

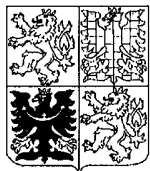
# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 4536**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.06.1998 01.03.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19825213 1999/19908837**

(33) Země priority: **DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**

(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03889**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/64572**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

C 12 N 9/10 A 61 K 31/70

C 12 N 15/54 A 61 K 38/45

C 07 K 14/455

C 12 N 15/10

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/53

A 61 K 48/00

A 01 K 67/027

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Kock Michael, Schifferstadt, DE;

Höger Thomas, Edingen-Neckarhausen, DE;

Kröger Burkhard, Limburgerhof, DE;

Otterbach Bernd, Ludwigshafen, DE;

Lubisch Wilfried, Heidelberg, DE;

Lemaire Hans-Georg, Limburgerhof, DE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nové poly(ADP-ribóza) polymerázové geny**

(57) Anotace:

Řešení se týká homologů poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP), které sestávají z aminokyselinové sekvence, která má a) funkční NAD<sup>+</sup> vazebnou doménu a b) neobsahuje sekvenci motivu zinkového prstu obecného vzorce CX<sub>2</sub>CX<sub>m</sub>HX<sub>2</sub>C, ve kterém m je celé číslo od 28 nebo 30 a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny; funkčních ekvivalentů homologů poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP); nukleových kyselin kódujících homology poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP); protilátek se specificitou pro nový protein; farmaceutických kompozice a kompozice genové terapie, které obsahují produkty podle předloženého řešení; způsobů pro analytické určování proteinů a nukleových kyselin podle předloženého řešení; způsobů pro identifikaci efektorů a vazebných partnerů proteinů podle předloženého řešení; nových PARP efektorů; a způsobů pro určení aktivity takových efektorů.



PV 2011-4536

26142

## Nové poly(ADP-ribóza) polymerázové geny

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových poly(ADP-ribóza) polymerázových (PARP) genů a z nich odvozených proteinů; protilátek specifických k novým proteinům; kompozic farmaceutické a genové terapie, které obsahují produkty podle předloženého vynálezu; způsobů pro analytické určování proteinů a nukleových kyselin podle předloženého vynálezu; způsobů pro identifikaci efektorů a vazebných partnerů proteinů podle předloženého vynálezu; způsobů pro určení aktivity takových efektorů a jejich použití v diagnóze nebo terapii patologických stavů.

### Dosavadní stav techniky

Je známo, že v roce 1966, Chambon a spolupracovníci objevili enzym velikosti 116kD, který byl v následujících letech detailně popsán a nyní se jmenuje PARP (EC 2,4.2,30) (poly(adenozin-5'-difosforibóza)polymeráza), PARS (poly(adenozin-5'-difosforibóza)syntáza) nebo ADPRT (adenozin-5'-difosforibóza transferáza). V rostlinné říši (Arabidopsis thaliana) 72kD (637 aminokyselin) byl PARP nalezen v roce 1995 (Lepiniec L. a kol., FEBS Lett 1995; 364(2): 103-8). Nebylo jasné, zda tato kratší forma PARP je individuálně specifická pro rostliny nebo je artefaktem ("naroubovaná" varianta nebo něco podobného). Enzym velikosti 116 kD PARP byl do současnosti jedinečný u zvířat a u člověka ve své aktivitě, která je níže popsána. Je



uváděn jako PARP1, čímž se předejde nejednoznačnosti.

Primární fyziologickou funkcí enzymu PARP 1 se zdá být jeho účast v komplexním reparačním mechanismu, který si buňky vytvořily pro opravu zlomů vlákna DNA. Primární buněčnou odpovědí na zlom vlákna DNA se kromě toho zdá být PARP1-katalyzovaná syntéza poly(ADP-ribózy) z  $\text{NAD}^+$  (viz De Murcia, G. a kol. (1994) TIBS, 19, 172).

PARP 1 má modulární molekulární strukturu. Do současnosti byly identifikovány tři hlavní funkční prvky: N-terminální vazebná doména DNA velikosti 46 kD; centrální automodifikační doména velikosti 22 kD ke které se poly(ADP-ribóza) váže, s aktivitou PARP 1 enzymu klesající se zvyšující se elongací; C-terminální  $\text{NAD}^+$  vazebná doména velikosti 54 kD. Oblast leucinových zipů byla nalezena v automodifikační doméně, což poukazuje na možné protein-proteinové interakce, ale pouze u enzymu PARP z Drosofilu. Všechny do současnosti známé PARP jsou pravděpodobně aktivní jako homodimery.

Vysoký stupeň organizace molekuly se odráží v silné konzervaci aminokyselinové sekvence. 62 % konzervace aminokyselinové sekvence byla nalezena pro PARP 1 pocházející z člověka, myši, skotu a kuřat. U PARP z Drosofilu jsou větší strukturální rozdíly. Individuální domény mají samy jedna po druhé oblasti zvýšené konzervace. DNA vazebná oblast takto obsahuje dva tak zvané zinkové prsty jakožto subdomény (obsahující motivy typu  $\text{CX}_2\text{CX}_{28/30}\text{HX}_2\text{C}$ ), které jsou zapojené do  $\text{Zn}^{2+}$  závislého rozpoznání zlomů jednovláknové DNA nebo přečnávajících



konců jednovláknové DNA (tj. na koncích chromozomů, telomer). C-terminální katalytická doména obsahuje blok o délce asi 50 aminokyselin (zbytky v polohách 859 až 908), který je asi ve 100 % konzervován mezi obratlovci (PARP "podpis"). Tento blok váže přirozený substrát  $\text{NAD}^+$  a takto řídí syntézu poly(ADP-ribózy) (viz de Murcia, loc.cit.).  $\text{GX}_3\text{GKG}$  motiv je zvláště charakteristický pro enzymy PARP v tomto bloku.

Výše popsaná prospěšná funkce je v kontrastu s patologickou funkcí, kterou je možné nalézt u řady nemocí (mrtvice, infarkt myokardu, sepse atd.). PARP je zapojena do buněčné smrti mozkové tkáně, která vznikne po ischemii (Choi, D.W., (1997) *Nature Medicine*, 3, 10, 1073), dále srdeční tkáně (Zingarelli, B. a kol. (1997), *Cardiovascular Research*, 36, 205) a oka (Lam, T.T. (1997), *Res. Comm. in Molecular Pathology and Pharmacology*, 95, 3, 241). PARP aktivace indukovaná mediátory zánětu byla také pozorovaná u septického šoku (Szabo, C. a kol. (1997), *Journal of Clinical Investigation*, 100, 3, 723). V těchto případech je aktivace PARP spojená s rozsáhlou spotřebou  $\text{NAD}^+$ . Jelikož pro biosyntézu jednoho molu  $\text{NAD}^+$  jsou spotřebované čtyři moly ATP, je tak buněčná dodávka energie drasticky snížena. Důsledkem je buněčná smrt.

Inhibitory PARP1 popsané ve výše uvedené odborné literatuře jsou nikotinamid a 3-aminobenzamid. 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isochinolon byl popsán v Takahashi, K. a kol. (1997), *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 1137. Další inhibitory jsou popsané například v Banasik, M. a kol. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267,



3, 1569 a Griffin, R.J. a kol. (1995), Anti-Cancer Drug Design, 10, 507.

Vysokomolekulární vazební partneři popsání pro lidskou PARP1 obsahují protein XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1), který je zapojen do opravy odstraňující báze vystřižením (base excision repair) (BER), který váže cestou motivu zinkového prstu a BRCT (BRCA1 C-konec) modulu (aminokyseliny v poloze 372-524) (Masson, M. a kol., (1998) Molecular and Cellular Biology, 18,6, 3563).

#### Podstata vynálezu

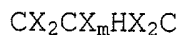
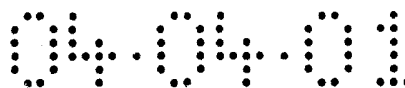
Vzhledem k různým fyziologickým a patologickým funkcím PARP se předložený vynález se týká nových homologů PARP. Důvod pro získání homologních enzymů PARP by spočíval v důležitosti pro vývoj nových cílů pro působení léků a nových léků, za účelem zlepšení diagnózy a/nebo terapie patologických stavů ve kterých se účastní PARP, homology PARP nebo z nich odvozené látky.

