenilínových mutantov.

Na liečbu Alzheimerovej choroby, napríklad, môže byť fosforylačný stav PS1 pozmenený chemickými a biochemickými agens (napr. liekmi, peptidmi a inými zlúčeninami), ktoré menia aktivitu proteín kinasy C a iných proteín kinas, alebo ktoré menia aktivitu proteín fosfatas, alebo ktoré modifikujú dostupnosť PS1, ktorý má byť posttranslačne modifikovaný. Interakcie kinas a fosfatas s presenilínovými proteínami a interakcie presenilínových proteínov s inými proteínami obsiahnutými v prenose APP v Golgiho sieti, môžu byť modulované na zníženie Golgiho včkov do endosom-lysozómvej dráhy, čo inhibuje produkciu A β peptidu. Takéto zlúčeniny budú zahrňovať peptidové analógie APP, PS1, PS2 a iných homológov presenilínu, rovnako ako iné interagujúce proteíny, lipidy, cukry a agens, ktoré navodzujú rôznu glykosyláciu PS1, PS2 a/alebo ich homológov; agens, ktoré menia biologický polčas presenilínovej mRNA alebo proteínov, vrátane protilátok a antisense oligonukleotidov; a agens, ktoré pôsobia na PS1 a/alebo PS2 transkripciu.

Účinok týchto agens v bunkových líniiach a na zvieratách môže

byť monitorovaný monitorovaním transkripcie, translácie a post-translačnej modifikácie PS1 a/alebo PS2 (napr. forforylácia alebo glykosylácia), rovnako ako monitorovaním intracelulárneho prenosu PS1 a/alebo PS2 cez rôzne intracelulárne a extracelulárne kompartmenty. Metódy pre tieto štúdie zahrňujú Western a Northern bloty, imunoprecipitáciu po metabolickom označení ("pulse-chase") radioznačným methionínom a ATP, a imunohistochémiou. Účinok týchto agens môže byť tiež monitorovaný pomocou použitia štúdií, ktoré vyšetrujú relatívne väzobné afinity a relatívne množstvo PS1 a/alebo PS2 proteínov obsiahnutých v interakciách s proteín kinasou C a/alebo pomocou použitia buď štandardných testov väzobnej afinity alebo ko-presipitácie a Western blotov pri použití protilátok k proteín kinase C, APP, PS1, PS2 alebo iným presenilínovým homológom. Účinok týchto agens môže byť tiež monitorovaný hodnotením produkcie A β peptidov ELISA pred a po expozícii putatívnemu terapeutickému agens (viď. Huang et al., 1993). Účinok môže byť tiež monitorovaný hodnotením životaschopnosti bunkových línií po expozícii soliam hliníku a/alebo A β peptidom, o ktorých sa usudzuje, že sú neurotoxické pri Alzheimerovej chorobe. Nakoniec, účinok týchto agens môže byť tiež monitorovaný hodnotením kognitívnej funkcie zvierat nesúcich normálne genotypy v APP a/alebo ich presenilínových homologách, zvierat nesúcich APP transgénu (s alebo bez mutácií), zvierat nesúcich ľudské presenilínové transgénu (s alebo bez mutácií), alebo nesúcich akékoľvek kombinácie uvedených vyššie.

Podobne, ako bolo uvedené vyššie, presenilíny môžu byť obsiahnuté v regulácii Ca²⁺ ako receptory alebo ako iontové kanály. Táto úloha presenilínov môže byť tiež vyšetrovaná pomocou použitia bunkových línií a zvieracích modelov podľa predkladaného vynálezu. Vzhľadom k týmto výsledkom môže byť produkován test pre Alzheimerovú chorobu na detekciu abnormálnej receptorovej funkcie alebo abnormálnej funkcie iontového kanálu spojenou s abnormalitami, ktoré sú získané alebo zdedené v génoch pre presenilíny alebo ich produktoch, alebo v jednom z homológnych génov alebo ich produktoch. Tento test môže byť vykonaný ako in vivo, tak in vitro meraním prietoku iontovým kanálom a/alebo transmembránového napätia alebo prúdu pomocou použitia náplastových svoriek, napäťových svoriek a fluorescentných farbív senzitivných na intracelulárny vápnik alebo na transmembránové

napätie. Defektná funkcia iontového kanálu alebo receptoru môže byť tiež meraná aktiváciou druhého posla ako je cyklický AMP, cGMP tyrosin kinasa, fosfatasa, zvýšenie hladín intracelulárneho Ca^{2+} , atď. Tiež môžu byť rekonštruované rekombinantne vyrobené proteíny v arteficiálnych membránových systémoch na štúdium vodivosti iontového kanálu. Terapie, ktoré ovplyvňujú Alzheimerovu chorobu (spôsobenú získanými alebo zdedenými defektami v PS1 géne alebo PS2 géne; spôsobenou defektami v inej dráhe, ktoré vedú k tejto chorobe, ako sú mutácie v APP; a spôsobenou faktormi prostredia) môžu byť testované analýzou ich schopnosti modifikovať abnormálnu funkciu iontového kanálu alebo receptoru indukovanou mutáciou v géne pre presenilín. Terapie môžu byť tiež testované ich schopnosťou modifikovať normálnu funkciu iontového kanálu alebo kapacity receptoru presenilínových proteínov. Takéto testy môžu byť vykonané na kultivovaných bunkách exprimujúcich normálne alebo mutantné PS1 gény/génové produkty alebo PS1 gény/génové produkty. Takéto štúdie môžu byť tiež vykonané na bunkách transferovaných vektormi schopnými expresie presenilínov, alebo funkčných domén jedného z presenilínov, v normálnej alebo mutantnej forme. Terapie pre Alzheimerovu chorobu môžu byť navrhnuté na modifikáciu abnormálnej funkcie iontového kanálu alebo receptoru PS1 génu alebo PS2 génu. Takýmito terapeutickými látkami môžu byť bežné liečivá, peptidy, cukry alebo lipidy, rovnako ako protilátky alebo iné ligandy, ktoré ovplyvňujú vlastností PS1 alebo PS2 génového produktu. Takéto terapie môžu byť tiež uskutočnené priamym nahradením PS1 génu a/alebo PS2 génu génovou terapiou. V prípade iontového kanálu môže byť génová terapia vykonaná použitím buď minigénov (cDNA plus promotoru), alebo genómových konštruktov nesúcich genómovú DNA sekvenciu pre časť alebo pre celý gén pre presenilín. Mutantné presenilínové alebo homológne génové sekvencie môžu byť tiež použité na zabránenie účinku dedičných a získaných abnormalít v génoch pre presenilíny ako bolo nedávno uskutočnené nahradením Mec 4 a Deg 1 u *C. elegans* (Huang and Chalfie, 1994). Terapie môžu byť tiež zamerané na posilnenie funkcie receptora alebo iontového kanálu jedného homógu, tak ako je PS2 gén, tak, aby mohol potenciálne prevziať funkcie mutantnej formy iného homógu (napr. PS1 génu, ktorý je defektný vďaka získaným alebo dedičným defektom). Terapia pri použití antisenzie oligonukleotidov na blokovanie expresie mutantného PS1 génu alebo mutantného PS2 génu,

koordinovaná s génovým nahradením normálneho PS1 alebo PS2 génu môže byť tiež aplikovaná pomocou použitia štandardných techník buď génovej terapie, alebo terapie proteínovej náhrady.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Vývoj genetického, fyzikálneho "obsahu" a transkripčné mapy minimálneho kosegregačného regiónu

CEPH MegaYac a RPCI PAC ľudskej knižnice celkovej genómovej DNA boli prehľadávané na klony, obsahujúce genómové DNA fragmenty z AD 3 regiónu chromozómu 14q24.3 pri použití oligonukleotidových prôb pre každý z 12 SSR makerových lokusov použitých v štúdiách genetickej väzby, rovnako ako pri použití ďalších markerov (Albertsen et al., 1990; Chumakov et al., 1992; Ioannu et al., 1994). Vzdialenosti v genetickej mape medzi každým markerom sú znázornené nad susednými úsekmi a sú odvodené od publikovaných dát (NIH/CEPH Colaborative Mapping Group, 1992; Wang, 1992; Weissenbach et al., 1992; Gyapay et al., 1994). Klony získané pre každý počiatočný markerový lokus boli zostavené do riadnych sérií čiastočne sa prekrývajúcich klonov ("susedov") pri použití štyroch nezávislých metód. Prvé sekvencie reprezentujúce koniec YAC inzertov boli izolované inverzným PCR (Riley et al., 1990) a hybridizované na Southern blot paneli obsahujúci produkty reštrikčného trávenia DNA zo všetkých YAC klonov získaných pre všetky počiatočné lokusy tak, aby sa identifikovali iné YAC klony nesúce prekrývajúce sa sekvencie. Po druhé, bola vykonaná inter-Alu PCR na každom YAC a vzniknuté vzorky prúžkov boli porovnávané medzi poolami získaných YAC klonov tak, aby sa identifikovali iné klony nesúce prekrývajúce sa sekvencie (Bellamne-Chartelot et al., 1992; Chumakov et al., 1992). Po tretie, pre vylepšenie špecificity Alu-PCR vyhľadávania bola YAC DNA resrihovaná HaeIII alebo RsaI, reštrikčné produkty boli amplifikované ako Alu, tak L1H konsenzuálnymi primermi a produkty boli vyšetrované polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Konečne, pretože ďalšie STS boli generované v priebehu vyhľadávania transkribovaných sekvencií, boli tieto STS tiež použité na identifikáciu prekrývajúcich sa klonov. Výsledné susediace úseky boli kompletne okrem jedinej diskontinuity medzi YAC932C7 nesúcim D14S53 a YAC746B4 nesúcim D14S61. Fyzikálna mapa poradia STS v susedných úsekoch bola v súlade s mapou genetickej väzby pre tento región (NIH/CEPH Colaborative Mapping group, 1992; Wang and

Weber, 1992; Weisenbach et al., 1992; Gaypay et. al., 1994). Aj keď, rovnako ako v genetických mapách, nebolo možné jednoznačne vyriešiť relatívny rád lokusov v D14S43/D14S71 zoskupení a D14S76/D14S73 zoskupení. PAC1 klony naznačovali, že D14S277 je telomerický k D14S268, pokým genetické mapovania naznačovali opačné poradie. Ďalej, niekoľko STS prób zlyhalo pri detekcii hybridizačných vzorkách u aspoň jedného YAC klonu, u ktorého, na základe najšetrnejšej konsenzuálnej fyzikálnej mapy a z genetickej mapy, bolo predpokladané, že obsahuje tento STS. Napríklad, D14S268 (AFM265) a RSCAT7 STS sú neprítomné v YAC788H12. Pretože tieto výsledky boli reprodukovateľné a vyskytovali sa s niekoľkými rôznymi STS markermi, odrážajú tieto výsledky s najväčšou pravdepodobnosťou prítomnosť malých intersticiálnych delécií v jednom z YAC klonov.

Príklad 2

Kumulatívne dvojbodové loď skóre pre chromozómové 14q24.3 markery.

Genotypy v každom polymorfnom mikrosatelitnom markerovom lokuse boli určené PCR zo 100ng genómovej DNA od všetkých dostupných postihnutých alebo nepostihnutých členov rodokmeňa ako bolo opísané skôr (St.George-Hyslop et al., 1992) pri použití sekvencií primérov špecifických pre každý mikrosatelitný lokus (Weisenbach et al., 1992; Gaypay et. al., 1994). Normálna populačná frekvencia každej alely bola určená pri použití manželov a iných neurologicky normálnych subjektov z rovnakej etnickej skupiny, ale nelíšila sa signifikantne od frekvencie stanovenej pre zmiešanú Kaukazskú populáciu (Weisenbach et al., 1992; Gaypay et al., 1994). Maximálne pravdepodobné kalkulácie hodnotené vo veku nástupu korekcie, frekvencia markerovej alely odvodená od publikovaných sérií zmiešaných Kaukazských subjektov a stanovenej frekvencie alel pri AD3 mutácii 1:1000 boli, ako bolo skôr opísané (St.George-Hyslop et al., 1992). Analýzy boli opakované pri použití rovnakých frekvenciách markerových alel a pri použití fenotypovej informácie len od postihnutých členov rodokmeňov, ako bolo skôr opísané na zaistenie toho, že nepresnosti v hodnotených parametroch použitých v kalkuláciach maximálnej pravdepodobnosti nebudú zavádzajúce pre analýzu (St.George-Hyslop et al., 1992).

Tieto doplnkové analýzy nealterovali signifikantne ani dôkazy podporujúce väzbu, ani objav rekombinantných dejov.

Príklad 3

Haplotypy medzi susediacimi markermi segregujúcimi s AD3 vo FAD

Haplotypy v rozsahu medzi centromerickými a telomerickými susediacimi markerami na pôvodnú kópiu chromozómu 14 segregujúci s AD3 u štrnástich FAD rodokmeňov s častým nástupom FAD (rodokmene NIH2, MGH1, Tor1.1, FAD4, FAD1, MEX1 a FAD2) ukazovali rodokmeňovo špecifické lod skóre $> +3,00$ s aspoň jedným markerom medzi D14S258 a D14S53. Identické čiastočné haplotypy sú pozorované v dvoch regiónoch onemocnenia nesúceho chromozómu segregujúceho v niekoľkých rodokmeňoch podobného etnického pôvodu. V regióne A sú podieľajúce sa alely pozorované v D14S268 ("B": veľkosť alely = 126 bp, frekvencia alely u normálnej Kaukazskej populácie = 0,04; "C": veľkosť = 124 bp, frekvencia = 0,38); D14S277 ("B": veľkosť = 156 bp, frekvencia = 0,19; "C" veľkosť = 154 bp, frekvencia = 0,33); a RSCAT6 ("D": veľkosť = 111 bp, frekvencia = 0,25; "E": veľkosť = 109 bp, frekvencia = 0,20; "F": veľkosť = 107 bp, frekvencia = 0,47). V regióne B sú alely identickej veľkosti pozorované v D14S43 ("A": veľkosť = 193 bp, frekvencia = 0,01; "D": veľkosť = 187 bp, frekvencia = 0,12; "E": veľkosť = 185 bp, frekvencia = 0,26; "I": veľkosť = 160 bp, frekvencia = 0,38); D14S273 ("3": veľkosť = 193 bp, frekvencia = 0,38; "4": veľkosť = 191 bp, frekvencia = 0,16; "5": veľkosť = 189 bp, frekvencia = 0,34; "6": veľkosť = 187 bp, frekvencia = 0,02) a D14S76 ("1": veľkosť = bp, frekvencia = 0,01); "5": veľkosť = bp, frekvencia = 0,38); "6": veľkosť = bp, frekvencia = 0,07); "9": veľkosť = bp, frekvencia = 0,38). Viď. Sherrington et al., (1995) pre podrobnosti.