Shledali jsme, že se předmětu vynálezu docílí získáním homologů PARP, s výhodou odvozených z člověka a jiných savců, které mají aminokyselinovou sekvenci, která

a) obsahuje funkční  $\text{NAD}^+$  vazebnou doménu, tj. PARP "podpisovou" sekvenci mající charakteristický  $\text{GX}_3\text{GKG}$  motiv;

a

b) v N-koncové oblasti sekvence, tj. v oblasti prvních 200, obzvláště například v oblasti prvních 100, N-koncových aminokyselin, nemá PARP sekvenci motivů zinkových prstů obecného vzorce

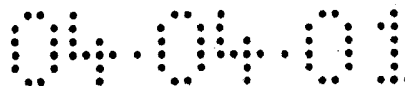


ve kterém

m je celé číslo od 28 nebo 30 a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny; a jejich funkční ekvivalenty.

Vzhledem k tomu, že molekuly PARP podle předloženého vynálezu, představují obzvláště funkční homology, vykazují také přirozeně poly(ADP-ribóza)-syntetizující aktivitu. Této aktivitě hlavně odpovídá NAD vazebná doména, která je umístěna na C-konci.

Hlavní charakteristikou enzymů PARP podle předloženého vynálezu, je takto přítomnost funkční NAD<sup>+</sup> vazebné domény (PARP podpis), která je umístěná v C-terminální oblasti aminokyselinové sekvence (tj. přibližně v oblasti posledních 400, jako například posledních 350 nebo 300, C-terminálních aminokyselin), v kombinaci s N-terminální sekvencí, která nemá motivy zinkových prstů. Vzhledem k tomu, že motivy zinkových prstů ve známých PARP enzimech pravděpodobně přispívají k rozpoznání DNA zlomů, mělo by se předpokládat, že proteiny podle předloženého vynálezu nejsou v interakci DNA nebo k tomu jinou cestou nepřispívají. Příslušnými biochemickými testy bylo prokázáno, že enzym PARP2 podle předloženého vynálezu může být aktivován 'aktivovanou DNA' (tj. DNA po parciálním natrávení enzymem DNázaI). Z toho může být dále shrnuto, že PARP2 podle předloženého vynálezu má DNA vazebné vlastnosti. Nicméně mechanismus DNA vazby enzymu a enzymové



aktivace se liší mezi enzymy PARP podle předloženého vynálezu a PARP1. Jeho vazba DNA a enzymová aktivace je, jak již bylo uvedeno, zprostředkovaná charakteristickým motivem zinkového prstu. Takové motivy nejsou přítomné v enzymech PARP podle předloženého vynálezu. Pravděpodobně jsou tyto vlastnosti zprostředkované kladně nabitými aminokyselinami v N-koncové oblasti enzymů PARP podle předloženého vynálezu. Vzhledem k tomu, že 'aktivovaná DNA' (tj. například DNA po parciálním natrávení enzymem DNázaI) obsahuje velmi početné defekty (jednovláknové zlomy, jednovláknové mezery, jednovláknové překrývající se konce, dvouvláknové zlomy atd.), je možné, že přestože PARP1 a enzymy PARP podle předloženého vynálezu jsou aktivované nějakou z 'aktivovaných DNA', tak je to jinou subpopulací defektů (například jednovláknovými mezerami namísto jednovláknových zlomů).

Funkční  $\text{NAD}^+$  vazebná doména (tj. katalytická doména) váže substrát pro syntézu poly-(ADP-ribózy). Ve shodě se známými enzymy PARP je zvláště přítomná sekvence motivu  $\text{GX}^1\text{X}^2\text{X}^3\text{GKG}$ , ve kterém G je glycin, K je lysin a  $\text{X}^1$ ,  $\text{X}^2$  a  $\text{X}^3$  jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny. Nicméně, jak bylo ukázáno, srovnáním aminokyselinových sekvencí  $\text{NAD}^+$  vazebných domén PARP molekul podle předloženého vynálezu, s před tím odhaleným lidským PARP1, se sekvence podle předloženého vynálezu překvapivě významně liší od známých sekvencí pro  $\text{NAD}^+$  vazující doménu.

Výhodná skupina PARP molekul podle předloženého vynálezu má s výhodou následující společný obecný sekvenční motiv v katalytické doméně:



PX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA (SEQ ID NO:11), obzvláště  
(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA (SEQ ID NO:12), s výhodou  
LLWHG(S/T)X<sub>7</sub>IL(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFAX<sub>3</sub>SKSAXY  
(SEQ ID NO:13)

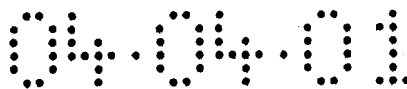
ve kterém (S/T) popisuje alternativní obsazení této sekvenční pozice S nebo T, (I/V) popisuje alternativní obsazení této sekvenční pozice I nebo V a n je celé číslo od 1 do 5 a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny. Poslední motiv je také nazýván jako motiv "PARP podpisu".

Automodifikační doména je s výhodou přítomna podobně jako v enzymech PARP podle předloženého vynálezu. Může být umístěna například v oblasti přibližně od polohy 100 do 200 aminokyseliny protisměrně vzhledem k N-terminálnímu konci NAD<sup>+</sup> vazebné domény.

Homology PARP podle předloženého vynálezu mohou navíc obsahovat, protisměrně vzhledem k N-koncové NAD<sup>+</sup> vazebné doméně (tj. od asi 30 do asi 80 aminokyselin blíže k N-konci), sekvenci motivu leucinového zipu obecného vzorce

(L/V)X<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>L (SEQ ID NO:14),

ve kterém (L/V) představuje alternativní obsazení této sekvenční pozice L nebo V a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny. Motivy leucinového zipu podle předloženého vynálezu se liší ve své pozici od motivů leucinového zipu popsanych u PARP z



Drosofilu. Leucinové zipy mohou vést k homodimerům (dvě PARP molekuly) nebo heterodimerům (jedna PARP molekula s molekulou vazebného partnera, který se od ní liší).

Homology PARP podle předloženého vynálezu s výhodou navíc obsahují, směrem k N-konci od výše uvedených sekvencí leucinovým zipům podobných motivů, tj. asi od 10 do 250 aminokyselinových zbytků blíže k N-konci, alespoň ještě jeden z následujících motivů částečné sekvence:

LX<sub>9</sub>NX<sub>2</sub>YX<sub>2</sub>QLLX(D/E)X<sub>b</sub>WGRVG, (motiv 1; SEQ ID NO:15)

AX<sub>3</sub>FXX<sub>4</sub>KTXNXW<sub>5</sub>FX<sub>3</sub>PXK, (motiv 2; SEQ ID NO:16)

QXL(I/L)X<sub>2</sub>IX<sub>9</sub>MX<sub>10</sub>PLGKLX<sub>3</sub>QIX<sub>6</sub>L, (motiv 3; SEQ ID NO:17)

FYTXIPHXFGX<sub>3</sub>PP, (motiv 4; SEQ ID NO:18)

a

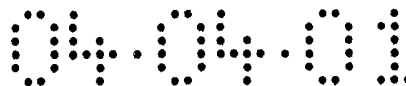
KX<sub>3</sub>LX<sub>2</sub>LXDIEXAX<sub>2</sub>L (motiv 5; SEQ ID NO:19),

ve kterém (D/E) popisuje alternativní obsazení této sekvenční polohy D nebo E, (I/L) popisuje alternativní obsazení této sekvenční polohy I nebo L, b je integrální hodnota nabývající hodnoty 10 nebo 11 a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny. Nejvýhodněji jsou tyto motivy 1 až 5 všechny přítomné na stanovené sekvenci, s tím, že motiv 1 je nejbliže N-konci.