Príklad 4

Získanie transkribovaných sekvencií z AD3 intervalu

Putatívne transkribované sekvencie kódované v AD3 intervale boli získané pri použití priamej hybridizačnej metódy, v ktorej boli krátke hybridizačné fragmenty generované z ľudskej mozgovej

mRNA hybridizované na imobilizované klonované genómové cDNA fragmenty (Rommens et al., 1993). Vzniknuté krátke putatívne transkribované sekvencie boli použité ako próby pre získanie dlhších transkriptov z knižníc ľudskej mozgovej cDNA (Stratagene, La Jolla). Fyzikálne umiestnenie originálnych krátkych klonov a následne získaných dlhších cDNA klonov bolo stanovené analýzou hybridizačných vzoriek generovaných hybridizáciou probe na Southern bloty obsahujúci panel EcoRI trávených celkových DNA vzoriek izolovaných od jednotlivých YAC klonov v susediacich úsekoch. Sekvencia nukleotidov každého z dlhších cDNA klonov bola určená automatizovaným cyklickým sekventovaním (Applied Biosystems Inc., CA), a bola porovnaná s inými sekvenciami v nukleotidovej a proteínovej databáze pri použití blast algoritmu (Altschul et al., 1990). Prírastkové čísla pre transkribované sekvencie sú: L40391, L40392, L40393, L40394, L40395, L40396, L40397, L40398, L40399, L40340, L40341, L40342 a L40343.

Príklad 5

Lokalizácia mutácií v PS1 géne za použitia restriktčných enzýmov

Prítomnosť A246E mutácie, ktorá vytvára DdeI miesto, bola testovaná v genómovej DNA PCR za použitia koncového značených primerov korešpondujúcich v podstate bp 907 - 925 v SEQ ID NO: 1 a neznačených primerov korešpondujúcich komplementu bp 1010 - 990 v SEQ ID NO: 1, za amplifikácie 84 bp genómového exonového fragmentu za použitia 100 ng genómového DNA templátu, 2 mM $MgCl_2$, 10 pmol každého primeru, 0,5 U Taq polymerasy, 250 M dNTP pre 30 cyklov 95 °C x 20 sekúnd, 60 °C x 20 sekúnd, 72 °C x 5 sekúnd. Produkty boli inkubované s prebytkom DdeI po 2 hodiny podľa protokolu výrobcu a vzniknuté restriktčné fragmenty boli vyšetrované na 6% nedenaturujúcom polyakrylamidovom géle a vizualizované autorádiografiou. Prítomnosť mutácií bola odvodená zo štiepenia 84 bp fragmentu vďaka prítomnosti DdeI restriktčného miesta. Všetci postihnutí členmi FAD1 rodokmeňa a niekoľko rizikových členov nieslo DdeI miesto. Nikto z obligátne nepostihnutých (tých jedincov, ktorí nemajú onemocnenie a majú vek vyšší než 70 rokov) a nikto z normálnych kontrol neniesol DdeI mutáciu.

Príklad 6

Prítomnosť C410Y mutácie bola testovaná za použitia alelovo špecifických nukleotidov. 100 ng genómovej DNA bolo amplifikované pri použití primeru exonovej sekvencie korešpondujúceho bp 1451 - 1468 SEQ ID NO: 1 a protiľahlého primeru intronovej sekvencie korešpondujúceho komplementárnym bp k bp 719 - 699 SEQ ID NO: 14 pri použití vyššie uvedených reakčných podmienok okrem 2,5 mM $MgCl_2$, a podmienok cyklu 94 °C x 20 sekúnd, 58 °C x 20 sekúnd, 72 °C x 10 sekúnd. Vzniknutý 216 bp genómový fragment bol denaturovaný 10-násobným riedením v 0,4 NaOH, 25 mM EDTA a bol vákuovo "slot-blotovaný" na dvojité nylonové membrány. Koncovo značený primer "divokého typu" korešpondujúci bp 1468 - 1486 SEQ ID NO:1) a koncovo značený "mutantný" primer (korešpondujúci rovnakej sekvencii, ale s G->A substitúciou v pozícii 1477) boli hybridizované na separátne kópie slot-blotových filtrov v 5 x SSC, 5 x Denhart, 0,5% SDS po 1 hodinu pri 48 °C a potom boli premyté následne v 2 x SSC pri 23 °C a 2 x SSC, 0,1% pri 50 °C a potom exponované na röntgenovom filme. Všetci testovateľní postihnutí členovia rovnako ako niektorí rizikovní členovia AD3 a NIH2 rodokmeňov mali C410Y mutáciu. Pokusy o detekciu C410Y mutácie SSCP odhalil, že spoločný polymorfizmus intronovej sekvencie migroval s rovnakými SSCP vzorkami.

Príklad 7

Northern hybridizácia demonštrujúca expresiu PS1 proteínovej mRNA v rôznych tkanivách

Celková cytoplazmatická RNA bola izolovaná zo vzoriek rôznych tkanív (vrátane srdca, mozgu, a rôznych regiónov placenty, pľúc, pečene, kostrového svalu, ľadvín a slinivky) získaných od chirurgického patológa pri použití štandardných postupov ako je CsCl purifikácia. RNA bola potom elektroforézovaná na formaldehydovom géle pre umožnenie frakcionácie podľa veľkosti. Bola pripravená nitrocelulózová membrána a RNA bola potom transferovaná na membránu. ^{32}P -značené cDNA próby boli pripravené a pridané na membránu pre hybridizáciu medzi próbou a RNA. Po premytí bola membrána obalená v plastovom filme a umiestnená do zobrazovacích kaziet obsahujúcich röntgenový film. Autoradiografy boli potom

vyvíjané jeden až niekoľko dní. Veľkosť bola stanovená porovnaním so štandardnými RNA markermi. Analýza autoradiografií odhalila prominentné pruhy veľkosti 3,0 kb (viď. obrázok 2 podľa Sherrington et al., 1995). Northern bloty demonštrovali, že PS1 gén je exprirovateľný vo všetkých vyšetrovaných tkanivách.

Príklad 8

Eukaryotické a prokaryotické expresné vektorové systémy

Konštrukty vhodné pre použitie v prokaryotických a eukaryotických expresných systémoch boli generované pri použití troch rôznych tried inzertov PS1 nukleotidovej cDNA sekvencie. V prvej triede, nazývané konštrukty plnej dĺžky, je celá PS1 DNA sekvencia inzertovaná do expresného plasmidu v správnej orientácii a obsahuje ako prirodzený 5' UTR, tak 3' UTR sekvencie rovnako ako celý otvorený čítací rámček. Otvorený čítací rámček nesie kazetu nukleotidovej sekvencie, ktorá umožňuje, aby bol buď otvorený čítací rámček divokého typu obsiahnutý v expresnom systéme, alebo alternatívne, aby jedna alebo kombinácia dvojitéch mutácií mohla byť inzertovaná do otvoreného čítacieho rámčeku. Toto bolo uskutočnené odstránením restriktčného fragmentu z divokého typu otvoreného čítacieho rámčeku pri použití enzýmov *NarI* a *PflmI* a jeho nahradením podobným fragmentom generovaným reverznou transkriptasovou PCR a nesúcim nukleotidovú sekvenciu kódujúcu buď M146L mutáciu, alebo H163R mutáciu. Druhý restriktčný fragment bol odstránený z divokého typu normálnej nukleotidovej sekvencie pre otvorený čítací rámček štiepením enzýmami *PfmlI* a *NcoI* a restriktčným fragmentom nesúcim nukleotidovú sekvenciu kódujúcu A246E mutáciu, A260V mutáciu, A285V mutáciu, L286V mutáciu, L392V mutáciu alebo C410Y mutáciu. Tretí variant, nesúci kombináciu buď M146L alebo H163R mutácií v tandeme s jednou zo zostávajúcich mutácií, bola vykonaná väzbou *NarI*-*PflmI* fragmentu nesúceho jednu zo skôr uvedených mutácií a *PflmI*-*NcoI* fragmentu nesúceho jednu z neskoršie uvedených mutácií.

Druhá trieda cDNA inzertov, nazývaná skrátené konštrukty, bola konštruovaná odstránením 5' UTR a časti 3' UTR sekvencie z kompletnej sekvencie divokého typu alebo mutantnej cDNA sekvencie. 5' UTR sekvencia bola nahradená syntetickým

oligonukleotidom obsahujúcom KpnI restriktčné miesto (GGTAC/C) a malú sekvenciu (GCCACC) pre vytvorenie Kozak iniciačného miesta okolo ATG v počiatku PS1 ORF (bp 249 - 267 SEQ ID NO: 1). 3' UTR bol nahradený oligonukleotidom korešpondujúcim komplementu bp 2568 - 2586 SEQ ID NO: 1 s arteficiálnym EcoRI miestom v 5'konci. Mutantné varianty tohto konštruktú boli potom vytvorené inzerciou mutantných sekvencií opísaných vyššie v NarI-PflmI a PsImI-NcoI miestach ako bolo opísané vyššie.

Tretia trieda konštruktov obsahovala sekvencie odvodené od klonu cc44, v ktorom alternatívny zostrih Exonu 4 viedol k eliminácii štyroch zvyškov v N-konci (SEQ ID NO: 3).

Pre eukaryotickú expresiu boli tieto rôzne cDNA konštrukty nesúce sekvencie divokého a mutantného typu ako boli opísané vyššie, klonované do expresného vektora pZeoSV, v ktorom bola SV60 promotorová kazeta odstránená restriktčným trávením a bola nahradená CMV promotorovým elementom pcDNA3 (Invitrogén). Pre prokaryotickú expresiu boli konštrukty vyrobené pri použití glutathion S-transferasa (GST) fúzneho vektora pGEX-kg. Inzerty, ktoré boli pripojené na GST fúzne nukleotidové sekvencie sú rovnaké nukleotidové sekvencie ako boli opísané vyššie nesúce buď normálne sekvencie nukleotidov otvoreného čítacieho rámčeku, alebo nesúce kombinácie jednotlivých a dvojitéch mutácií ako bolo opísané vyššie. Tieto GST fúzne konštrukty umožňovali expresiu čiastočného alebo celého proteínu v systémoch prokaryotických buniek ako mutantný alebo divoký typ GST fúznych proteínov, čo umožňovalo purifikáciu kompletného proteínu nasledovanou odstránením GST fúzneho produktu trávením trombinom. Ďalšie cDNA konštrukty boli vyrobené s GST fúznym vektorom na umožnenie produkcie aminokyselinovej sekvencie korešpondujúcu hydrofilnú acidickú slučkovú doménu medzi TM6 a TM7 úplného proteínu, buď ako divoký typ nukleotidovej sekvencie alebo ako mutantná sekvencia nesúca buď A285V mutáciu, L286V mutáciu alebo L392 mutáciu. Toto bolo uskutočnené odobraním sekvencií divokého alebo mutantného typu z vhodných zdrojov RNA pri použití 5' oligonukleotidového priméru korešpondujúceho bp 1044 - 1061 SEQ ID NO: 1 s 5' BamHI restriktčným miestom (G/GATCC), a 3' priméru korešpondujúceho komplementu bp 1476 - 1458 SEQ ID NO: 1 s 5' EcoRI restriktčným miestom (G/AATTC). Toto umožnilo klonovanie vhodnej nukleotidovej sekvencie mutantného alebo divokého typu korešpondujúce hydrofil-

nej acidickéj slučkovej doméne v BamHI a EcoRI miestach v pGEX-KG vektore.

Príklad 9

Lokalizácia ďalších mutácií v PS1 géne

Mutácie v PS1 géne môžu byť testované mnohými stratégiami (priame sekventovanie nukleotidov, alelovo špecifickými oligonukleotidami, ligačnou polymerasovou reťazovou reakciou, SSCP, RFLP) pri použití RT-PCR produktov reprezentujúcich zrelé mRNA/cDNA sekvencie alebo genómovú DNA. Pre A260V a A285V mutácie môže byť genómová DNA nesúca exon amplifikovaná pri použití rovnakých PCR primerov a metód ako pre L286V mutáciu.

PCR produkty boli potom denaturované a "slot-blotované" na dvojité nylónové membrány pri použití slot blot protokolu pre C410Y mutáciu.

A260V mutácia bola odčítaná na týchto blotoch pri použití hybridizácie koncovo značených alelovo špecifických oligonukleotidov korešpondujúcich divokému typu sekvencie (bp 1017 - 1036 SEQ ID NO: 1) alebo mutantnej sekvencie (bp 1017 - 1036 SEQ ID NO: 1 s C->T v bp 1027) hybridizáciou pri 48 °C po ktorej nasledovalo premytie pri 52 °C v 3x SSC pufre obsahujúcom 0,1% SDS. A285V mutácia bola odčítaná na týchto slot blotoch ako bolo uvedené vyššie, okrem použitia alelovo špecifických oligonukleotidov pre divoký typ sekvencie (bp 1093 - 1111 SEQ ID NO: 1) alebo mutantného primeru (bp 1093 - 1111 SEQ ID NO: 1 s C->T v bp 1102) pri 48 °C ako bolo uvedené vyššie, okrem toho, že premývací roztok bol 2x SSC.

L392V mutácia bola odčítaná amplifikáciou exonu z genómovej DNA pri použití primérov (5' korešpondujúcich bp 439 - 456 SEQ ID NO: 14 a 3' komplementárnych k 719 - 699 SEQ ID NO: 14) pri použití štandardných PCR pufrovacích podmienok okrem toho, že koncentrácia horčíku bola 2 mM a podmienky cyklu boli 94 °C x 10 sekúnd, 56 °C x 20 sekúnd a 72 °C x 10 sekúnd. Vzniknutý genómový fragment s 200 párami báz bol denaturovaný ako je opísané pre C410Y mutáciu a slot-blotovaný na dvojité nylónové membrány.

Prítomnosť alebo absencia mutácie bola potom odčítaná podľa rôznej hybridizácie s buď divokým typom koncovo značeného oligonukleotidu (bp 1413 - 1431 SEQ ID NO: 1) alebo s koncovo značeným mutantným primerom (bp 1413 - 1431 SEQ ID NO: 1 s C->G v bp 1422) hybridizáciou pri 45 °C a potom následným premytím v 2x SSC pri 23 °C a potom pri 68 °C.

Príklad 10

Produkcia protilátok

Peptidové antigény korešpondujúce častiam ps1 proteínu boli syntetizované technikou pevnej fáze a boli purifikované reverznou fázou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie. Peptidy boli kovalentne viazané na "keyhole" prílepkový hemocyanin (KLH) cestou disulfidovej väzby, čo umožnilo pridanie cysteinového zvyšku C-koniec peptidu presenilínového fragmentu. Tento ďalší zvyšok nebol v proteínovej sekvencii normálny a bol obsiahnutý len pre uľahčenie väzby na KLH molekulu. Špecifické presenilínové sekvencie, proti ktorým boli protilátky namierené, sú nasledovné:

Polyklonálna protilátka č. hPS1 antigén (SEQ ID NO: 2)

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

Tieto sekvencie sú obsiahnuté v špecifických doménach PS1 proteínu. Napríklad, zvyšky 30 - 44 sú v N-konci, zvyšky 109- 123 sú v TM1->2 slučke a zvyšky 304 - 318 a 346 - 360 sú vo veľkej TM6->7 slučke. Každá z týchto domén je vystavená do vhodného média a môže byť zahrnutá vo väzbe na iné proteíny zásadné pre vývoj fenotypu onemocnenia. Voľba peptidov bola založená na analýze proteínovej sekvencie pri použití IBI Pustell algoritmu predpokladanej antigenicity.

Celkom traja Novozélandský biely králici boli imunizovaný peptid-KLH komplexami pre každý peptidový antigén v kombinácii s Freundovým adjuvans a boli im následne podávané dosycovacie

injekcie v sedemdňových intervaloch. Antisérum bolo odobrané pre každý peptid a bolo poolované a IgG bol precipitovaný so síranom amónnym. Protilátky boli potom afinitne purifikované so Sulfo-link agarózou (Pierce) naviazanou na vhodný peptid. Táto konečná purifikácia je vyžadovaná na odstránenie nešpecifických interakcií iných protilátok prítomných v buď pre- alebo post-imunitnom sére.

Špecificita každej protilátky bola potvrdená tromi testami. Poprvé, každá detekovala edén predominantný prúžok približnej veľkosti predpokladanej pre presenilín-1 na Western blotoch mozgového homogenátu. Podruhé, každá skrížene reagovala s rekombinantnými fúznymi proteínami nesúcimi vhodné sekvencie. Potretie, každá môže byť špecificky blokovaná pre-absorbciou s rekombinantným PS1 alebo imunizujúcim peptidom.

Okrem toho, dva rôzne PS1 peptid glutation S-transferasa (GST) fúzne proteíny boli použité na generovanie PS1 protilátok. Prvý fúzny proteín obsahoval aminokyseliny 1 - 81 (N-koniec) PS1 fúzované na GST. Druhý fúzny proteín obsahoval aminokyseliny 266 - 410 (TM6->7 slučková doména) PS1 fúzovanej na GST. Konštrukty kódujúce tieto fúzne proteíny boli generované inzerciou vhodných nukleotidových sekvencií do pGEX-2T expresného plasmidu (Amrad). Vzniknuté konštrukty obsahovali sekvencie kódujúce GST a miesto pre trombin senzitívne štepenie medzi GST a PS1 peptidom. Expresné konštrukty boli transfektované do DH5 E. coli a expresia fúznych proteínov bola indukovaná pri použití IPTG. Bakteriálne pelety boli lyzované a solubilné GST-fúzne proteíny boli purifikované jedнокrokovou afinitnou chromatografiou na glutatión sepharosových goráľkach (Boehringer Mannheim, Montreal). GST fúzne proteíny boli použité na imunizáciu myší pre generovanie monoklonálnych protilátok pri použití štandardných postupov. Klony získané od týchto myší boli vyšetrované s purifikovanými fragmentami presenilínov.

Okrem toho, GST fúzne proteíny boli štepené trombitom na uvoľnenie PS1 peptodu. Uvoľnené peptidy boli purifikované HPLC s vylučovaním podľa veľkosti a použité na imunizáciu kráľíkov na generovanie polyklonálneho antiséra.

Podobnými metódami boli vyrobené GST fúzne proteíny pri použití konštruktov obsahujúcich nukleotidové sekvencie pre aminokyseliny 1 - 87 (N koniec) alebo 272 až 390 (TM6->7 slučka) presenilínu-2 a boli použité na generovanie monoklonálnych protilátok k tomuto proteínu. PS2-GST fúzne proteíny boli tiež štepené trombínom a uvoľnené, purifikované peptidy boli použité pre imunizáciu králikov na prípravu polyklonálneho antiséra.

Príklad 11

Identifikácia mutácií v PS2 géne

RT-PCR produkty korešpondujúce PS2 ORF boli generované z RNA lymfoblastov alebo zmrazenej mŕtveho mozgového tkaniva pri použití prvého páru oligonukleotidových primérov s 5' primérom korešpondujúcim bp 478 - 496 SEQ ID NO: 18 a 3' primérom komplementárnym k bp 1366 - 1348 SEQ ID NO: 18, za vzniku 888 bp produktu, a s druhým párom primérov s 5' primérom korešpondujúcim 1083 -1102 SEQ ID NO: 18 a 3' primérom komplementárnym k bp 1909 - 1892 SEQ ID NO: 18, pri vzniku 826 bp produktu. PCR bola vykonaná pri použití 250 mMol dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 10 pMol oligonukleotidov v 10 ml pri cyklovaní 40 cyklov o 94 °C x 20 sekúnd, 58 °C x 20 sekúnd, 72 °C x 45 sekúnd. PCR produkty boli sekventované automatizovaným cyklickým sekventovaním (ABI, Foster City, CA) a fluorescentné chromatografy boli snímané na heterozygotnú nukleotidovú substitúciu priamou inšpekciou a pomocou Factura (ver.1.2.0) a Sequence Navigator (ver. 1.0.1b15) softwerových balíčkov (dáta nie sú ukázané).

Detekcia N141I mutácie: A->T substitúcia v nukleotide 787 vytvorila BclI restričné miesto. Exón nesúci túto mutáciu bol amplifikovaný zo 100 ng genómovej DNA za použitia 10 pMol každého z oligonukleotidov korešpondujúcich bp 733 - 751 SEQ ID NO: 18 (koncovo značený) a komplementu bp 846 - 829 SEQ ID NO: 18 (neznačený) a podmienok PCR reakcie podobných podmienkam opísaných ďalej pre M239V mutáciu. 2 ml PCR produktu boli restrihované BclI (NEBL, Beverly, MA) v 10 ml reakčného objemu podľa protokolu výrobcu a produkty boli vyšetrované nedenaturačnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Pri subjektoch s divým typom sekvencií je 114 bp PCR produkt štiepený

na 68 bp a 46 bp fragmenty. Mutantné sekvencie spôsobujú, že produkt štiepený na 53 bp, 46 bp a 15 bp.

Detekcia M239V mutácie: A->G substitúcia v nukleotide 1080 deletuje NlaIII restričné miesto, čo umožňuje, že M23V mutácia je detektovaná amplifikáciou zo 100 ng genómovej DNA pomocou použitia 10 pMol každého z oligonukleotidov korešpondujúcich p 1009 - 1026 SEQ ID NO: 18 a komplementu bp 1118 - 1101 SEQ ID NO: 18. PCR podmienky boli: 0,5 U Taq polymerázy, 250 mM dNTPS, 1 mCi ^{32} P-dCTP, 1,5 mM $MgCl_2$, objem 10 ml, 30 cyklov pri 94 °C x 30 sekúnd, 72 °C x 20 sekúnd, 72 °C x 20 sekúnd, pri generovaní produktu so 110 bp. 2 ml PCR reakcie boli riedené do 10 ml a restrihované 3 U NlaIII (Neb1, beverly, MY) po 3 hodiny. Restričné produkty boli vyšetrované nadenaturačnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a vizualizované autorádiografiou. Normálne subjekty vykazovali štiepenie produktov s 55, 35, 15 a 6 bp, zatiaľ čo mutantné sekvencie dávali fragmenty s 55, 50 a 6 bp.

Detekcia I420T mutácie: Podobne ako vo vyššie opísanej procedúre môže byť I420T mutácia vyšetrovaná na PCR amplifikácii genómovej DNA pomocou použitia primérov korešpondujúcich bp 1576 - 1593 SEQ ID NO: 18 a komplementu bp 1721 - 1701 SEQ ID NO: 18 za generovania produktu so 146 pásmi báz. Tento produkt môže potom byť skúšaný alelovo špecifickými oligonukleotidmi pre divý typ (napr. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18) a mutantné (napr. bp 1616 - 1632 SEQ ID NO: 18 s T-> C substitúciou v bp 1624) sekvencie.

Príklad 12

Transgénne myši

Série PS1 a PS2 génov divého a mutantného typu boli konštruované pre použitie v príprave transgénnych myší. Mutantné verzie PS1 a PS2 boli generované miestne riadenou mutagenézou klonovane cDNA cc33 (PS1) a cc32 (PS2) pomocou štandardných techník.

cDNA cc33 a cc32 a ich mutantné verzie boli použité pre prípravu dvoch tried PS1 a PS2 cDNA - mutantného a divého typu,

tak je to opísané v príklade 8. Prvá trieda, označovaná ako "kompletná" cDNA, bola pripravená odstránením približne 200 bp 3' netranslatovaného regiónu ihneď po poly a miestne trávením EcoRI (PS1) a PvuII (PS2). Druhá trieda, označovaná ako "skrátaná" cDNA, bola pripravená nahradením 5' netranslatovaného regiónu väzobným miestom pre ribozóm (Kozak konsenzuálnej sekvencie) umiestnenou ihneď 5' k ATG štartu kodónu.

Rôzne kompletne a skrátané PS1 a PS2 cDNA divého a mutantného typu, pripravené ako boli opísané vyššie, boli zavedené do jedného alebo viacerých z nasledujúcich vektorov a vzniknuté konštrukty boli použité ako zdroj génov pre produkciu transgénnych myší.

cos. TET expresný vektor:

Tento vektor bol odvodený od kosmidového klonu obsahujúceho PrP gén sýrskeho škrečka. Podrobne ho opísal Scott et al. (1992) a Hsiao et al., (1995). PS1 a PS2 cDNA (kompletné alebo skrátané) boli inzertované do tohoto vektora v jeho SalI mieste. Nakoniec konštrukty obsahovali 20 kb 5' sekvencie susediace s inzertovanou cDNA. Táto 5' susediaca sekvencia obsahovala PrP génový promotor, 50bp PrP génového 5' netranslatovaného exónu, zostrihové donor miesto, 1 kb intrón, a zostrihové akceptorové miesto umiestnené ihneď susedne k SalI miestu, do ktorého bola PS1 cDNA inzertovaná. 3' sekvencia susediaca s inzertovanou DNA obsahovala približne 8 kb segment PrP 3' netranslatovaného regiónu obsahujúceho polyadenylačný signál. Trávenie tohoto konštruktu NotI (PS1) alebo FseI (PS2) uvoľnilo fragment obsahujúci mutantný alebo divý typ PS génu pod kontrolou PrP promotora. Uvoľnený fragment bol purifikovaný na gel a injikovaný do pronukleolú fertilizovaného myšacieho vajíčka pomocou použitia metódy opísanej Hsiao et al., (1995).

Konštrukty β -podjednotky receptora pre rastový faktor odvodený od doštičiek.

PS cDNA boli taktiež zavedené medzi SalI (kompletné PS1 cDNA) alebo HindIII (skrátaná PS1 cDNA, kompletná PS2 cDNA a skrátaná PS2 cDNA) v 3' konci ľudského promotora β -podjednotky receptora pre rastový faktor odvodený od doštičiek a EcoRI miesto v 5' konci

SV40 poly A sekvencie a celá kazeta bola klonovaná do pZeoSV vektoru (Invitrogen, San Diego, CA). Fragmenty uvoľnené ScaI/BamHI trávením boli purifikované na géle a injikované do pronukleolu fertilizovaného myšacieho vajíčka pri použití metódy, ktorú opísal Hsiao et al., (1995).

Konštrukty ľudského β -aktínu

PS1 a PS2 cDNA boli inzertované do SalI miest pBACGH. Konštrukt produkovaný touto inzerciou obsahoval 3,4 kb ľudskej β -aktínovej 5' susednej sekvencie (ľudský β aktínový promotor, zostrihaný 78 bp ľudský β aktínový 5' netranslatovaný exón a intrón) a PS1 a PS2 inzert nasledovaný 2,2 kb genómovej sekvencie ľudského rastového hormónu obsahujúceho niekoľko intrónov a exónov, rovnako ako polyadenilačný signál. SfiI bol použitý pre uvoľnenie PS-obsahujúceho fragmentu, ktorý bol purifikovaný na géle a injikovaný do pronukleolu fertilizovaného myšacieho vajíčka pomocou použitia metódy, ktorú opísal Hsiao et al., (1995).

Konštrukty fosfoglycerát kinázy:

PS1 a PS2 cDNA boli inzertované do pkJ90 vektoru. cDNA bola inzertovaná medzi KpnI namiesto downstream od promotoru ľudskej fosfoglycerát kinázy a XbaI miesta upstream od 3' netranslatovaného regiónu ľudského génu pre fosfoglycerát kinázy. PvuII/HindIII (PS1 cDNA) alebo PvuII (PS2 cDNA) trávenie bolo použité pre uvoľnenie PS-obsahujúceho fragmentu, ktorý bol purifikovaný na gel a injikovaný do pronukleolu fertilizovaného myšacieho vajíčka pomocou metódy opísanej vyššie.

Príklad 13

Expresia rekombinantného PS1 a PS2 v eukaryotických bunkách

Rekombinantné PS1 a PS2 boli exprimované v mnohých typoch buniek (napr. PC12, neuroblastomových, ovariálnych čínskeho škrečka, a ľudských embryonálnych ľadvinových 293 bunkách) pomocou použitia pcDNA 3 vektora (Invitrogen, San Diego, CA). PS1 a PS2 cDNA inzertované do tohoto vektora boli rovnako kompletne a

skrátene CDNA ako boli opísané v príklade 8.

Tieto cDNA boli inzertované medzi CMV promotor a polydeniulačné miesto hovedzieho rastového hormónu pcDNA3. Transgény boli exprivované vo vysokých hladinách.

Okrem toho, PS1 a PS2 boli exprivované v COS bunkách pomocou použitia pCM vektora. Pre uľahčenie zapojenia a rozpoznania intracelulárnej lokalizácie presenilínových proteínov boli oligonukleotidy kódujúce sekvenciu s 11 aminokyselinami odvodenými od ľudského c-myc antigénu (viď. napr. Evan et al., 1985) a rozpoznávané monoklonálne anti-myc protilátkou MYC-1-9E10.2 (produkt CRL 1729, ATCC, Rockville, Md.) ligované v rámčeku buď ihneď pred alebo ihneď po otvorení čítacom rámčeku PS1 a PS2 cDNA. Boli taktiež pripravené nezapojené pCMX konštrukty. c-myc spojené konštrukty boli zavedené do pcDNA3 pre transfekciu v CHO bunkách.

Transientné a stabilné transfekcie týchto konštruktov bola dosiahnutá pomocou použitia Lipofectaminu (Gibco/BRL) podľa návodu výrobcu. Kultúry boli testované na transientnej expresii po 48 hodinách. Stabilne transfektované línie boli selektované pomocou použitia 0,5 mg/ml Geneticínu (Gibco/BRL).

Expresia transfektovaných PS proteínov bola testovaná Western blottingom pri použití anti-presenilínových protilátok 1142, 519 a 520 opísaných vyššie. Stručne, kultivované transfektované bunky boli solubilizované (2% SDS, 5 mM EDTA, 1 mg/ml leupeptín a aprotinín) a koncentrácia proteínu bola určená podľa Lowry. Proteíny boli separované na sds_PAGe gradientových geloch (4-20% Novex) a boli transferované na PVDF (10mM CAPS) ppo 2 hodiny pri konštantnom napätí (50 V). Nešpecifická väzba bola blokováná odstredeným mliekom (5%) na 1 hodinu. Proteíny boli potom skúšané dvomi králičími polyklonálnymi protilátkami (1 mg/ml v TSB, pH 7,4) po 12 hodín. Presenilín skrížene reaktívne druhy boli identifikované pri použití biotynylovanej kože anti-králičej sekundárnej protilátky, ktorá bola vizualizovaná pri použití chrenovej peroxidasa-konjugovanej streptavidin terciálnej, 4-chloro-naftolu a peroxidu vodíka. S c-myc spojené presenilínové peptidy boli testované Western blottingom pri použití oboch

anti-presenilínových protilátok opísaných vyššie (na detekciu presenilínového peptidového antigénu), a supernanantu kultúry z hybridomu MYC 1-9E10.2 riedeného 1:10 pre Western bloty a 1:3 pre imunocytochémiu (na detekciu myc-epitopu). Bol identifikovaný hlavný prúžok imunoreaktivity s 50 - 60 kDa každou rôznou presenilínových protilátok a protilátkami pre myc-obsahujúcimi plasmidmi).