Výše uvedený PARP podpisový motiv je následován v proteinové sekvenci podle předloženého vynálezu alespoň ještě jedním z následujících motivů:

GX<sub>3</sub>LXEVALG (motiv 6; SEQ ID NO:20)

GX<sub>2</sub>SX<sub>4</sub>GX<sub>3</sub>PXaLXGX<sub>2</sub>V (motiv 7; SEQ ID NO:21) a



E(Y/F)X<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>QX<sub>4</sub>YLL (motiv 8; SEQ ID NO:22)

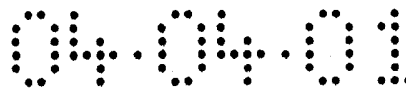
ve kterém (Y/F) popisuje alternativní obsazení této sekvenční polohy Y nebo F a je rovno hodnotám od 7 do 9 a X je v každém případě nějaká aminokyselina. Nejvýhodněji jsou tři C-terminální motivy všechny přítomné a na stanovené sekvenci je motiv 8 nejbliže konci.

Výhodná struktura PARP podle předloženého vynálezu je níže schematicky popsána:

Motivy 1 až 5/PARP podpis/motivy 6 až 8 nebo motivy 1 až 5/leucinový zip/PARP podpis/motivy 6 až 8

další z aminokyselinových zbytků, jako například až 40 aminokyselinových zbytků, mohou být uspořádány mezi individuálními motivy a další z aminokyselinových zbytků, jako například až 80 aminokyselinových zbytků 80, uspořádány na N-konci a/nebo na C konci.

Homology PARP podle předloženého vynálezu, které jsou obzvláště výhodné, jsou lidský protein PARP2, lidský protein PARP3, myší protein PARP3 a jejich funkční ekvivalenty. Protein označovaný jako lidský protein PARP2 obsahuje 570 aminokyselin (viz SEQ ID NO:2). Protein označovaný jako lidský protein PARP3 může existovat ve dvou formách. Typ 1 obsahuje 533 aminokyselin (SEQ ID NO:4) a typ 2 obsahuje 540 aminokyselin (SEQ ID NO:6). Formy mohou vznikat různou iniciací translace. Protein označovaný jako myší protein PARP3 existuje ve dvou formách, který, které se liší jedna od druhé delecí 5 aminokyselin (15 párů



bází). Typ 1 obsahuje 533 aminokyselin (SEQ ID NO: 8) a typ 2 obsahuje 528 aminokyselin (SEQ ID NO:10). Homology PARP podle předložené přihlášky vynálezu se liší významně v jejich sekvenci vzhledem k PARP proteinu z *Arabidopsis thaliana* (viz výše). Například, PARP2 a PARP3 neobsahují pro rostliny specifickou PARP peptidovou sekvenci AAVLDQWIPD, odpovídající aminokyselinovým zbytkům v polohách 143 až 152 u proteinu z *Arabidopsis*.

Předložený vynález se dále týká vazebných partnerů homologů PARP podle předloženého vynálezu. Tyto vazebné partnery jsou s výhodou vybrány z

- a) protilátek a fragmentů protilátek jako například Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>,
- b) proteinům podobných sloučenin, které interagují, například cestou výše uvedené oblasti leucinového zipu nebo jinou sekvenční sekcí, s PARP, a
- c) nízkomolekulárních efektorů, které modulují biologickou funkci PARP jako například katalytickou aktivitu PARP, tj. NAD<sup>+</sup> konzumující ADP ribozylaci nebo vazbu na aktivační protein nebo na DNA.

Předložený vynález se dále týká nukleových kyselin sestávajících z

- a) nukleotidové sekvence kódující alespoň jeden PARP homolog podle předloženého vynálezu nebo její komplementární nukleotidovou sekvenci;
- b) nukleotidové sekvence, která hybridizuje se sekvencí, jak je upřesněno v bodě a), s výhodou s výhodou za stringentních podmínek; nebo

c) nukleotidových sekvencí, které jsou odvozené z nukleotidových sekvencí definovaných v bodech a) a b) degenerací genetického kódu.

Nukleové kyseliny, které jsou vhodné podle předloženého vynálezu obsahují obzvláště alespoň jednu z parciálních sekvencí, které kódují výše uvedené motivy aminokyselinové sekvence.

Nukleové kyseliny, kterým je dávána přednost podle předloženého vynálezu, obsahují nukleotidovou sekvenci, jak je ukázáno v SEQ ID NO: 1 a 3 a obzvláště jejich částečné sekvence, které jsou charakteristické pro homology PARP podle předloženého vynálezu, jako například nukleotidové sekvence sestávající z

- a) nukleotidů v polohách +3 do +1715 ukázané v SEQ ID NO:1;
- b) nukleotidů v polohách +242 do +1843 ukázané v SEQ ID NO:3;
- c) nukleotidů v polohách +221 do +1843 ukázané v SEQ ID NO:5;
- d) nukleotidů v polohách +112 do +1710 ukázané v SEQ ID NO:7; nebo
- e) nukleotidů v polohách +1 do +1584 ukázané v SEQ ID NO:9

nebo částečné sekvence podle bodů a), b), c), d) a e), které kódují výše uvedené charakteristické motivy aminokyselinových sekvencí homologů PARP podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se dále týká kazet exprese, které obsahují alespoň jednu z výše popsaných nukleotidových sekvencí podle předloženého vynálezu, pod genetickou kontrolou regulačních nukleotidových sekvencí. Tyto mohou být použity pro přípravu rekombinantních vektorů podle předloženého vynálezu, jako například virových vektorů nebo plazmidů, které obsahují alespoň jednu kazetu exprese podle předloženého vynálezu.

Rekombinantní mikroorganismy podle předloženého vynálezu, jsou transformované alespoň jedním výše uvedeným vektorem.

Předložený vynález se také týká transgenních savců, u nichž byla provedena transfekce vektorem podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se dále týká způsobů *in vitro* detekce PARP inhibitorů, která může být provedena homogenně nebo heterogenně a která sestává z

- a) inkubace poly-ADP-ribózilovatelného cíle na nosiči nebo bez nosiče s reakční směsí, která sestává z
  - a1) PARP homologu podle předloženého vynálezu;
  - a2) PARP aktivátoru; a
  - a3) PARP inhibitoru nebo analytu, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho PARP inhibitoru;
- b) provedení polyADP ribozylační reakce; a
- c) kvalitativního nebo kvantitativního určení polyADP ribozylace cíle.

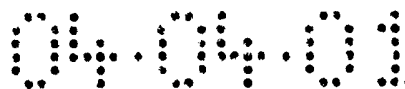


Způsob detekce se s výhodou provádí preinkubací PARP homologu s PARP aktivátorem a PARP inhibitorem nebo analytem, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho PARP inhibitoru, například po dobu 1 až 30 minut, před provedením poly-ADP ribozylační reakce.

Po aktivaci prostřednictvím DNA s jednovláknovými zlomy (označované jako "aktivovaná DNA" podle předloženého vynálezu), PARP poly-ADP ribozyluje velký počet jaderných proteinů v přítomnosti NAD. Tyto proteiny obsahují, na jednu stranu PARP jako takovou, ale také histony atd.

Poly-ADP-ribozylovatelný cíl, který je s výhodou používán v způsobu detekce je protein histonu v jeho přirozené formě nebo z něho odvozený ekvivalent, který je možné poly-ADP-ribozylovat. Histonový preparát, dodávaný firmou Sigma (SIGMA, katalogové číslo. H-7755; histon typu II-AS z ovčího brzlíku, Luck, J. M. a kol., J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958), Satake K. a kol., J. Biol. Chem, 235, 2801 (1960)), byl použit jako příklad. V principu je možné použít všechny typy proteinů nebo jejich části, u kterých je možné provést poly-ADP-ribozylaci za pomoci PARP. Tyto jsou s výhodou jaderné proteiny, tj. histony, DNA polymeráza, telomeráza nebo samotná PARP. Syntetické peptidy odvozené z odpovídajících proteinů mohou také účinkovat jako cíl.

Pro ELISA detekci podle předloženého vynálezu možné použít množství histonů v rozmezí od okolo 0,1 µg/jamku do množství okolo 100 µg/jamku, s výhodou množství okolo 1 µg/jamku do okolo 10 µg/jamku. Množství PARP enzymu jsou v



rozmezí od okolo 0,2 pmol/jamku do množství okolo 2 nmol/jamku, s výhodou od okolo 2 pmol/jamku do okolo 200 pmol/jamku, reakční směs sestává v každém případě z množství 100 µg/jamku. Snížení na menší jamky a reakční objemy, které jsou odpovídacím způsobem menší, je možné.

Při HTRF detekci podle předloženého vynálezu jsou použita stejná množství PARP a množství histonu nebo modifikovaných histonů je v rozmezí od okolo 2 ng/jamku do okolo 25 µg/jamku, s výhodou od okolo 25 ng/jamku do okolo 2,5 µg/jamku, reakční směs sestává v každém případě z množství 50 µl/jamku. Snížení na menší jamky a reakční objemy, které jsou odpovídacím způsobem menší, je možné.

Používaný PARP aktivátor podle předloženého vynálezu je s výhodou aktivovaná DNA.

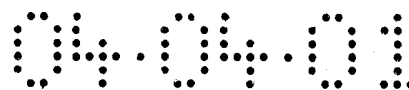
Různé typy poškozené DNA mohou fungovat jako aktivátor. DNA poškození může být vytvořeno natrávením DNázami nebo jinými DNA-modifikujícími enzymy (tj. restrikčními endonukleázami), iradiací nebo jinými fyzikálními způsoby nebo chemickým působením na DNA. Dále je možné simulovat situaci DNA poškození cíleným způsobem za použití syntetických oligonukleotidů. V pokusech uvedených jako příklad byla použita aktivovaná DNA z ovčího brzlíku (Sigma, produkt Číslo D4522; CAS: 91080-16-9, získaná způsobem, který popsali Aposhian a Kornberg za použití DNA z ovčího brzlíku (SIGMA D-1501) a deoxyribonukleázy typu I (D-4263). Aposhian H. V. a Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)). Aktivovaná DNA byla použita v oblasti koncentrací jdoucích od 0,1 do 1000 µg/ml, s výhodou

jdoucích od 1 do 100  $\mu\text{g/ml}$ , na reakční krok.

PolyADP ribozylační reakce v způsobu podle předloženého vynálezu, začne přidáním  $\text{NAD}^+$ . Koncentrace  $\text{NAD}$  byly v oblasti množství od okolo 0,1  $\mu\text{M}$  do okolo 10  $\text{mM}$ , s výhodou v oblasti množství od okolo 10  $\mu\text{M}$  do okolo 1  $\text{mM}$ .

PolyADP ribozylace cíle na nosiči je určena ve variantě výše uvedeného způsobu, která může být provedena heterogenně, za použití anti-poly(ADP-ribóza) protilátek. Aby toto bylo provedeno, je reakční směs oddělena od cíle na nosiči, promývána a inkubována s protilátkou. Tato protilátka může sama být označená. Nicméně, jako alternativa pro určení navázané anti-poly(ADP-ribóza) protilátky, může být použita sekundární označená protilátka nebo odpovídající označený fragment protilátky. Vhodná značení jsou například radioznačení, chromoforové značení nebo fluoroforové značení, navázání biotinu, chemiluminescenční značení, značení za pomoci paramagnetického materiálu nebo s výhodou enzymové značení, tj. křenovou peroxidázou. Odpovídající techniky detekce jsou známy odborníkům v oboru.

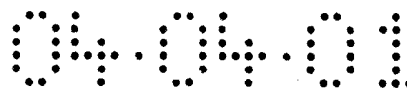
Ve variantě výše uvedeného procesu, který může být proveden homogenně je cíl, který není na nosiči, označen akceptorem fluoroforu. Cíl, který je s výhodou použit v tomto případě je histon, na který je navázán biotin, akceptor fluoroforu je navázán prostřednictvím avidinu nebo streptavidinu na biotinové skupiny histonu. Obzvláště vhodnými akceptory fluoroforu jsou fykobiliproteiny (tj. fykokyaniny, fykoerytriny), například R-fykokyanin (R-PC), alofyko-



kyanin (APC), R-fykoerytrin (R-PE), C-fykokyanin (C-PC), B-fykoerythrin (B-PE) nebo jejich kombinace s nějakým dalším z nich nebo s fluorescenčními barvivy jako jsou Cy5, Cy7 nebo Texasská červeň (Texas Red) (Tandem system) (Thammapalerd, N. a kol., Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health, 27(2): 297-303 (1996); Kronick, M. N. a kol., Clinical Chemistry, 29(9), 1582-1586 (1986); Hicks, J. M., Human Pathology, 15(2), 112-116 (1984)). Barvivo XL665 použité v příkladech je navázáno na alofykokyanin (Glazer, A. N., Rev. Mikrobiol., 36, 173-198 (1982); Kronick, M. N., J. Imm. Met., 92, 1-13 (1986); MacColl, R. a kol., FycobiliProteins, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987); MacColl, R. a kol., Arch. Biochem. Biophys., 208(1), 42-48 (1981)).

V homogenním způsobu je navíc dávana přednost určení polyADP ribozylace cíle, který není na nosiči, za použití anti-poly(ADP-ribóza) protilátek, které jsou označené donorem fluoroforu, který je schopný přenosu energie na akceptor fluoroforu, když jsou si donor a akceptor blízko v prostoru díky vazbě označené protilátky na polyADP-ribozylovaný histon. Europium kryptát je s výhodou použit jako donor fluoroforu pro anti-poly(ADP-ribóza) protilátku.

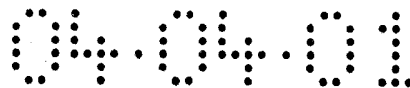
Kromě použitého europium kryptátu je také možné použít jiné sloučeniny jako potenciálních donorů molekul. Toto může ale vyžadovat modifikaci kryptátové mřížky. Je také možné si představit nahrazení europia jiným lantanidem jako je terbium. Je nutné, aby fluorescence trvala dlouho pro dosažení časového zpoždění (Lopez, E. a kol., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); US Patent 5,534,622).



Výše popsané způsoby detekce jsou založené na principu, spočívajícím na existující korelaci mezi PARP aktivitou a množstvím ADP-ribózových polymerů vytvořených na histonech. Zde popsaný pokus umožňuje kvantifikovat ADP-ribózové polymery za použití specifických protilátek při detekci pomocí ELISA a HTRF (homogenous time-resolved fluorescence). Specifické provedení testů s detekcí ELISA a HTRF je popsáno podrobněji v následujících příkladech.

Vyvolaný detekční systém HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) měří tvorbu poly(ADP-ribóz) na histonech za použití specifických protilátek. Na rozdíl od detekce pomocí ELISA je tato detekce provedena v homogenní fázi bez kroků separace a mytí. Tím se dojde k vyšší výkonnosti a menší možnosti vzniku chyb. HTRF je založeno na přenosu fluorescenční rezonanční energie (fluorescence resonance energy transfer) (FRET) mezi dvěma fluorofory. Ve FRET detekci může přenášet excitovaný donor fluoroforu svoji energii na akceptor fluoroforu, když jsou si jsou oba blízko jeden druhému v prostoru. V HTRF technologii je donor fluoroforu europium kryptát [(Eu)K] a akceptor je XL665, stabilizovaný alofykokyaninem. Použití europium kryptátu je založeno na studii Jean Marie Lehn (Strasbourg) (Lopez, E. a kol., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); US Patent 5,534,622).

V homogenní detekci jsou všechny komponenty také přítomny během měření. Zatímco toto představuje výhody pro provedení detekce (rychlost, komplexita), je nutné předem zamezit interferenci komponent detekce (inherentní fluorescence,



zhášení barvivy atd.). HTRF předem zamezí takové interferenci měřením s časovou prodlevou při dvou vlnových délkách (665 nm, 620 nm). HTRF se vyznačuje velmi dlouhým poločasem a měření s časovou prodlevou je proto možné. Není zde žádná interference pocházející z fluorescence pozadí s krátkou životností (tj. z detekčních komponent nebo inhibitorů knihovny látek). Navíc je měření vždy provedeno při dvou vlnových délkách za účelem kompenzace zhášecích efektů barevných látek. HTRF detekce může být provedena například v 96 nebo 384 jamkovém formátu mikrotitrační destičky a je vyhodnocena za použití detekčního analyzátoru HTRF mikrodestičky (Canberra Packard).

Vynález se také týká následujících *in vitro* prováděných screeningových způsobů na vazebné partnery PARP, obzvláště na PARP homolog podle předloženého vynálezu.