Niektorými presenilínovými protilátkami boli identifikované menšie prúžky s asi 10 - 19 kDa a asi 70 kDa.

Pre imunocytochémiu boli transfektované bunky fixované 4% formaldehydom v Tris pufrovanom salinickom roztoku (TBS), boli extenzívne premyté TBS plus 0,1% triton a nešpecificky blokované 3% BSA. Fixované bunky boli skúšané presenilínovými protilátkami (napr. protilátkami 520 a 1142, vyššie; typicky 5 - 10 mg/ml), premyté a vizualizované FITC- alebo rhodamin- konjugovanou ozou alebo králičou sekundárnou protilátkou. Pre c-myc pripojené presenilínové konštrukty bol použitý hybridomný MYC 1 - 9E10.2 supernatant riedený 1:3 spolu s anti-myšacou sekundárnou protilátkou. Slidy boli umiestnené v 90% glycerole s 0,1% fenylendiamínom (ICN) pre zachovanie fluorescencie. Anti-BIP (alebo anti-calnexin) StressGen, Victoria, B.C.) a aglutinín pšeničných klíčkov (EY Labs, San Mateo, Ca) boli použité ako markery endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, v príslušnom poradí. Dvojité imunoznačenie bolo tiež uskutočnené anti-actinom (Sigma, St. Louis, Mo.), anti-amyloid prekurzorový proteín (22C11, Boehringer Mannheim) a anti-neurofilamenta (NF-M špecifické, Sigma) v neuronálnej línii NSC34. Tieto imunofluorescenčné štúdie demonštrovali, že produkt transfekcie je rozsiahlo distribuovaný v bunke, s určitým zvýraznením perinukleárnej lokalizácie naznačujúcim endoplazmatické retiulum a Golgiho aparát, ktoré je podobné ako u netransfektovaných buniek, ale výraznejšie, niekedy presahujúce cez adernú membránu. Ko-imunolokalizácia c-myc a S epitopov bola pozorovaná u CHO a COS buniek transientne transfektovaných myc-pripojenými presenilínovými konštrukťami. Robustná expresia transfektovaného presenilínového génu v transfektovaných bunkách bola tak preukázaná imunocytochémiou, Northern blotom, Western bloty (pri použití protilátok k presenilínom ako boli opísané vyššie a pri použití monoklonálnej protilátky MYC 1-9E10.2 pre myc propojenie v konštruktoch s 3'

alebo 5' c-myc prípojkách).

Príklad 14

Izolácia presenilínových väzobných proteínov afinitnou chromatografiou

Na identifikáciu proteínov, ktoré môžu byť zahrnuté v biochemickej funkcii presenilínov boli PS1 väzobné proteíny izolované pri použití afinitnej chromatografie. GST fúzny proteín obsahujúci PS1 TM6->7 slučku, pripravený ako je opísané v príklade 8, bol použitý na skúšanie ľudských mozgových extraktov, pripravených homogenizáciou ľudského mozgového tkaniva na Polytrone vo fyziologickom roztoku. Nešpecifická väzba bola eliminovaná predčistením mozgových homogenátov endogénnych GST väzobných zložiek inkubáciou s glutatión-Sepharosovými gorálkami. Homogenáty bez GST boli potom inkubované s GST fúznymi proteínami pri produkcii požadovaných komplexov s funkčnými väzobnými proteínami. Tieto komplexy boli potom odobrané pomocou použitia afinitných glutatión-Sepharosových gorálok. Po extenzívnom premytí fosfátom pufrovaným salinickým roztokom bol izolovaný súbor proteínov separovaný SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE; Tris-tricin gradientový gel 4 - 20%). Boli pozorované dva hlavné prúžky v 14 a 20 kD spolu s niekoľkými slabšími prúžkami od 50 do 60 kD.

Farmakologická modifikácia interakcií medzi týmito proteínami a TM6->7 slučkou môže byť využitá v liečbe Alzheimerovej choroby. Okrem toho, tieto proteíny, ktoré pravdepodobne účinkujú v presenilínovej biochemickej dráhe, môžu byť novými miestami mutácií spôsobujúcich Alzheimerovu chorobu.

Príklad 15

Izolácia presenilínových väzobných proteínov dvojhybridovým kvasinkovým systémom

Pre identifikáciu proteínov interagujúcich s presenilínovými proteínami bol generovaný kvasinkový expresný plasmidový vektor (pAS-1, Clontech) ligáciou v rámčeku čiastočnej cDNA sekvencie

kódujúci buď zvyšky 266 - 409 PS1 proteínu alebo zvyšky 272 - 390 PS2 proteínu do EcoRI a BamHI miest vektoru. Vzniknutý fúzny proteín obsahoval GAL4 DNA väzobnú doménu naviazanú v rámci buď na TM6->7 slučku PS1 proteínu alebo na TM6->7 slučku PS2 proteínu. Tieto expresné plasmidy boli kotransformované, spolu s purifikovanou plasmidovou DNA z ľudskej mozgovej cDNA:pACT knižnice, do kvasiniek pri použití protokolu Clontech Matchmaker kvasinkového dvojhybridového kitu (Clontech). Kvasinkové klony nesúce ľudskú mozgovú cDNA interagujúcu s TM6->7 slučkovou doménou boli selektované HIS rezistenciou a β gal+ aktiváciou. Klony boli ďalej selektované senzitivitou na cyklohexamín a inzerty ľudských mozgových cDNA boli izolované PCR a sekventované. Zo 6 miliónov počiatočných transformantov bolo získaných 200 pozitívnych klonov po HIS selekcii a 42 po β gal+ farebnej selekcii, uskutočnených podľa návodu výrobcu pre selekciu pozitívnych kolónií. Z týchto 42 klonov bolo niekoľko (5 - 8) nezávislých klonov reprezentujúcich rovnaké gény. Toto ukazuje, že tieto interakcie sú biologicky reálne a reprodukovateľné.

Príklad 16

Transgénny *C. elegans*

Transgénny *C. elegans* boli získané mikroinjikovaním oocytov. Vektory pPD49.3 hsp 16 - 41 a pPD49.78 hsp 16 - 2 boli vybrané pre tento účel. Pri použití prvého z týchto vektorov boli produkované transgénne *C. elegans*, v ktorých bol zavedený normálny hPS1 gén alebo mutantný gén (L392V). Transformované zvieratá boli detekované testovaním expresie ľudskej cDNA na northern blotoch alebo na western blotoch pomocou ľudskej cDNA skúšky cc32 a protilátok 519, 520 a 1142, ako je opísané vyššie. Boli tiež pripravené a/alebo injikované vektory nesúce cis dvojité mutanty hPS1 génu (M146L a L392V), normálny hPS2 gén a mutantný (N141I) hPS2 gén.

Príklad 17

Klonovanie *Drosophilího* homológu pre presenilín, DmPS

Redundantné oligonukleotidy 5'ctn ccn gar tgg acn gyc tgg

(SEQ ID NO: 22) a 5' rca ngc (atg)at ngt ngt rtt cca (SEQ ID NO: 23) boli projektované z publikovaných dát nukleotidovej sekvencie pre vysoko konzervované regióny presenilín/sel-12 proteínov končiacich/začínajúcich Trp (napr. zvyšky Trp247 a Trp404 v PS1; Trp253 a Trp385 v PS2). Tieto priméry boli použité pre RT-PCR (50 ml objem, 2 mM MgCl₂, 30 cyklov 94 °C x 30'', 57 °C x 20'', 72 °C x 20'') z mRNA od dospelých a embryonálnych *D. melanogaster*. Produkty boli potom reamplifikované pri použití cyklu 94 °C x 1', 59 °C x 0,5' a 72 °C x 1' a vnútorného konzervovaného redundantného priméru 5' ttt ttt ctc gag acn gcn gar gar aga aay ga (SEQ ID NO: 24) a 5' ttt ttt gga tcc tar aa(agt) atr aar tcn cc (SEQ ID NO: 25). 600 bp produkt bol klonovaný do BamHI a XhoI miest pBS. Tieto produkty boli sekventované a ukázalo sa, že obsahujú otvorený čítací rámček s putatívnu aminokyselinovou sekvenciou vysoko homológnu k sekvencii presenilínov. Tieto fragmenty boli potom použité pre vyšetrenie konvenčnej *D. melanogaster* cDNA/Zap knižnice (Stratagene, CA) na získanie šiestich nezávislých cDNA klonov veľkosti 2 - 2,5 kb (klony pds8, pds13, pds3, pds7 a pds14), ktoré boli sekventované. Najdlhší ORF kodoval polypeptid s 541 aminokyselinami s 52% identitou k ľudským presenilínom.

Príklad 18

Testy pre dlhé izoformy Aβ peptidov

Aβ peptidy boli extrahované 99% kyselinou mravenčou počas 60 minút (20 °C) zo zmrazenej mozgovej kôry histopatologicky potvrdených prípadov FAD s PS1 alebo BAPP₇₁₇ mutáciami; sporadických prípadov AD bez pozitívnej rodinnej anamnézy choroby; iných neurodegeneratívnych ochorení s nástupom v dospelosti (HD = Huntingtonova chorea; ALS = Amyotrofická laterálna skleróza); Downovho syndrómu; a kontrolných subjektov bez neurologických symptómov. Po centrifugácii pri 200000 x g počas 20 minút bol supernatant separovaný z pelet, riedený, neutralizovaný a vyšetrovaný ELISA. Pre kvantifikáciu rôznych druhov Aβ boli použité štyri monoklonálne protilátky. Protilátka BNT-77 (ktorá detekuje epitopy z centra Aβ) a protilátka BAN-50 (ktorá detekuje N-terminálne zvyšky) boli použité pre prvotnú väzbu všetkých typov Aβ vrátane heterológnych foriem s alebo bez N-terminálneho

skrátene (BNT-77) alebo len bez N-terminálneho skrátene (BAN-50). Dve ďalšie monoklonálne protilátky, ktoré špecificky detekujú krátke A β končiace vo zvyšku 40 (protilátka BA-27) alebo dlhé A β končiace vo zvyšku 42/43 (protilátka BC-05) boli potom použité na odlíšenie rôznych C-terminálnych foriem A β . Dvojmiestna ELISA bola realizovaná ako už bolo opísané (Tamaoka et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Stručne, 100 g štandardných peptidov alebo supernatantov z mozgového tkaniva bolo aplikovaných na mikroplatňu potiahnutú BNT-77 protilátkou, inkubovaných pri 4 °C počas 2 hodín, premytých fosfátom pufrovaným salinickým roztokom a potom inkubovaných s HRP-značenou BA-27 a BC-05 protilátkou pri 4 °C počas 24 hodín. HRP aktivity boli testované vývojom farby pri použití TNB mikrojamkového peroxidasového systému ako bolo opísané skôr. Kortikálne A β hladiny boli pozorované medzi diagnostikovanými skupinami pri použití párových Student-t testov. Spoločné hodnotenie dát všetkých A β izoforiem, pri použití Student-Newman-Keuls priemerov testov ukázalo, že A β 1-42 hladiny od BAPP₇₁₇ a sporadických AD subjektov boli odlišné od prípadov PS1 mutácie, ale že boli podobné ako pri kontrolách. Oproti tomu, tri skupiny boli odlišiteľné, keď boli porovnávané A β x-42 hladiny: vysoká (PS1 a BAPP₇₁₇ AD), stredná (sporadická AD) a nízka (kontrola).

Presnejšie, meranie koncentrácie rôznych A β izoforiem v mozgovej kôre 14 kontrolných subjektov, vrátane piatich subjektov s inými neurodegeneratívnymi chorobami s nástupom vo štvrtej a piatej dekáde života ukázalo len nízke koncentrácie ako krátkych A β (A β 1-40: 0,06 0,02 nMol/g čerstvého tkaniva SEM; A β x-40: 0,17 0,40) a dlhých A β (A β 1-42/43: 0,35 0,17; A β x-42/43: 1,17 0,80). Oproti tomu, A β peptidy s dlhým koncom boli signifikantne elevované v mozgovej kôre všetkých štyroch subjektov s PS1 mutáciou (A β 1-42/43: 6,54 2,00, $p = 0,05$; A β x-42/43: 23,91 4,00, $p > 0,01$). Podobné zvýšenia v koncentráciách A β peptidov bola detekovaná v kôre obidvoch subjektov s BAPP₇₁₇ mutáciami (A β 1-42/43: 2,03 1,04; A β x-42/43: 25,15 5,74) a subjektov so sporadickou AD (A β 1-42/43: 1,21 0,40, $p = 0,008$; A β x-42/43: 14,45 2,81, $p = 0,001$). U subjektov s PS1 alebo BAPP₇₁₇ mutáciami bolo toto zvýšenie dlhých izoforiem A β spojených s malým, ale ne-signifikantným zvýšením krátkych A β izoforiem (napr. A β x-40: 3,08 1,31 u PS1 mutantov; 1,56 0,07 u BAPP₇₁₇

mutantov). Tak bol pomer dlhých a krátkych izoforiem tiež signifikantne zvýšený. Avšak, u sporadických AD bolo pozorované zvýšenie dlhých A β typicky spojené s omnoho vyšším zvýšením krátkych A β izoforiem (A β 1-40: 3,92 1,42; A β x-40: 16,60 5,88). Toto zvýšenie krátkych A β bolo štatisticky signifikantné v porovnaní s kontrolami ($p > 0,03$ pre obidva A β 1-40 a A β x-40), ale bolo hranične štatisticky signifikantné v porovnaní s PS1 a BAPP₇₁₇ prípadmi ($p_0,05$). Analýza kôrových vzoriek od dospelých jedincov s Downovým syndrómom odhalila vzorky podobné tým, ktoré boli pozorované pre sporadickú AD.

Aj keď preferované uskutočnenia tu boli opísané podrobne, bude odborníkom jasné, že môžu byť uskutočnené variácie k týmto vyhotoveniam bez prekročenia rozsahu myšlienky vynálezu a bez narušenia rozsahu pripojených nárokov.