První varianta je provedena

- a1) imobilizací alespoň jednoho PARP homologu na nosič;
- b1) uvedením v kontakt imobilizovaného PARP homologu s analytem, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho vazebného partnera; a
- c1) určení, tam, kde je to vhodné po inkubační periodě, složek analytu navázaných k imobilizovanému PARP homologu.

Druhá varianta je provedena

- a2) imobilizací analytu na nosič, který sestává z alespoň jednoho možného vazebného partnera pro PARP homolog;
  - b2) uvedením v kontakt imobilizovaného analytu s alespoň jedním PARP homologem pro který je nalezen vazebný partner;
- a



c3) prohlédnutí imobilizovaného analytu, tam, kde je to vhodné po inkubační periodě, za účelem zjištění vazby PARP homologu.

Předložený vynález se také týká způsobů pro kvalitativní nebo kvantitativní určení nukleové kyseliny kódující PARP homolog, která sestává z

a) inkubace biologického vzorku s definovaným množstvím exogenní nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu (například o délce okolo 20 do 500 bází nebo delší), hybridizace, s výhodou za stringentních podmínek, určení hybridizace nukleových kyselin a tam, kde je to vhodné, porovnání se standartem; nebo

b) inkubace biologického vzorku s definovaným množstvím párů oligonukleotidových primerů se specificitou pro nukleovou kyselinu kódující PARP homolog, amplifikace nukleové kyseliny, určení amplifikačního produktu a tam, kde je to vhodné, porovnání se standartem.

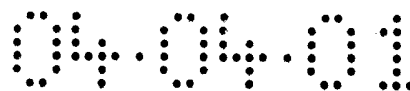
Předložený vynález se dále týká způsobu pro kvalitativní nebo kvantitativní určení PARP homologu podle předloženého vynálezu, která sestává z

a) inkubace biologického vzorku s alespoň jedním vazebným partnerem specifickým pro PARP homolog,

b) detekce komplexu vazebného partneru/PARP a tam, kde je to vhodné,

c) srovnání výsledku se standartem.

Vazebný partner je v tomto případě s výhodou anti-PARP



protilátka nebo jeho vazebný fragment, na který je navázaná detekovatelná značka, tam, kde je to vhodné.

Způsoby podle předloženého vynálezu pro určení PARP, obzvláště homologů PARP a sekvencí nukleových kyselin kódujících PARP, jsou vhodné a výhodné pro diagnózu poškození tkáně spojených se sepsí nebo s ischemií, jako jsou obzvláště mrtvice, srdeční infarkty, diabetes nebo septický šok.

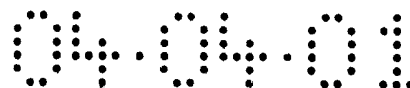
Předložený vynález se dále týká způsobu určení účinnosti PARP efektorů, která sestává z

- a) inkubace PARP homologu podle předloženého vynálezu s analytem, který obsahuje efektor fyziologické nebo patologické PARP aktivity; opětovného odstranění efektoru, tam, kde je to vhodné; a
- b) určení aktivity PARP homologu, je-li to vhodné, tak po přidání substrátů a kosubstrátů.

Předložený vynález se dále týká kompozic genové terapie, které obsahují ve vehikulu přijatelném pro genovou terapii konstrukt nukleové kyseliny, který

- a) obsahuje nukleovou kyselinu opačné polaroty vzhledem ke kódující nukleové kyselině podle předloženého vynálezu; nebo
- b) ribozym proti nekódující nukleové kyselině podle předloženého vynálezu; nebo
- c) kuje specifický PARP inhibitor.

Předložený vynález se dále týká farmaceutické kompozice

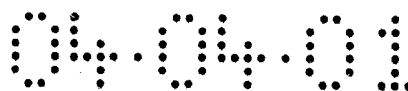


obsahující, ve farmaceuticky přijatelném vehikulu, alespoň jeden PARP protein podle předloženého vynálezu, alespoň jeden PARP vazebný partner podle předloženého vynálezu nebo alespoň jednu kódující nukleotidovou sekvenci podle předloženého vynálezu.

Konečně se předložený vynález týká použití vazebných partnerů PARP homologu pro diagnózu nebo terapii patologických stavů, při jejichž vývoji a/nebo postupu se účastní alespoň jeden PARP protein, s výhodou PARP homolog podle předloženého vynálezu nebo z něho odvozený polypeptid. Používaným vazebným partnerem může být například nízkomolekulární vazebný partner jehož molekulární hmotnost může být například menší než asi 2000 daltonů nebo menší než asi 1000 daltonů.

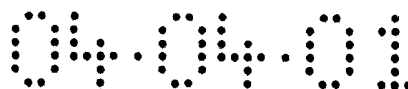
Předložený vynález se navíc týká použití PARP vazebných partnerů pro diagnózu nebo terapii patologických stavů, které mají původ v nedostatku energie. Nedostatek energie je pro účel předložené přihlášky vynálezu obzvláště deficit buněčné energie, který může být pozorován u pacienta nemocného systémově nebo v dané oblasti lidského těla, v orgánech nebo v oblastech orgánů nebo v tkáních nebo v oblastech tkání. Nedostatek energie je charakterizován NAD a/nebo ATP deplecí jdoucí za (nad nebo pod) fyziologické rozmezí rozptylu množství NAD a/nebo ATP a mediovanou proteinem s PARP aktivitou, obzvláště PARP homologem podle předloženého vynálezu nebo z něho odvozeným polyptidem.

Termín "nemoci mediované nedostatkem energie" sestává pro účel předložené přihlášky vynálezu navíc z nemocí, ve



kterých je poškození tkáně možné spojit s buněčnou smrtí, která má původ v nekróze nebo apoptóze. Způsoby podle předloženého vynálezu jsou vhodné pro léčbu a prevenci poškození tkáně, které vznikne z buněčného poškození, které má původ v nekróze nebo apoptóze; poškození nervové tkáně, které má původ v ischemii a/nebo reperfuzi; neurologické nemoci; neurodegenerativní nemoci; cévní mrtvici; pro léčbu a prevenci kardiovaskulárních nemocí; pro léčbu jiných nemocí nebo případy jako například s věkem spojená svalová degenerace, AIDS nebo jiné imunodeficity; artritida; ateroskleróza; kachexie; rakovina; degenerativní nemoci kosterních svalů; diabetes; lebeční trauma; zánětlivá onemocnění gastrointestinálního traktu jako například Crohnova choroba; svalová dystrofie; osteoartritida; osteoporóza; chronická a/nebo akutní bolest; selhání ledvin; ischemie sítnice; septický šok (jako například endotoxický šok); stárnutí kůže nebo povšechné stárnutí; obecné manifestace stárnutí. Způsoby podle předloženého vynálezu mohou být navíc použity pro prodloužení života a proliferativní kapacity buněk těla a pro senzitivizaci nádorových buněk ve spojení s radiační terapií.

Předložený vynález se obzvláště týká použití vazebného partneru PARP tak, jak je výše definováno pro diagnózu nebo terapii (akutní nebo profylaktickou) patologických stavů, které mají původ v nedostatku energie a jsou vybrány z neurodegenerativních nemocí nebo poškození tkáně, které vzniklo sepsí nebo ischemií, obzvláště neurotoxických poruch, mrtvic, sřečních infarktů, poškození, které vzniklo během nebo po lýze infarktu (například s TPA, Reteplase nebo mechanicky laserem nebo Rotablatorem) a



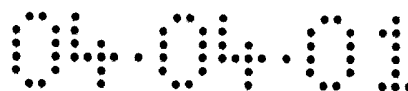
mikroinfarktů, které vznikly během a po výměně srdeční chlopně, aneuryzmatických resekcí a srdečních transplantátů, traumat hlavy a míchy, infarktů ledvin (akutní selhání ledvin, akutní renální nedostatečnost nebo poškození během a po transplantaci ledvin), poškození kosterního svalstva, infarktů jater (jaterní selhání, poškození během nebo po transplantaci jater), periferních neuropatií, s AIDS spojené demence, septických šoků, diabetu, neurodegenerativních nemocí, které nastanou po ischemii, traumatech (kranIOCerebrální trauma), masivních krvácení, subarachnoidálních krvácení a mrtvici, jakož i neurodegenerativních nemocí jako je Alzheimerova nemoc, multi-infarktová demence, Huntingtonova choroba, Parkinsonova nemoc, amyotrofická laterální skleróza, epilepsie, hlavně z celkových epileptických záchvatů jako jsou petit mal a tonoklonické záchvaty a parciálních epileptických záchvatů, jako jsou záchvaty temporálního laloku a komplexních parciálních záchvatů, selhání ledvin, také v chemoterapii nádorů a prevenci metastáz a pro léčbu zánětů a reumatických nemocí, například rheumatoidní artritidy; dále pro léčbu revaskularizace kriticky zužených koronárních tepen a kriticky zužených periferních tepen, například tepen dolních končetin.