Tabuľka 1

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

Tabuľka 2

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

Tabuľka 3

PS2 doména	približná pozícia
N-terminus	1-87
TM1	88-106
TM1→2	107-134
TM2	135-160
TM2→3	161-169
TM3	170-189
TM3→4	190-200
TM4	201-218
TM4→5	219-224
TM5	225-244
TM5→6	245-249
TM6	250-268
TM6→7	269-387
TM7	388-409
C-terminus	410-448

Tabuľka 4

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

Tabuľka 5

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

5

Tabuľka 6

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

Tabuľka 7

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

Odkazy:

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

- Iwatsubo et al. (1995) Ann. Neurol. 37:294-299.
- Jacobson et al. (1993) Nature 361:365.
- Kahn (1995) Science 270:369-370.
- Karlinsky et al. (1992) Neurology 42:1445-1453.
- Katzman (1986) N. Eng. J. Med. 314:964-973.
- Kollmar and Farnham (1993) Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 203:127-137.
- Krause and Aaronson (1991) Methods in Enzymology, 200:546-556.
- Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105
- Lamb et al. (1993) Nature Genetics 5:22-29
- Lassmann et al. (1995) Acta Neuropathol. 89:35.
- Levesque et al. (1996) in press.
- Levitan and Greenwald (1995) Nature 377:351-354.
- Liu and Sommer (1995) Biotechniques 18:470-477.
- Martin et al. (1995) NeuroReport (in press).
- Mullan et al. (1992) Nature Genetics 1:345-347.
- Murrell et al. (1991) Science 254:97-99.
- Nee et al. (1983) Arc. Neurol. 40:203-208.
- NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992) Science 258:67-86.
- Nowak (1995) Science 270:368-371.
- Obermeir et al. (1994) Embo J. 7:1585-1590.
- Pericak-Vance et al. (1988) Exp. Neurol. 102:271-279.
- Phizicky and Fields (1994) Microbiol. Reviews 59:94-123.
- Pike et al. (1993) J. Neurosci. 13:1676-1678.
- Podlisny et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:9564-9570.
- Pollen (1993) Hannah's Heirs: The Quest for the Genetic Origins of Alzheimer's Disease, Oxford University Press, Oxford.
- Querfurth et al. (1995) Molec. Brain Res. 28:319-337.
- Riley et al. (1990) Nucl. Acid Res. 18:2887-2890.
- Rogaev et al. (1993) Neurology 43:2275-2279.
- Rogaev et al. (1995) Nature 376:775-778.
- Rommens et al. (1993) Hum. Molec. Genet. 2:901-907.
- Saleeba and Cotton (1993) Methods in Enzymology 217:286-295.
- Saunders et al. (1993) Neurology 43:1467-1472/
- Schellenberg et al. (1993) Am. J. Hum. Genet. 53:619-628.
- Schellenberg et al. (1992) Science 258:668-670.
- Scheuner et al. (1995) Soc. Neurosci. Abstr. 21:1500.
- Schindler and Darnell (1995) Annu. Rev. Biochem. 64:621-651.
- Scott et al. (1992)

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

Zoznam sekvencií

(1) Obecné informácie:

(i) Prihlasovateľ:

(A) Meno: HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED
PARTNERSHIP

(B) Ulica: 555 University Avenue

(C) Mesto: Toronto

(D) Štát: Ontario

(E) Krajina: Canada

(F) Poštový kód (ZIP): M5G 1X8

(G) Telefón: (416) 813-5982

(H) Telefax: (416) 813-5085

(A) Meno: THE GOVERNG COUNCIL OF THE UNIVERSITY
OF TORONTO

(B) Ulica: 106, Simcou Hall, 27 King's College Circle

(C) Mesto: Toronto

(D) Štát: Ontario

(E) Krajina: Canada

(F) Poštový kód (ZIP): M5S 1A1

(G) Telefón: (416) 978-7461

(H) Telefax: (416) 978-1878

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

(B) Ulica: 210 Richview Avenue

(C) Mesto: Toronto

(D) Štát: Ontario

(E) Krajina: Canada

(F) Poštový kód (ZIP): M5P 3G3

(A) Meno: FRASER, Paul E.
(B) Ulica: 611 Windermere Avenue
(C) Mesto: Toronto
(D) Štát: Ontario
(E) Krajina: Canada
(F) Poštový kód (ZIP): M6S 3L9

(A) Meno: ROMMENS, Johanna M.
(B) Ulica: 105 McCaul Streetenue
(C) Mesto: Toronto
(D) Štát: Ontario
(E) Krajina: Canada
(F) Poštový kód (ZIP): M5T 2XT

(ii) Názov vynálezu: Genetické sekvencie a proteíny týkajúce
sa Alzheimerovej choroby a ich použitie

(iii) Počet sekvencií: 25

(iv) Adresa pre korešpondenciu:

(A) Meno: Sim & McBurney
(B) Ulica: 330 University Avenue, 6th floor
(C) Mesto: Toronto
(D) Štát: Ontario
(E) Krajina: Canada
(F) Poštový kód (ZIP): M5G 1R7

(v) Počítačová čítacia forma:

(A) Typ média: Floppy disk
(B) Počítač: IBM PC kompatibilný
(C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release #1.0, verzia #1.30

(vi) Údaje o súčasnej prihláške:

(A) Číslo prihlášky: PC/CA96/00263

(B) Dátum podania: 29.5.1996

(C) Klasifikácia:

(vii) Predchádzajúce dáta prihlášky:

(A) Číslo prihlášky: US 08/509359

(B) Dátum podania: 31.7.1995

(vii) Predchádzajúce dáta prihlášky:

(A) Číslo prihlášky: US 08/496841

(B) Dátum podania: 28.7.1995

(vii) Predchádzajúce dáta prihlášky:

(A) Číslo prihlášky: US 08/431048

(B) Dátum podania: 28.5.1995

(viii) Zástupca/agent informácie:

(A) Meno: RAE, Patricia A.

(B) Referencie/číslo registra: 7425-16

(ix) Telekomunikačné informácie:

(A) Telefón: (416) 595-1155

(B) Telefax: (416) 595-1163

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 2765 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 249...1649

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: misc_feature

(B) Umiestnenie: 1...2675

(D) Iné informácie: /note = "hPS1-1"

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

TGGGACAGGC AGCTCCGGGG TCCGCGGTTT CACATCGGAA ACAAAACAGC GGCTGGTCTG	60
GAAGGAACCT GAGCTACGAG CCGCGGCGGC AGCGGGGCGG CGGGGAAGCG TATACCTAAT	120
CTGGGAGCCT GCAAGTGACA ACAGCCTTTG CGGTCCTTAG ACAGCTTGGC CTGGAGGAGA	180
ACACATGAAA GAAAGAACCT CAAGAGGCTT TGTTTCTGT GAAACAGTAT TTCTATACAG	240
TTGCTCCA ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA	290
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala	
1 5 10	
CAG ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT	338
Gln Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn	
15 20 25 30	
GAC AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC	386
Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His	
35 40 45	
CCT GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG	434
Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val	
50 55 60	
GTG GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC	482
Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly	
65 70 75	
GCC AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG	530
Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val	
80 85 90	

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 467 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

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

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 3086 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: CDS
- (B) Umiestnenie: 557...1945

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...3086
- (D) Iné informácie: /note = "hPS1-2"

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

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

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 463 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

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

```

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

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 2494 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...2494
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex1n2"

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

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

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1117 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1117
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex3n4"

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1727 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1727
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex5"

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

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1883 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1883
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex6"

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

```

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

```

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 823 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...823
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex7"

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

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

CATTTAAAGC CATGTACTTT GNTGATGAAT TACTCTGAAG TTTTAATTGT NTCCACATAT	500
AGGTCATACT TGGTATATAA AAGACTAGNC AGTATTACTA ATTGAGACAT TCTTCTGTNG	660
CTCCTNGCTT ATAATAAGTA GAACGTGAAAG NAACTTAAGA CTACAGTTAA TTCTAAGCCT	720
TTGGGGAAGG ATTATATAGC CTTCTAGTAG GAAGTCTTGT GCNATCAGAA TGTTTNTAAA	780
GAAAGGGTNT CAAGGAATNG TATAAANACC AAAATAATT GAT	823

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 945 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...945
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex8"

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 540 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

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

CTGCAGCTTT CCTTTAAACT AGGAAGACTT GTTCTTATAC CCCAGTAACG ATACACTGTA	60
CACTAAGCAA ATAGCAGTCA AACCCAAATG AAATTTNTAC AGATGTTCTG TGTCATTTTA	120
TNTTGTTTAT GTTGTCTCCC CCACCCCCAC CAGTTCACCT GCCATTTATT TCATATTCAT	180
TCAACGTCTN NNTGTGTAAA AAGAGACAAA AACATTAAA CTTTTTCTT TCGTTAATTC	240
CTCCCTACCA CCCATTTACA AGTTTAGCCC ATACATTTTA TTAGATGTCT TTTATGTTTT	300
TCTTTTNCTA GATTAGTGG CTGTTTGTG TCCGAAAGGT CCACTTCGTA TGCTGGTTGA	360
AACAGCTCAG GAGAGAAATG AAACGCTTTT TCCAGCTCTC ATTTACTCCT GTAAGTATTT	420
GGAGAATGAT ATTGAATTAG TAATCAGNGT AGAATTTATC GGGAACTTGA AGANATGTNA	480
CTATGGCAAT TTCANGGNAC TTGTCTCATC TTAAATGANA GNATCCCTGG ACTCCTGNAG	540

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 509 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...509
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex10"

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

```

CCCCGTCNAT GCATACTTTG TGTGTCCAGT GCTTACCTGG AATCCNGTCT TTCCAACAG      60
CAACAATGGT GTGGTTGGTG AATATGGCAG AAGGAGACCC GGAAGCTCAA AGGAGAGTAT      120
CCAAAAATTC CAAGTATAAT GCAGAAAGTA GGTAACYYYY NTTAGATAMN ATCTTGATTT      180
TNCAGGGTCA CTGTTATAAG CTAACAGTAT AGNAATGTTT TTATCGTCTT TCTNKGGNCA      240
TAGACTCCTN KGAGAATCTC TTGAGAACTA TGATAATGCC CAGTAAATAC NCAGATAAGT      300
ATTTAAGGAG TNCAGATACT CAAANCCCAA CAATACNGTC AAAGCATCCT AGGTTAAGAC      360
AMCNCCCATT AAATACAGAA TACCAGCATG GAAAGGTTC AAGCTGAGGT ATGATTGGGT      420
TTGGGTTTTG GGNNGTTTTT TTATAAGTCA TGATTTTAAA AAGAAAAAAT AAACCTCTCTC      480
CAAACATGTA AAAGTAAGAA TCTCCTAAA                                         509

```

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1092 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1092
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex11"

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

GTCTAGATAA GNCAACATTC AGGGGTAGAA GGGGACTGTT TATTTTTTCC TTTAGTCTCT

60

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1003 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1003

(D) Iné informácie: /note = "1Ex12"

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 736 párov báz

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...736
- (D) Iné informácie: /note = "1Ex13"

(xi) Popis sekvencie: ~~SEQ~~ ID NO: 15:

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1964 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: CDS
- (B) Umiestnenie: 188...1588

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...1964
- (D) Iné informácie: /note = "mPS1"

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

```

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

```

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 467 aminokyselín
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

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

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