Termínem "ischemie" se pro účely předložené přihlášky vynálezu myslí lokalizovaná nedostatečná dodávka kyslíku tkáni, která vznikla zábranou v toku tepenné krve. Celková ischemie vzniká, když je tok krve k celému mozku přerušen po omezenou dobu. Celková ischemie může být způsobena například srdeční zástavou. Fokální ischemie vzniká, když je část mozku odříznuta od svého normálního krevního

zásobení. Fokální ischemie může být způsobena tromboembolickým uzávěrem cévy, mozkovým traumatem, edémy nebo nádory mozku. I přechodná ischemie má široký rozsah neuronálního poškození. Přestože poškození "nervové tkáně" může vzniknout až za dny nebo týdny po začátku ischemie, jisté permanentní poškození (například buněčná smrt nekrotizací) vzniká v prvních několika minutách po zastavení krevního zásobení. Tato poškození je způsobeno například neurotoxicitou glutamátu a následující druhotnou reperfuzí, jako například tvorbou volných radikálů (například volných radikálů kyslíku, volných radikálů NO). Ischemie mohou podobně vzniknout v jiných orgánech a tkáních jako například v srdci (srdeční infarkt a jiná kardiovaskulární onemocnění, která vznikla okluzí koronárních tepen) nebo v oku (ischemie sítnice).

Předložený vynález se navíc týká použití účinného terapeutického množství PARP vazebného partnera pro ovlivnění neuronální aktivity. "Neuronální aktivita" je pro účely předložené přihlášky vynálezu může sestávat ze stimulace poškozených neuronů, promoce neuronální regenerace nebo léčby neuronálních nemocí.

Termín "neuronální poškození" pro účely předložené přihlášky vynálezu má význam každého typu poškození "nervové tkáně" a každého fyzikálního nebo mentálního poškození nebo smrti, které vzniknou z tohoto poškození. Příčina poškození může být například ve svém charakteru příčina metabolická, příčina toxická, příčina chemická nebo příčina tepelná a u příkladů je tvořena ischemiemi, hypoxiemi, traumaty, cerebrovaskulárním poškozením,



operacemi, tlakem, krvácením, iradiací, vazospazmy, neurodegenerativními nemocemi, infekcemi, epilepsií, percepčními nemocemi, poškozeným metabolismem glutamátu a druhotnými efekty, které jsou jimi způsobeny.

Termín "nervová tkáň" pro účely předložené přihlášky vynálezu má význam různých komponent tvořících nervový systém, skládajících se mimo jiné z neuronů, buněk glie, astrocytů, Schwannových buněk, cévního systému, který je uvnitř a který zasobuje centrální nervový systém, mozek, mozkový kmen, míchu, periferní nervový systém atd.

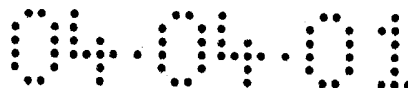
Termín "neuroprotektivní" pro účely předložené přihlášky vynálezu má význam redukce, zastavení, zpomalení nebo zlepšení neuronálního poškození a ochrany, obnovy a regenerace nervové tkáně, která byla exponovaná neuronálnímu poškození.

Termín "prevence neurodegenerativních nemocí" má význam možnosti prevence, zpomalení a zlepšení neurodegenerativní nemocí u lidí, u kterých taková nemoc byla diagnostikovaná nebo kteří spadají do rizikové skupiny těchto neurodegenerativních nemocí. Léčby u lidí, kteří již trpí symptomy těchto nemocí je obdobně brána na zřetel.

Termín "léčba" pro účely předložené přihlášky vynálezu má význam

(i) prevence nemoci, poruchy nebo stavu u lidí s predispozicí k uvedenému;

(ii) prevence nemoci, poruchy nebo stavu zpomalením postupu

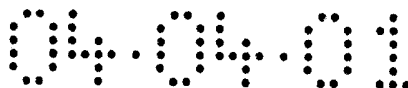


nemoci, poruchy nebo stavu; a

(iii) zlepšení nemoci, poruchy nebo stavu.

Příklady "neurologických nemocí", které mohou být léčeny způsoby podle předloženého vynálezu jsou neuralgie (trigeminální, glosfaryngeální), myastenia gravis, svalové dystrofie, amyotrofická laterální skleróza (ALS), progresivní svalová atrofie, periferní neuropatie, které vznikly otravou (například otravou olovem), Guillain-Barrého syndrom, Huntingtonova choroba, Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc nebo nemoci plexu. Způsoby podle předloženého vynálezu jsou s výhodou vhodné pro léčbu neurologických nemocí vybraných z periferních neuropatií, které vznikly fyzikálním poraněním nebo chorobou; lebečních traumat jako například traumatického poranění mozku; fyzikálního poškození míchy; mrtvice spojené s poškozením mozku, jako jsou cévní mrtvice spojené s hypoxií a poškozením mozku a mozkovým reperfučním poškozením; demyelinizačních onemocnění (myelopatie, Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza).

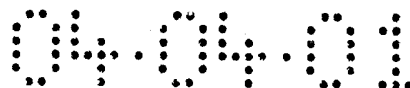
Způsoby podle předloženého vynálezu mohou být navíc použity pro léčbu kardiovaskulárních nemocí. Termín "kardiovaskulární nemoc" je pro účely předložené přihlášky vynálezu použit u nemocí, které působí ischemií nebo které jsou způsobeny ischemií nebo ischemií/reperfuzí srdce. Příklady jsou nemoci koronárních cév (například ateroskleróza), angina pectoris, srdeční infarkt, kardiovaskulární poškození, které je způsobeno srdeční



zástavou nebo operací přemostění koronární tepny (bypassu).

Způsoby podle předloženého vynálezu mohou být použity pro léčbu rakoviny nebo pro senzitivizaci rakovinných buněk na radiační terapii. Termín "rakovina" by měl být vykládán ve svém nejširším rozsahu. Modulátory proteinů podle předloženého vynálezu mohou být použity jako "protirakovinné terapeutické činidlo". Způsoby mohou být použity například pro léčbu typů rakoviny nebo nádorových buněk, jako jsou ACTH-produkující nádory, akutní lymfatické nebo lymfoblastické leukemie; akutní nebo chronická lymfocytární leukemie; akutní nelymfocytární leukemie; rakovina močového měchýře; nádory mozku; rakovina prsu; karcinom cervixu; chronická myelocytární leukemie; rakovina tlustého střeva; lymfom T dependentní zóny; endometrióza; rakovina jícnu; rakovina žlučníku; Ewingův sarkom; rakovina hlavy a krku; rakovina jazyka; Hodgkinův lymfom; Kaposiho sarkom; rakovina ledvin; rakovina jater; rakovina plic; mezoteliom; mnohočetný myelom; neuroblastom; ne-Hodgkinský lymfom; Hodgkinský lymfom; osteosarkom; karcinom ovárií; glioblastom; karcinom mléčné žlázy; karcinom cervixu; rakovina prostaty; rakovina; rakovina penisu, rakovina slinivky břišní; retinoblastom; rakovina kůže; rakovina žaluku; rakovina štítné žlázy; karcinom dělohy; karcinom pochvy; Wilmsův nádor; nebo trofoblastom.

Termíny "radiosenzitivizátor" nebo "radiační senzitivizátor" se pro účely předložené přihlášky vynálezu vztahují k molekulám, které zvyšují senzitivitu buněk v těle na záření elektromagnetickou radiací (například rentgenovy paprsky) nebo urychlují tuto radiační léčbu. Radiační senzitivizátory



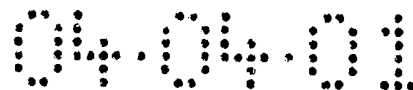
zvyšují senzitivitu rakovinných buněk k toxickým efektům elektromagnetické radiace. Ty, které jsou uvedené v literatuře sestávají z mitomycinu C, 5-bromo-deoxyuridinu a metronidazolu. Je možné použít záření vlnových délek v oblasti od  $10^{-20}$  do 10 metrů, s výhodou gama paprsků ( $10^{-20}$  do  $10^{-13}$  m), rtg-paprsků ( $10^{-11}$  do  $10^{-9}$  m), ultrafialového záření (10 nm do 400 nm), viditelného světla (400 nm do 700 nm), infračerveného záření (700 nm do 1 mm) a mikrovlnného záření (1 mm do 30 cm).

Nemoci, které mohou být léčeny takovou terapií, jsou obzvláště neoplastické choroby, benigní nebo maligní nádory a rakovina. Léčba jiných nemocí za použití elektromagnetického záření je také možná.

Předložený vynález bude nyní popsán detailně s odvoláním na přiložené obrázky, které znázorňují:

Obr. 1 sekvence lidského PARP (lidský PARP1) a dvou enzymů PARP, kterým je dáván přednost podle předloženého vynálezu (lidský PARP2, lidský PARP3, myší PARP3). Shody sekvencí mezi lidským PARP1 a lidským PARP2, lidským PARP3 nebo myším PARP3 jsou vyznačeny v rámečcích. Majoritní sekvence je vyznačena nad jednotlivými sekvencemi. Motivy zinkových prstů lidského PARP1 jsou umístěny v oblastech sekvencí odpovídajících aminokyselinovým zbytkům v polohách 21 až 56 a polohách 125 až 162;

Obr. 2 Northern bloty provedené s různými lidskými tkáněmi, aby ilustrovaly tkáňové rozložení PARP2 a PARP3 molekul podle předloženého vynálezu. Pruh 1: mozek; pruh 2: srdce;



pruh 3: kosterní sval; pruh 4: tlusté střevo; pruh 5: brzlík; pruh 6: slezina; pruh 7: ledviny; pruh 8: játra; pruh 9: tenké střevo; pruh 10: placenta; pruh 11: plíce; pruh 12: leukocyty pocházející z periferní krve; odpovídající pozice standartu délky nukleových kyselin (kb) jsou vyznačeny.

Obr. 3 Northern blot provedený s dalšími lidskými tkáněmi, aby ilustroval tkáňové rozložení PARP3 molekuly podle předloženého vynálezu. Pruh 1: srdce; pruh 2: mozek; pruh 3: placenta; pruh 4: plíce; pruh 5: játra; pruh 6: kosterní sval; pruh

-17-

7: ledviny; pruh 8: slinivka břišní; odpovídající pozice standartu délky nukleových kyselin (kb) jsou vyznačeny.

Obr. 4 Western blot provedený s různými lidskými tkáněmi, aby ilustroval tkáňové rozložení PARP3 molekuly podle předloženého vynálezu na úrovni proteinů. Pruh 1: srdce; pruh 2: plíce; pruh 3: játra; pruh 4: slezina; pruh 5: ledvin; pruh 6: tlusté střevo; pruh 7: sval; pruh 8: mozek; odpovídající pozice standartu délky proteinů (kD) jsou vyznačeny.

Obr. 5 Western blot provedený s různými lidskými tkáněmi, aby ilustrovaly tkáňové rozložení PARP3 molekuly podle předloženého vynálezu. Pruh 1: frontální kůra mozková; pruh 2: zadní kůra mozková; pruh 3: mozeček; pruh 4: hipokampus; pruh 5: bulbus olfactorius; pruh 6: striatum; pruh 7:

talamus; pruh 8: mezencefalón; pruh 9: entorinální kůra;  
pruh 10: most; pruh 11: medulla; pruh 12: mícha.

Obr. 6 je diagramatické vyobrazení PARP detekce (ELISA).

Obr. 7 je diagramatické vyobrazení PARP detekce (HTRF).

Další výhodná provedení předložené přihlášky vynálezu jsou popsány v následující sekci.

#### Homology PARP a funkční ekvivalenty

Pokud nebude uvedeno jinak, jsou pro účely předloženého popisu aminokyselinové sekvence uvedeny ve směru od N-konce. Pokud je používán jednopísmenkový kód pro aminokyseliny, potom G je glycin, A je alanin, V je valin, L je leucin, I je isoleucin, S je serin, T je threonin, D je asparagová kyselina, N je asparagin, E je glutamová kyselina, Q je glutamin, W je tryptofan, H je histidin, R je arginin, P je prolin, K je lysin, Y je tyrosin, F je fenylalanin, C je cystein a M je methionin.

Předložený vynález se neomezuje na homology PARP, které jsou výše specificky popsány. Naopak, ty homology, které jsou funkčními ekvivalenty jsou do předmětu vynálezu také zahrnuty. Funkční ekvivalenty sestávají jak z přirozených, jako například druhově-specifických nebo orgánově-specifických, tak uměle vytvořených variant proteinů, které jsou zde specificky popsány. Funkční ekvivalenty podle předloženého vynálezu se liší přidáním, substitucí, inverzí, inzercí a/nebo delecí jednoho nebo více

aminokyselinových zbytků lidského PARP2 (SEQ ID NO:2),

lidského PARP3 (SEQ ID NO: 4 a 6) a myšního PARP3 (SEQ ID:8 a 10), je zde alespoň zachovaná NAD-vazebná funkce proteinu, která je zprostředkovaná funkční katalytickou C-terminální doménou. Poly(ADP-ribóza)-syntetizující katalytická aktivita by měla podobně být s výhodou zachována. Funkční ekvivalenty také obsahují, tam, kde je to vhodné, ty varianty, ve kterých je v zásadě zachována oblast podobná leucinovému zipu.

Navíc je například možné, vycházejíce ze sekvence lidský PARP2 nebo lidský PARP3, aby se nahradily některé aminokyseliny těmi, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (objem, bazicitu, hydrofobicitu, atd.). Je například možné, aby zbytky argininu byly nahrazeny zbytky lyzinu, aby zbytky valinu byly nahrazeny zbytky isoleucinu nebo aby zbytky asparágové kyseliny byly nahrazeny zbytky glutámové kyseliny. Nicméně je také možné jednu nebo více aminokyselin vyměnit v sekvenci, přidat v sekvenci nebo odstranit ze sekvence nebo několik těchto kroků může být zkombinováno dohromady. Proteiny, které byly pozměněny touto cestou z lidských PARP2 nebo lidských PARP3 sekvencí mají alespoň 60 %, s výhodou alespoň 75 %, velmi výhodně alespoň 85 % homologie s počáteční sekvencí, vypočteno za použití algoritmu Pearson a Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Následující homologie byly určeny na úrovni aminokyselin a na úrovni DNA mezi lidským PARP1, PARP 2 a PARP 3 (FastA program, Pearson a Lipman, loc. cit.):

Aminokyselinová homologie:

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

Čísla v závorkách ukazují počet překrývajících se aminokyselin.

DNA homologie:

	Procentuální shoda	Procentuální shoda v PARP podpisu
PARP1/PARP2	60,81 % (467)	77,85 % (149)
PARP1/PARP3	58,81 % (420)	59,02 % (61)
PARP2/PARP3	60,22 % (269)	86,36 % (22)

Čísla v závorkách poukazují na počet překrývajících se nukleotidů.

Polypeptidy podle předloženého vynálezu mohou být seřazeny jako homologní poly(ADP-ribóza) polymerázy na základě vysoké míry shody v oblasti katalytické domény.