```

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

```

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 2226 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: CDS
- (B) Umiestnenie: 366...1712

(ix) Vlastnosti:

- (A) Meno/kľúč: misc_feature
- (B) Umiestnenie: 1...2226
- (D) Iné informácie: /note = "hPS2"

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

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

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 449 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

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

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

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

Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys Gly Pro
 210 215 220
 Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala
 225 230 235 240
 Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val Ile Leu
 245 250 255
 Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly
 260 265 270
 Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Pro Ile
 275 280 285
 Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ala Met Val Trp Thr Val Gly Met
 290 295 300
 Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro Tyr Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Met Glu Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro Ser Tyr
 325 330 335
 Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Glu Leu
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile
 355 360 365
 Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp
 370 375 380
 Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu
 405 410 415
 Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr Asp Asn
 420 425 430
 Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu Tyr Ile
 435 440 445

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1895 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 140...1762

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: misc_feature

(B) Umiestnenie: 1...1895

(D) Iné informácie: /note = "DmPS"

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

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

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

GGC GAC TGG ACG ACC ACA ATC GCT TGC TTT GTG GCC ATC CTC ATT GGA Gly Asp Trp Thr Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly 480 485 490	1612
CTC TGC CTC ACT CTT CTG CTT CTG GCC ATT TGG CGC AAG GCG CTA CCC Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Trp Arg Lys Ala Leu Pro 495 500 505	1660
GCC CTG CCC ATC TCA ATA ACG TTC GGA TTG ATA TTT TGC TTC GCC ACT Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Cys Phe Ala Thr 510 515 520	1708
AGT GCG GTG GTC AAG CCG TTC ATG GAG GAT CTA TCG GCC AAG CAG GTG Ser Ala Val Val Lys Pro Phe Met Glu Asp Leu Ser Ala Lys Gln Val 525 530 535	1756
TTT ATA TAACTTGAA AAGACAAGGA CACATCAAGT GTCTTACAGT ATCATAGTCT Phe Ile 540	1812
AACAAAGCTT TTTGTAATCC AATTCTTTAT TTAACCAAAT GCATAGTAAC AACCTCGACT AAAAA AAAAA AAA	1872 1895

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 541 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

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

Met	Ala	Ala	Val	Asn	Leu	Gln	Ala	Ser	Cys	Ser	Ser	Gly	Leu	Ala	Ser	1	5	10	15
Glu	Asp	Asp	Ala	Asn	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Gly	Ala	Ala	Glu	Arg	Leu	20	25	30	
Glu	Arg	Pro	Pro	Arg	Arg	Gln	Gln	Gln	Arg	Asn	Asn	Tyr	Gly	Ser	Ser	35	40	45	
Asn	Gln	Asp	Gln	Pro	Asp	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Pro	Asn	Val	Val	50	55	60	
Met	Arg	Glu	Pro	Cys	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	65	70	75	80

Gly Gly Ser Gly Gly Pro Pro Thr Asn Glu Met Glu Glu Glu Gln Gly
85 90 95

Leu Lys Tyr Gly Ala Gln His Val Ile Lys Leu Phe Val Pro Val Ser
100 105 110

Leu Cys Met Leu Val Val Val Ala Thr Ile Asn Ser Ile Ser Phe Tyr
115 120 125

Asn Ser Thr Asp Val Tyr Leu Leu Tyr Thr Pro Phe His Glu Gln Ser
130 135 140

Pro Glu Pro Ser Val Lys Phe Trp Ser Ala Leu Ala Asn Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Met Ser Val Val Val Val Met Thr Phe Leu Leu Ile Val Leu Tyr
165 170 175

Lys Lys Arg Cys Tyr Arg Ile Ile His Gly Trp Leu Ile Leu Ser Ser
180 185 190

Phe Met Leu Leu Phe Ile Phe Thr Tyr Leu Tyr Leu Glu Glu Leu Leu
195 200 205

Arg Ala Tyr Asn Ile Pro Met Asp Tyr Pro Thr Ala Leu Leu Ile Met
210 215 220

Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met Met Ser Ile His Trp Gln Gly Pro
225 230 235 240

Leu Arg Leu Gln Gln Gly Tyr Leu Ile Phe Val Ala Ala Leu Met Ala
245 250 255

Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Ala Val Leu
260 265 270

Ala Ala Ile Ser Ile Trp Asp Leu Ile Ala Val Leu Ser Pro Arg Gly
275 280 285

Pro Leu Arg Ile Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Gln Ile
290 295 300

Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Val Val Tyr Ala Leu Val Asn
305 310 315 320

Thr Val Thr Pro Gln Gln Ser Gln Ala Thr Ala Ser Ser Ser Pro Ser
325 330 335

Ser Ser Asn Ser Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Gln Asn Ser Leu Ala
340 345 350

Ser Pro Glu Ala Ala Ala Ala Ser Gly Gln Arg Thr Gly Asn Ser His
355 360 365

Pro Arg Gln Asn Gln Arg Asp Asp Gly Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly
370 375 380

Met Pro Leu Val Thr Phe Lys Ser Asn Leu Arg Gly Asn Ala Glu Ala
385 390 395 400

Ala Gly Phe Thr Gln Glu Trp Ser Ala Asn Leu Ser Glu Arg Val Ala
405 410 415

Arg Arg Gln Ile Glu Val Gln Ser Thr Gln Ser Gly Asn Ala Gln Arg
420 425 430

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

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 21 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

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

CTNCCNGART GGACNGYCTG G

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

RCANGCDANT GTNGTRTTCC A

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 32 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

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

TTTTTTCTCG AGACNCNCA RGARAGAAAY GA

(2) Informácie pre SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 29 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

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

TTTTTTGGAT CCTARAADAT RAARTCNCC

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu kódujúca proteín vybraný zo skupiny pozostávajúcej z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

2. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje normálny presenilin-1 proteín a kde je uvedená nukleotidová sekvencia vybraná zo skupiny pozostávajúcej z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 2;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 4;

(3) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre myšský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 17;

(4) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 2, kde je zvyšok 257 nahradený alanínom a zvyšky 258 - 290 sú vynechané;

(5) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 4, kde je zvyšok 253 nahradený alanínom a zvyšky 254 - 286 sú vynechané; a

(6) sekvencia kódujúca normálny presenilin-1 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencii (1) - (5) za podmienok prísnej hybridizácie.

3. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje mutantný presenilin-1 proteín, kde uvedená sekvencia nukleotidov kóduje aspoň jednu mutáciu korešpondujúcu mutáciu SEQ ID NO: 2 vybranej zo skupiny sklada-

júcej sa z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163L, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280A, E280G, A285V, L286V, _291-319, G384A, L392V a C410Y; a kde uvedená nukleotidová sekvencia inak korešponduje nukleotidovej sekvencií vybranej zo skupiny pozostávajúcej z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 2;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 4;

(3) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre myš' presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 17;

(4) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 2, kde je zvyšok 257 nahradený alanínom a zvyšky 258 - 290 sú vynechané;

(5) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 4, kde je zvyšok 253 nahradený alanínom a zvyšky 254 - 286 sú vynechané; a

(6) sekvencia kódujúca normálny presenilin-1 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencií (1) - (5) za podmienok prísnej hybridizácie.

4. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje mutantný presenilin-1 proteín, kde uvedená sekvencia nukleotidov kóduje aspoň jednu mutáciu korešpondujúcu mutáciu SEQ ID NO: 19 vybranej zo skupiny skladajúcej sa z M239V, N141I a I240T; a kde uvedená nukleotidová sekvencia inak korešponduje nukleotidovej sekvencií vybranej zo skupiny pozostávajúcej z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 2;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 4;

(3) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre myšiu presenilin-1 podľa SEQ ID NO: 17;

(4) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 2, kde je zvyšok 257 nahradený alanínom a zvyšky 258 - 290 sú vynechané;

(5) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 4, kde je zvyšok 253 nahradený alanínom a zvyšky 254 - 286 sú vynechané; a

(6) sekvencia kódujúca normálny presenilin-1 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencii (1) - (5) za podmienok prísnej hybridizácie.

5. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje normálny presenilin-2 proteín a kde je uvedená nukleotidová sekvencia vybraná zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19, kde sú zvyšky 263 - 296 vynechané;

(3) sekvencia kódujúca normálny presenilin-2 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencii (1) - (2) za podmienok prísnej hybridizácie.

6. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje mutantný presenilin-2 proteín, kde uvedená sekvencia nukleotidov kóduje aspoň jednu mutáciu korešpondujúcu mutáciu SEQ ID NO: 19 vybranej zo skupiny skladajúcej sa z M239V, N141I a I420T; a kde uvedené nukleotidové sekvencie inak korešpondujú nukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19, kde sú zvyšky 263 - 296 vynechané;

(3) sekvencia kódujúca normálny presenilin-2 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencii (1) - (2) za podmienok prísnej hybridizácie.

7. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 1, kde uvedená nukleová kyselina kóduje mutantný presenilin-2 proteín, kde uvedená sekvencia nukleotidov kóduje aspoň jednu mutáciu korešpondujúcu mutáciu SEQ ID NO: 2 vybranej zo skupiny skladajúcej sa z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163R, H163Y, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280G, A285V, L286V, _291-319, G384A, L392V a C410Y; a kde uvedená nukleotidová sekvencia inak korešponduje nukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19;

(2) sekvencia kódujúca proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pre ľudský presenilin-2 podľa SEQ ID NO: 19, kde sú zvyšky 263 - 296 vynechané;

(3) sekvencia kódujúca normálny presenilin-2 proteín a schopná hybridizácie na sekvenciu komplementárnu k akejkoľvek sekvencii (1) - (2) za podmienok prísnej hybridizácie.

8. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu s aspoň 10 susediacimi nukleotidami vybranou zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencií komplementárnych k akejkoľvek z týchto sekvencií.

9. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu s aspoň 15 susediacimi nukleotidami vybranou zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencií komplementárnych k akejkoľvek z týchto sekvencií.

10. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu s aspoň 20 susediacimi nukleotidami vybranou zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 a sekvencií komplementárnych k akejkoľvek z týchto sekvencií.

11. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu s aspoň 10 susediacimi nukleotidami z presenilinového inzertu v plasmide vybranom zo skupiny skladajúcej sa z ATCC príroastkové č. 97214 a ATCC príroastkové č. 97428.

12. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu kódujúcu aspoň jednu funkčnú doménu presenilínového proteínu vybraného zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

13. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 12, kde uvedená funkčná doména je presenilín-1 funkčná doména korešpondujúca doméne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z presenilin-1 N-koncovej, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncovej domény.

14. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 12, kde uvedená funkčná doména je presenilín-2 funkčná doména korešpondujúca doméne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z presenilin-2 N-koncovej, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncovej domény.

15. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu kódujúcu antigénny determinantu presenilínového proteínu vybraného zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

16. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 15, kde uvedená sekvencia kóduje presenilin-1 antigénny determinantu korešpondujúci presenilin-1 antigénny determinantne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z aminokyselinových zvyškov 27 - 44, 28 - 61, 46 - 48, 50 - 60, 65 - 71, 66 - 67, 107 - 111, 109 - 112, 120 - 121, 120 - 122, 125 - 126, 155 - 160, 185 - 189, 214 - 223, 218 - 221, 220 - 230, 240 - 245, 241 - 243, 267 - 269, 273 - 282, 300 - 370, 302 - 310, 311 - 325, 332 - 342, 346 - 359, 372 - 382, 400 - 410 a 400 - 420 SEQ ID NO: 2.

17. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 15, kde uvedená sekvencia kóduje presenilin-1 antigénny determinantu korešpondujúci presenilin-1 antigénny determinantne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z aminokyselinových zvyškov 25 - 45, 50 - 63, 70 - 75, 114 - 120, 127 - 132, 162 - 167, 221 - 226, 282 - 290, 310 - 314, 321 - 338, 345 - 352, 380 - 390 a 430 - 435 SEQ ID NO: 19.

18. Spôsob na identifikáciu alelických variantov alebo heterošpecifických homológov ľudského presenilínového génu v y z n a č u j c i s a t ý m, že obsahuje

vybratie nukleokyselinovej próby alebo priméru schopného hybridizácie na sekvenciu ľudského génu pre presenilin za prísnych hybridizačných podmienok;

zmiešanie uvedenej próby alebo priméru so vzorkou nukleovej kyseliny, ktorý môže obsahovať nukleovú kyselinu korešpondujúcu uvedenému variantu alebo homológu;

detekciu hybridizácie uvedenej próby alebo priméru na nukleovú kyselinu korešpondujúcu uvedenému variantu alebo homológu;

19. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku nukleovej kyseliny vybranej zo skupiny skladajúcej sa z ľudskej genómovej DNA, ľudskej mRNA a ľudskej cDNA.

20. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku nukleovej kyseliny vybranej zo skupiny skladajúcej sa z cicavčej genómovej DNA, cicavčej mRNA a cicavčej cDNA.

21. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku nukleovej kyseliny vybranej zo skupiny skladajúcej sa z DNA, mRNA a cDNA od bezstavovcov.

22. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že ďalej obsahuje krok izolácie uvedenej nukleovej kyseliny korešpondujúci s uvedeným variantom alebo homológom.

23. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená nukleová kyselina je identifikovaná hybridizáciou.

24. Spôsob podľa nároku 18 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená nukleová kyselina je identifikovaná PCR amplifikáciou.

25. Spôsob na identifikáciu alelických variantov alebo heterošpecifických homológov ľudskeho presenilinového génu v y z n a č u j c i s a t ý m, že obsahuje

vybratie protilátky schopnej selektívnej väzby na ľudský presenilinový proteín;

zmiešanie uvedenej protilátky so vzorkou proteínov, ktorá môže obsahovať proteíny korešpondujúci uvedenému variantu alebo homólu;

detekciu väzby uvedenej protilátky na uvedený proteín korešpondujúci uvedenému variantu alebo homólu.

26. Spôsob podľa nároku 25 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku proteínov vybraných zo skupiny skladajúcej sa z ľudských proteínov, ľudských fúzných proteínov a ich proteolytických fragmentov.

27. Spôsob podľa nároku 25 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku nukleových kyselín vybraných zo skupiny skladajúcej sa z cicavčích proteínov, cicavčích fúzných proteínov a ich proteolytických fragmentov.

28. Spôsob podľa nároku 25 v y z n a č u j c i s a t ý m, že uvedená vzorka obsahuje vzorku nukleových kyselín vybraných zo skupiny skladajúcej sa z proteínov od bezstavovcov, fúzných proteínov od bezstavovcova ich proteolytických fragmentov.

29. Spôsob podľa nároku 25 v y z n a č u j c i s a t ý m, že ďalej obsahuje podstatné čistenie uvedeného proteínu korešpondujúceho variantu alebo homológu.

30. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca alelický variant alebo heterošpecifický homológ ľudského génu pre presenilín.

31. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca alelický variant alebo heterošpecifický homológ ľudského presenilinového proteínu.

32. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 31, kde uvedená nukleová kyselina kóduje *Drosophila melanogaster* homológ ľudského génu pre presenilín.

33. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 31, kde uvedená nukleová kyselina obsahuje nukleotidovú sekvenciu vybranú zo skupiny skladajúcej sa zo:

(1) sekvencie kódujúcej proteín obsahujúci DmPS aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 21,

(2) sekvencie kódujúcej presenilinový homológny proteín a schopnej hybridizácie k sekvencii komplementárnej k sekvencii (1) za prísnych hybridizačných podmienok.

34. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca nukleotidovú sekvenciu aspoň 10 susediacich nukleotidov vybranou zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 21 a sekvencie komplementárnej k SEQ ID NO: 21.

35. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca rekombinantný vektor obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 - 34.

36. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 35, kde uvedený vektor je expresný vektor a uvedená presenilinová nukleotidová sekvencia je operatívne pripojená na regulačný región.

37. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 36, kde uvedený expresný vektor môže exprimovať uvedenú presenilinovú sekvenciu v cicavčích bunkách.

38. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 37, kde sú uvedené bunky vybrané zo skupiny skladajúcich sa z fibroblastových, pečňových, ľadvinových, slezinových neurologických buniek a buniek kostnej drene.

39. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 37, kde uvedený vektor je vybraný zo skupiny skladajúcej sa z vírusu vakcínie, adenovírusu, retrovírusu, neurotrofných vírusov a Herpes simplex vírusu.

40. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 36, kde uvedený expresný vektor kóduje aspoň funkčnú doménu presenilinového proteínu vybranú zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1, mutantného presenilin-1, normálneho presenilin-2 a mutantného presenilin-2.

41. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 36, kde uvedený vektor ďalej obsahuje sekvencie kódujúce exogénny proteín operatívne pripojený na uvedenú presenilinovú sekvenciu a kde uvedený vektor kóduje presenilinový fúzny proteín

42. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 41, kde uvedený exogénny proteín je vybraný zo skupiny skladajúcej sa z lacZ, trpE, maltosového väzobného proteínu, poly-His slučiek alebo glutathion-S-transferasy.

43. Izolovaná nukleová kyselina obsahujúca rekombinantný expresný vektor obsahujúci nukleotidové sekvencie korešpondujúce endogénnemu regulačnému regiónu presenilinového génu.

44. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 43, kde je uvedený endogénny regulačný región operatívne pripojený na markerový gén.

45. Hostiteľská bunka transformovaná expresným vektorom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 36 - 44, alebo ich potomstva.

46. Hostiteľská bunka podľa nároku 45, kde je uvedená hostiteľská bunka vybraná zo skupiny skladajúcej sa z fetálnych buniek, embryonálnych kmeňových buniek, zygôt, gamét a buniek zárodočnej línie.

47. Hostiteľská bunka podľa nároku 45, kde je uvedená hostiteľská bunka vybraná zo skupiny skladajúcej sa z fibroblastových, pečenej, ľadvinových, slezinových, neurologických buniek a buniek kostnej drene.

48. Hostiteľská bunka podľa nároku 45, kde je uvedená bunka bunkou od bezstavovcov.

50. Non-ľudský zvierač model pre Alzheimerovu chorobu, kde genóm uvedeného zvieraťa, alebo jeho predchodcu, bol modifikovaný aspoň jedným rekombinantným konštruktom a kde uvedený rekombinantný konštrukt obsahoval modifikácie vybrané zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) inzercia nukleotidových sekvencií kódujúcich aspoň funkčnú doménu heterospecifického normálneho génu pre presenilin,

(2) inzercia nukleotidových sekvencií kódujúcich aspoň funkčnú doménu heterospecifického mutantného génu pre presenilin,

(3) inzercia nukleotidových sekvencií kódujúcich aspoň funkčnú doménu konšpecifického homológu heterošpecifického mutantného génu pre presenilin, a

(4) inaktivácia endogénneho génu pre presenilín.

51. Zviera podľa nároku 50, kde uvedená modifikácia je inzercia nukleotidovej sekvencie kódujúcej aspoň funkčnú doménu normálneho ľudského génu pre presenilin-1.

52. Zviera podľa nároku 50, kde uvedená modifikácia je inzercia nukleotidovej sekvencie kódujúcej aspoň funkčnú doménu mutantného ľudského génu pre presenilin-1.

53. Zviera podľa nároku 50, kde uvedená modifikácia je inzercia nukleotidovej sekvencie kódujúcej aspoň funkčnú doménu normálneho ľudského génu pre presenilin-2.

54. Zviera podľa nároku 50, kde uvedená modifikácia je inzercia nukleotidovej sekvencie kódujúcej aspoň funkčnú doménu mutantného ľudského génu pre presenilin-2.

55. Zviera podľa nároku 50, kde uvedená modifikácia je inzercia nukleotidovej sekvencie kódujúcej aspoň funkčnú doménu normálneho alebo mutantného presenilinového proteínu.

56. Zviera podľa nároku 50, kde uvedené zviera je vybrané zo skupiny skladajúcej sa z krýs, myší, škrečkov, morčiat, králikov, psov, mačiek, kôz, oviec, prasiat a non-ľudských primátov.

57. Zviera podľa nároku 50, kde uvedené zviera je bezstavovec.

58. Spôsob pre produkciu aspoň funkčnej domény presenilinového proteínu v y z n a č u j c i s a t ý m, že obsahuje kultiváciu hostiteľskej bunky podľa ktoréhokoľvek z nárokov 45 - 49 za vhodných podmienok na produkciu uvedeného presenilinu prostredníctvom expresie uvedenej nukleovej kyseliny.

59. V podstate čistý prípravok proteínu vybraný zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

60. V podstate čistý prípravok podľa nároku 59, kde uvedený proteín obsahuje normálny presenilin-1 proteín vybraný zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 2;

(2) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 4;

(3) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 17;

(4) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 2, kde je zvyšok 257 nahradený alanínom a zvyšky 258 - 290 sú vynechané;

(5) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 4, kde je zvyšok 253 nahradený alanínom a zvyšky 254 - 286 sú vynechané;

61. V podstate čistý prípravok podľa nároku 59, kde uvedený proteín obsahuje mutantný presenilin-1 proteín obsahujúci aspoň jednu mutáciu, ktorá korešponduje mutáciu SEQ ID NO: 2 vybranej zo skupiny skladajúcej sa z A79?, V82L, V96F, Y115H, M139T, M139V, I143T, M146L, M146V, H163R, H163Y, L171P, G209V, I211T, A231T, A246E, A260V, C263R, P264L, P267S, E280A, E280A, E280G, A285V, L286V, _291-319, G384A, L392V a C410Y; a kde uvedený proteín inak korešponduje aminokyselinovej sekvencii vybranej zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 2;

(2) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 4;

(3) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 17;

(4) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 2, kde je zvyšok 257 nahradený alanínom a zvyšky 258 - 290 sú vynechané;

(5) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 4, kde je zvyšok 253 nahradený alanínom a zvyšky 254 - 286 sú vynechané.

62. V podstate čistý prípravok podľa nároku 59, kde uvedený proteín obsahuje normálny presenilin-2 proteín vybraný zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 19; a

(1) proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 19, kde zvyšky 263 - 296 sú vynechané.

63. V podstate čistý prípravok podľa nároku 59, kde uvedený proteín obsahuje mutantný presenilin-2 proteín obsahujúci aspoň jednu mutáciu, ktorá korešponduje mutáciu SEQ ID NO: 19 vybranej zo skupiny skladajúcej sa z M239V, N141I a I420T; a kde uvedený proteín inak korešponduje aminokyselinovej sekvencii vybranej zo skupiny skladajúcej sa z:

(1) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 19; a

(2) aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO: 19, kde zvyšky 263 - 296 sú vynechané.

64. V podstate čistý prípravok polypeptidu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu aspoň 5 susediacich aminokyselinových zvyškov vybraných zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

65. V podstate čistý prípravok polypeptidu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu aspoň 10 susediacich aminokyselinových zvyškov vybraných zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

66. V podstate čistý prípravok polypeptidu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu aspoň 15 susediacich aminokyselinových zvyškov vybraných zo skupiny skladajúcej sa z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 21.

67. V podstate čistý prípravok polypeptidu obsahujúceho aspoň jednu funkčnú doménu presenilinového proteínu vybraného zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

68. V podstate čistý prípravok podľa nároku 67, kde uvedená funkčná doména je presenilin-1 funkčná doména korešpondujúca doméne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z presenilin-1 N-koncovej, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncovej domény.

69. V podstate čistý prípravok podľa nároku 67, kde uvedená funkčná doména je presenilin-2 funkčná doména korešpondujúca doméne vybranej zo skupiny skladajúcej sa z presenilin-2 N-koncovej, TM1, TM1->2, TM2, TM2->3, TM3, TM3->4, TM4, TM4->5, TM5, TM5->6, TM6, TM6->7, TM7 a C-koncovej domény.

70. V podstate čistý prípravok polypeptidu obsahujúceho antigénny determinant presenilinového proteínu vybraného zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilin-1 proteínu, mutantného presenilin-1 proteínu, normálneho presenilin-2 proteínu a mutantného presenilin-2 proteínu.

71. V podstate čistý prípravok podľa nároku 70, kde uvedený polypeptid obsahuje presenilin-1 antigénny determinant korešpondujúci presenilin-1 antigénny determinant vybraného zo skupiny nukleotidov skladajúcej sa z aminokyselinových zvyškov 27 - 44, 28 - 61, 46 - 48, 50 - 60, 65 - 71, 66 - 67, 107 - 111, 109 - 112, 120 - 121, 120 - 122, 125 - 126, 155 - 160, 185 - 189, 214 - 223, 218 - 221, 220 - 230, 240 - 245, 241 - 243, 267 - 269, 273 - 282, 300 - 370, 302 - 310, 311 - 325, 332 - 342, 346 - 359, 372 - 382, 400 - 410 a 400 - 420 SEQ ID NO: 2.

72. V podstate čistý prípravok podľa nároku 70, kde uvedený polypeptid obsahuje presenilin-1 antigénny determinant korešpondujúci presenilin-1 antigénny determinant vybraného zo skupiny nukleotidov skladajúcej sa z aminokyselinových zvyškov 25 - 45, 50 - 63, 70 - 75, 114 - 120, 127 - 132, 162 - 167, 221 - 226, 282 - 290, 310 - 314, 321 - 338, 345 - 352, 380 - 390 a 430 - 435 SEQ ID NO: 19.

73. Spôsob pre produkciu protilátok, ktoré sa selektívne viažu na presenilin v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje kroky:

podanie imunogenicky účinného množstva presenilinového imunogénu zvieraťu,

umožnenie produkcie protilátok uvedeným zvieraťom k uvedenému imunogénu, a

získanie uvedených protilátok od uvedeného zvieraťa alebo z bunečnej kultúry od nej odvodennej.

74. V podstate čistý prípravok protilátky, ktorá sa selektívne viaže na antigénny determinant presenilinového proteínu vybraného zo skupiny skladajúcej sa z normálneho presenilinu-1, mutantného presenilinu-1, normálneho presenilinu-2 a mutantného apresenilinu-2.

75. V podstate čistý prípravok protilátky podľa nároku 74, kde uvedená protilátka sa selektívne viaže na antigénne determinanty mutantného presenilinu-1 a zlyháva vo väzbe na normálny presenilin-1 proteín.

76. V podstate čistý prípravok protilátky podľa nároku 74, kde uvedená protilátka sa selektívne viaže na antigénne determinanty mutantného presenilinu-2 a zlyháva vo väzbe na normálny presenilin-2 proteín.

77. Bunečná lúnia produkujúca protilátky podľa akéhokoľvek z nárokov 74 - 76.

78. Spôsob pre identifikovanie zlúčenín, ktoré môžu modulovať expresiu génu na presenilin v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje

kontaktovanie buniek s testovaným kandidátom, kde uvedené bunky obsahujú regulačný región génu pre presenilin operatívne pripojený na kódujúci región, a

detekovanie zmien v expresii uvedeného kódujúceho regiónu.

79. Spôsob podľa nároku 78 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena zahŕňa zmenu na úrovni mRNA transkriptu kódovaného uvedeným kódujúcim regiónom.

80. Spôsob podľa nároku 78 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena zahŕňa zmenu na úrovni proteínu kódovaného uvedeným kódujúcim regiónom.

81. Spôsob podľa nároku 78 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena je výsledkom aktivity proteínu kódovaného uvedeným kódujúcim regiónom.

82. Spôsob podľa nároku 78 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený kódujúci región kóduje markerový proteín vybraný zo skupiny skladajúcej sa z -galaktosidasy, alkalickéj fosfatasy, zeleného fluorescentného proteínu a luciferasy.

83. Spôsob na identifikáciu zlúčenín, ktoré sa môžu selektívne viazať na presenilinový proteín v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje kroky:

poskytnutie prípravku obsahujúceho aspoň jednu presenilínovú zložku,

kontaktovanie uvedeného prípravku so vzorkou obsahujúcou aspoň jednu kandidátovú zlúčeninu, a

detekovanie väzby uvedenej presenilinovej zložky na uvedenú kandidátovu zlúčeninu,

84. Spôsob podľa nároku 83 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že väzba na uvedenú presenilinovú zložku je detekovaná testom vybraným zo skupiny pozostávajúcej z: afinitnej chromatografie, ko-imunoprecipitácie, Biomolecular Interaction Assay a kvasinkového dvojhybridového systému.

85. Spôsob na identifikáciu zlúčenín, ktoré môžu modulovať aktivitu presenilinu v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje kroky

poskytnutie buniek exprivujúcich normálny alebo mutantný gén na presenilin,

kontaktovanie buniek s aspoň jednou testovanou kandidátovou zlúčeninou, a

detekovanie zmien v markere uvedenej aktivity.

86. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že meranie uvedeného markeru ukazuje rozdiel medzi bunkami nesúcimi exprivovaný mutantný gén na presenilin a inak identickými bunkami bez exprivovaného mutantného génu pre presenilin.

87. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu v nešpecifickom markere bunečnej fehoyziológie vybranom zo skupiny skladajúcej sa z pH, intracelulárneho vápniku, hladín cyklického AMP, pomerov GTP/DP, aktivity fosfatidylinositolu a proteínovej fosforylácie.

88. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu v expresii uvedeného presenilinu.

89. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu v intracelulárnej koncentrácii alebo prúdu iónov vybraných zo skupiny skladajúcej sa z Ca^{2+} , Na^+ a K^+ .

90. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu vo výskyte alebo stupni apoptózy alebo bunečnej smrti.

91. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu v produkcii A peptidov.

92. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená zmena obsahuje zmenu vo fosforylácii aspoň jedného s mikrotubulmi asociovaného proteínu.

93. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je bunka kultivovaná in vitro.

94. Spôsob podľa nároku 93 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je transformovaná hostiteľská bunka podľa akéhokoľvek z nárokov 45 - 49.

95. Spôsob podľa nároku 93 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je explantovaná z hostiteľa nesúceho aspoň jeden mutantný gén na presenilín.

96. Spôsob podľa nároku 93 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je explantovaná z transgénneho zvieraťa podľa akéhokoľvek z nárokov 50 - 57.

97. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je bunka v živom zvierati

98. Spôsob podľa nároku 97 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je bunka transgénneho zvieraťa podľa akéhokoľvek z nárokov 50 - 57.

99. Spôsob podľa nároku 85 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená bunka je v ľudskom subjekte v klinickom pokuse.

100. Diagnostická metóda na určenie toho, či subjekt nesie mutantný gén pre presenilín, ktorá obsahuje kroky:

poskytnutie biologickej vzorky od uvedeného subjektu;

detekovanie v uvedenej vzorke mutantnej nukleovej kyseliny pre presenilín, mutantného presenilinového proteínu, alebo aktivity mutantného presenilínu.

101. Spôsob podľa nároku 100 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že mutantná presenilinová nukleová kyselina je detekovaná testom vybraným zo skupiny skladajúcej sa z priameho sekventovania nukleotidov, próbovej špecifickej hybridizácie, trávenie reštrikčnými enzýmami a mapovanie, PCR mapovanie, ligázou mediaované PCR detekcie, RNAsové protekcie, detekciu posunu elektroforetickej mobility a chemicky chybným štepením.

102. Spôsob podľa nároku 100 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že mutantný presenilinový proteín je detekovaný testom vybraným zo skupiny skladajúcej sa z imunotestu, proteasového testu a testu elektroforetickej mobility.

103. Farmaceutický prípravok obsahujúci v podstate čistý presenilinový proteín a farmaceuticky akceptovateľný nosič.

104. Farmaceutický prípravok obsahujúci expresný vektor operatívne kódujúci presenilinový proteín, kde uvedený expresný vektor môže exprivovať uvedený presenilinový proteín v ľudských subjektoch a farmaceuticky akceptovateľný nosič.

105. Farmaceutický prípravok obsahujúci expresný vektor operatívne kódujúci presenilinovú antisense sekvenciu, kde uvedený expresný vektor môže exprivovať uvedenú presenilinovú antisense sekvenciu v ľudských subjektoch a farmaceuticky akceptovateľný nosič.

106. Farmaceutický prípravok obsahujúci v podstate čistú protilátku, kde sa uvedená protilátka selektívne viaže na mutantný presenilinový proteín a farmaceuticky akceptovateľný nosič.

107. Farmaceutický prípravok podľa nároku 106, kde je uvedený prípravok v podstate bez protilátky, ktorá sa selektívne viaže na normálny presenilinový proteín.

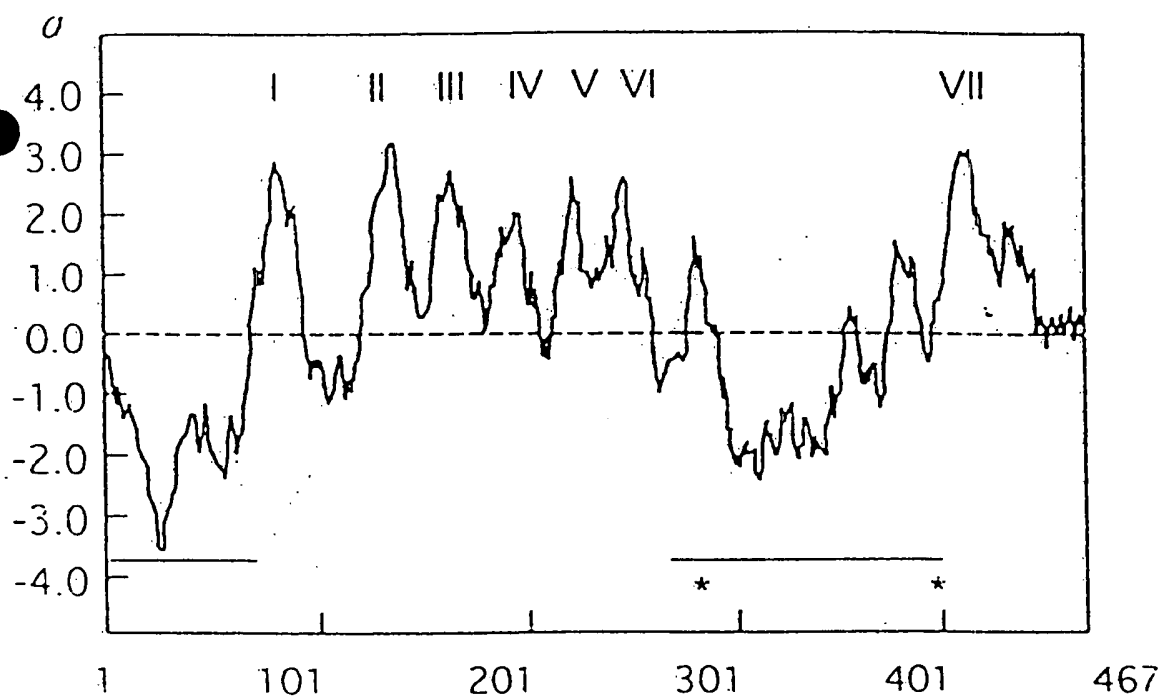
108. Farmaceutický prípravok obsahujúci v podstate čistý prípravok antigénnych determinánt mutantného presenilinového proteínu.

109. Farmaceutický prípravok podľa nároku 108, kde je uvedený prípravok v podstate bez antigénnych determinánt normálneho presenilinového proteínu.

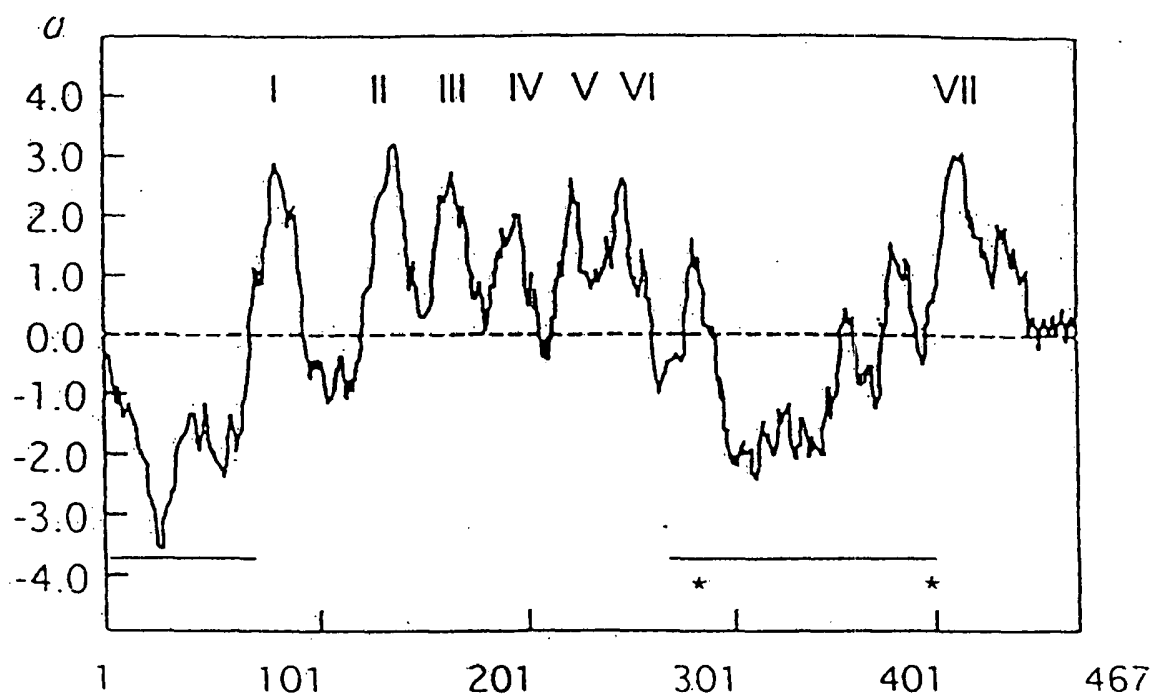
110. Spôsob pre liečbu pacientov majúcich mutantný gén pre presenilín v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje krok podávania terapeuticky účinného množstva farmaceutického prípravku podľa akéhokoľvek z nárokov 103 - 109 uvedenému pacientovi.

111. Spôsob podľa nároku 110 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený farmaceutický prípravok je zameraný na typ buniek vybraných zo srdcových, mozgových, pľúcnych, pečeneových buniek, buniek kostrového svalu, ľadviny, slinivky a neurologických buniek.

OBRÁZOK 1



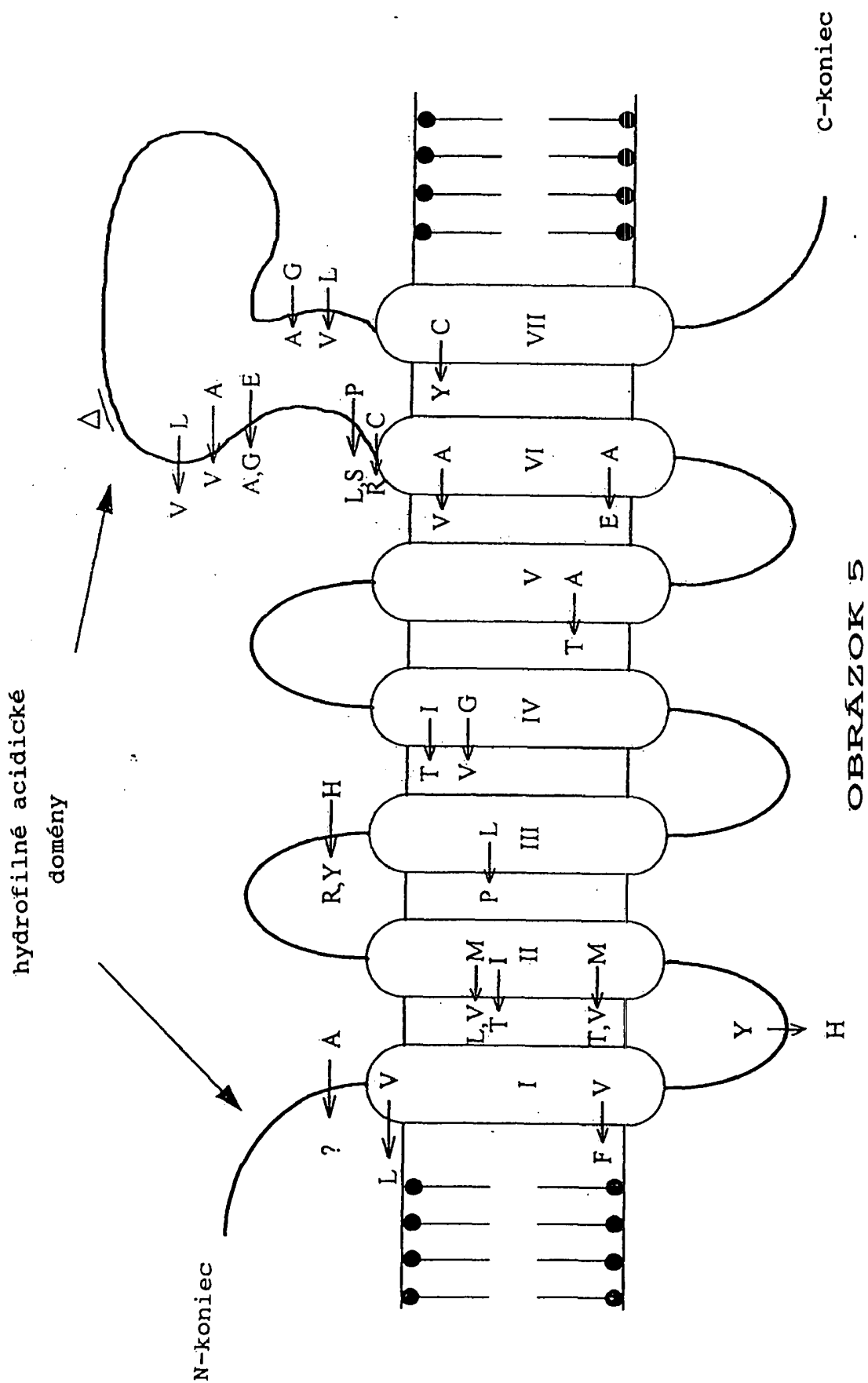
OBRÁZOK 2

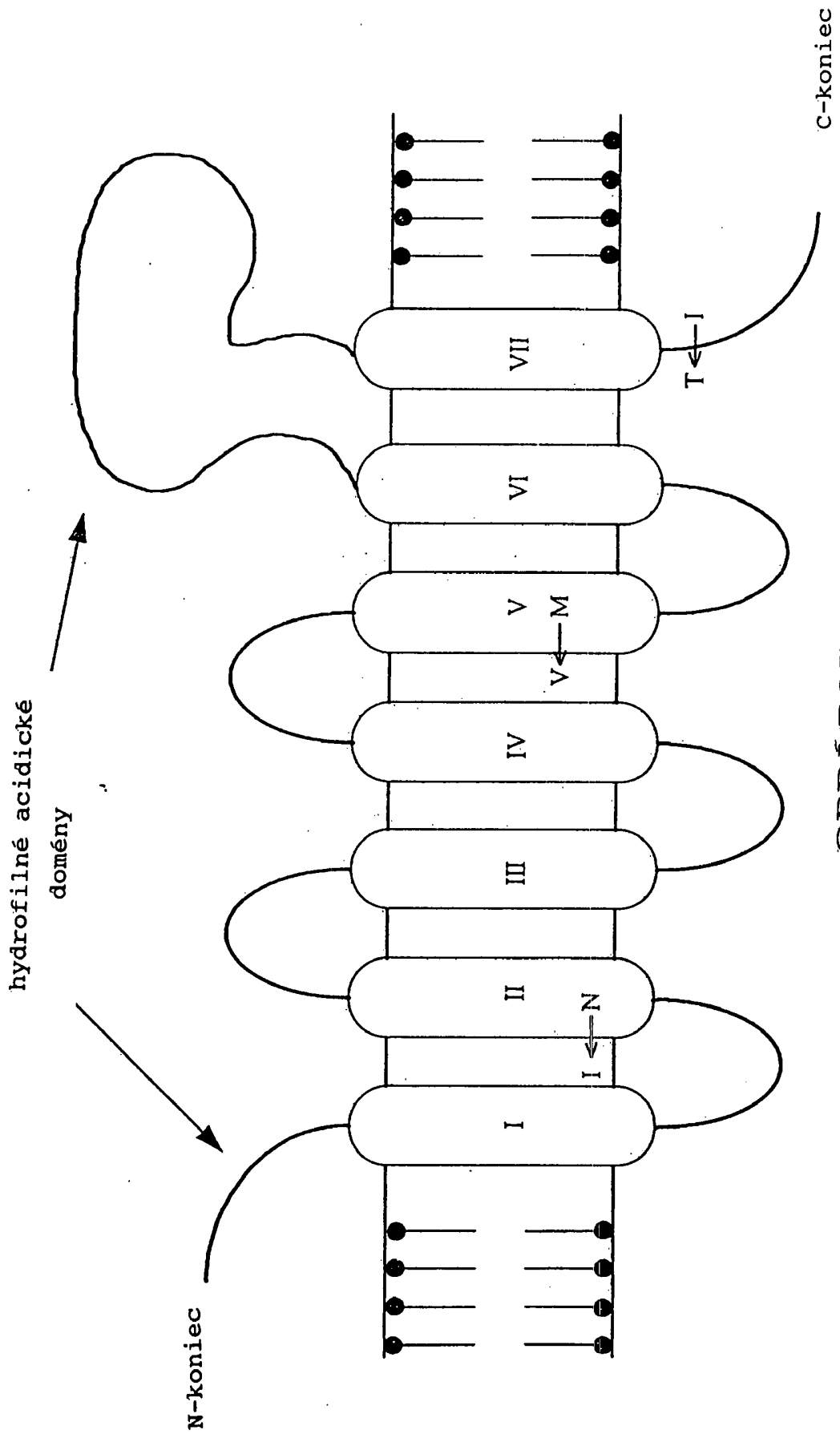


obrázek 2

hPS1	MTELPAPLSYFQNAQMSSEDNHLSNTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPE	48
mPS1	MTEIPAPLSYFQNAQMSSEDSHSSSAIRSQND SQERQQHQRQLDNPE	48
hPS1	PLSNGRPQGNRSRQVVEQDEEEDDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVV	96
mPS1	PISNGRPQSNRSRQVVEQDEEEDDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVV	96
hPS1	VATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIV	144
mPS1	VATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIV	144
hPS1	VMTILLVVLKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLG EVFKTYNVA	192
mPS1	IMTILLVVLKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLG EVFKTYNVA	192
hPS1	VDYITVALLIWNFGVVGMI SIHWKGPLRLQOAYLIMISALMALVFIKY	240
mPS1	VDYITVALLIWNFGVVGMI SIHWKGPLRLQOAYLIMISALMALVFIKY	240
hPS1	LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIY	288
mPS1	LPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIY	288
hPS1	SSTMVWLVNMAEGDPEAQR RVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGF	336
mPS1	SSTMVWLVNMAEGDPEAQR RVKPNPKYNTQRAERETQDSGSGNDDGGF	336
hPS1	SEWEAQRD SHLGPHRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERG VKLGLG	384
mPS1	SEWEAQRD SHLGPHRSTPESRAAVQELSGSILTSEDPEERG VKLGLG	384
hPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKAL	432
mPS1	DFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKAL	432
hPS1	PALPISITFGLVFYFATDYL VQPFMDQLAFHQFYI	467
mPS1	PALPISITFGLVFYFATDYL VQPFMDQLAFHQFYI	467

hPS1	-----MT-ELPAPLSYFQNA-QMSEDNHLSNTV	26
hPS2	MLTFMASDSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSC-QEGRQGPEDGE--NTA	45
hPS1	--RSQ-N--DNRERQEHNDRR--SLGHPEPLSNGRPQGNSRQVVEQDE	67
hPS2	QWRSQENEEDG-E--EDPDYVCS-GVP-----GRPPGL-----E---	76
hPS1	EEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIY	115
hPS2	---EELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMIVVVVATIKSVRFYTEKNGQLIY	121
hPS1	TPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVVLKYRCYKVIH	163
hPS2	TPFTEDTPSVGQRLNLSVLNTLIMISVIVVMTIFLVVLKYRCYKFIH	169
hPS1	AWLIISL L L L L F F F S F I Y L G E V F K T Y N V A V D Y I T V A L L I - W N F G V V G M	210
hPS2	GWLIMSSIM L L L F L E T Y I Y L G E V L K T Y N V A M D Y P T L - L L T V W N F G A V G M	216
hPS1	ISIHWKGPLRLQOAYLIMISALMALVFIKYLPEWTAWLIL-AVISVYD	257
hPS2	VCIHWKGPLVLQOAYLIMISALMALVFIKYLPEWSAWVILGA-ISVYD	263
hPS1	LVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYSSMTVWLVNMAEGDPEA	305
hPS2	LVAVLCPKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMVWTVGMAKLP--	309
hPS1	QRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSE-EWEAQRDShLG-PH	351
hPS2	----S--SQGAL-----QLPY---DP----EME-EDSYDSF-GEP-	334
hPS1	RSTPESRAAVQE--LSSSILAGEDP---EERGVLGLGDFIFYSVLVG	394
hPS2	-SYPE---VFEPPLTGYP--GEELEEEERGVKLGLGDFIFYSVLVG	375
hPS1	KASATASGDWNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFG	442
hPS2	KAAATGSGDWNTTLACFVAILIGLCLTLLLLAVFKKALPALPISITFG	423
hPS1	LVFYFATDYLVPFMDQLAFHQFYI	467
hPS2	LIFYFSTDNLVRPFMDTLASHQLYI	448





OBRÁZOK 6