Pro předložený vynález je také důležité, že nové homology PARP nemají konvenční motivy zinkových prstů. Tato znamená, že tyto enzymy nejsou nutně účastny v DNA opravě nebo jsou

do té míry, že se liší od PARP1, ale jsou ještě schopné provést jejich patologický mechanismus (NAD<sup>+</sup> spotřebu a tak spotřebou energie, která je způsobena spotřebou ATP). Silná exprese proteinu, obzvláště PARP3, kterou je možno pozorovat na Western blotu vypovídá o významné roli v NAD spotřebě. Tato je obzvláště důležitá pro vývoj léku. Potenciální nové inhibitory polymeráz podle předloženého vynálezu mohou takto inhibovat patologické funkce bez toho, že by měly nepříznivé účinky na žádoucí fyziologické vlastnosti. Toto nebylo možné s inhibitory proti enzymům PARP známými do současnosti vzhledem k tomu, že zde byla vždy také inhibice DNA opravné funkce. Potenciálně mutagennímu účinku známých PARP inhibitorů je takto velmi lehké porozumět. Je také možné si vytvořit PARP inhibitory takové, že účinně inhibují všechny PARP homology s vysokou afinitou. V tomto případě je potenciováný účinek představitelný, tam, kde je to vhodné.

PARP homolog, kterému je dáván přednost podle předloženého vynálezu a který je ukázán v SEQ ID NO:2 (lidský PARP2), může být s výhodou izolován z lidského mozku, srdce, kosterního svalu, ledvin a jater. Expresa lidského PARP2 v jiných tkáních nebo orgánech je o poznání menší.

PARP homolog, kterému je dáván přednost podle předloženého vynálezu a který je ukázán v SEQ ID NO: 4 a 6 (lidský PARP3) může být s výhodou izolován z lidského mozku (v tomto případě velmi výhodně z hipokampu), ze srdce, z kosterního svalu, z jater nebo z ledvin. Expresa lidského PARP3 v jiných tkáních nebo orgánech, jako jsou sval nebo jater, je o poznání menší.

Zkušený pracovník, který je seznámen s izolací proteinů, bude používat kombinaci preparativních způsobů, které jsou nejvhodnější v každém případě pro izolaci přirozených enzymů PARP podle předloženého vynálezu, z tkání nebo rekombinantně připravených enzymů PARP podle předloženého vynálezu. Vhodný standart preparativních způsobů je popsán například v Cooper, T.G., Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin, New York nebo v Scopes, R. Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Předložený vynález se navíc týká PARP2 a PARP3 homologů, které, přestože mohou být izolovány z jiných eukaryotických druhů, například bezobratlých nebo obratlovců, hlavně jiných savců jako například myši, krys, koček, psů, prasat, ovcí, dobytka, koní nebo opic nebo z jiných orgánů jako jsou, například srdeční sval, mají hlavní strukturální a funkční vlastnosti určené enzymy PARP podle předloženého vynálezu.

Obzvláště lidský PARP2, který může být izolován z lidského mozku a jeho funkční ekvivalenty, jsou činidla, kterým je dáván přednost pro vývoj inhibitorů neurodegenerativních nemocí jako například mrtvic. Je jim dáván přednost pro vývoj inhibitorů neurodegenerativních nemocí, protože může být předpokládáno, že vývoj léku založený na PARP2 jako indikátoru umožňuje vývoj inhibitorů, které jsou optimalizovány pro použití na lidském mozku. Nicméně, nemůže být vyloučeno, že inhibitory vyvinuté na základě PARP2 mohou také být použity pro léčbu PARP-zprostředkovaných patologických stavů v jiných orgánech,

(viz tkáňové rozložení proteinů podle předloženého vynálezu).

PARP2 a pravděpodobně PARP3 jsou také, podobně jako PARP1, aktivované poškozením DNA, přestože asi pravděpodobně jiným mechanismem. Je možné si představit význam v DNA opravě. Zablokování enzymů PARP podle předloženého vynálezu by také bylo vhodné pro indikace jako jsou indikace na rakovinu (například u radiosenzitizace pacientů, kteří trpí nádorovým onemocněním).

Jiná hlavní biologická vlastnost enzymů PARP podle předloženého vynálezu a jejich funkčních ekvivalentů může být spatřena v jejich schopnosti vazby interagujícího partnera. Lidský PARP2 a 3 se liší od předtím objevených enzymů PARP vyšších eukaryotů, jako jsou obzvláště savci, obsahem potenciálních, tak zvaných motivů leucinových zipů. Tento je typickým motivem pro interakce protein-protein. Je možné, že tyto motivy dovolují pozměnění PARP aktivity interagujícího partnera. Tento dodatečný strukturální prvek takto také vytváří možný výchozí bod pro vývoj PARP efektorů jako například inhibitorů.

Předložený vynález se takto dále týká proteinů, které interagují s PARP2 a/nebo 3, s výhodou těch, které způsobují jejich aktivaci nebo inaktivaci.

Předložený vynález se dále týká proteinů, které mají ještě výše uvedenou ligand-vazebnou aktivitu a které mohou být připraveny cílenými modifikacemi ze specificky objevených aminokyselinových sekvencí.

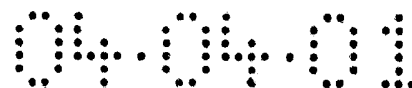
Je možné, počínaje z peptidové sekvence proteinů podle předloženého vynálezu, aby se vytvořily syntetické peptidy, které jsou použity, jako samotné nebo v kombinaci, jako antigeny pro tvorbu polyklonálních nebo monoklonálních protilátek. Také je možné použít PARP protein nebo fragmenty PARP proteinu pro tvorbu protilátek. Předložený vynález se takto také týká peptidových fragmentů PARP proteinů podle předloženého vynálezu, které obsahují charakteristické částečné sekvence, obzvláště těch oligopeptidů nebo polypeptidů, který obsahují alespoň jeden z výše uvedených sekvenčních motivů. Fragmenty tohoto typu mohou být získány například proteolytickým natrávením PARP proteinů nebo chemickou syntézou peptidů.

#### Nové specifické PARP2 a PARP3 vazebné partnery

Aktivní a s výhodou selektivní inhibitory proti proteinům podle předloženého vynálezu, byly vyvinuté za použití systému specifické detekce výše popsaném pro vazebné partnery PARP2 a PARP3. Tyto inhibitory mohou být také aktivní vzhledem k PARP 1.

Inhibitory získané podle předloženého vynálezu mají silnou inhibiční aktivitu vzhledem k PARP2. Hodnoty  $K_i$  mohou v tomto případě být menší než asi 1000 nM, jako menší než asi 700 nM, menší než asi 200 nM nebo menší než asi 30 nM, například okolo 1 do 20 nM.

Inhibitory podle předloženého vynálezu mohou mít také překvapivou selektivitu na PARP2. Toto je ukázáno pomocí



$K_i$ (PARP1):  $K_i$ (PARP2) poměru pro takové inhibitory podle předloženého vynálezu, který je například vyšší než 3 nebo vyšší než 5, jako například vyšší než 10 nebo vyšší než 20.

Příklad, který by měl být zmíněn je 4-(N-(4-hydroxyfenyl)aminometyl)-(2H)-dihydroftalazin-1-on.

Příprava tohoto a jiných analogů sloučenin může být provedena ve shodě s Puodzhynas a kol., Pharm. Chem. J. 1973, 7, 566 nebo Mazkanowa a kol., Zh. Obsahch. Khim., 1958, 28, 2798 nebo Mohamed a kol., Ind. J. Chem. B., 1994, 33, 769 které jsou zahrnuty jako reference.

Výše uvedená sloučenina ukazuje hodnotu  $K_i$  113 nM pro PARP2 a je osmkrát selektivnější pro PARP2 než pro PARP3.

Nukleové kyseliny kódující homology PARP:

Dokud nebude uvedeno jinak, nukleotidové sekvence jsou uvedeny v předloženém popisu ve směru od 5' do 3' konce.

Předložený vynález se dále týká sekvencí nukleových kyselin, která kódují výše uvedené proteiny, obzvláště ty, které obsahují aminokyselinovou sekvenci zobrazenou v SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 a 10, ale bez toho, že by na ni byla přihláška vynálezu omezena. Sekvence nukleové kyseliny, které mohou být použity podle předloženého vynálezu, také obsahují alelické varianty, které, jak je výše uvedeno pro aminokyselinovou sekvenci, je možné získat delecí, inverzí, inzercí, přidáním a/nebo substitucí nukleotidů, s výhodou nukleotidů zobrazených v SEQ ID NO: 1, 3, 7 a 9, ale s hlavním zachováním biologických vlastností a biologické

aktivity odpovídajících genových produktů. Nukleotidové sekvence, které mohou být použity jsou získány například nukleotidovou substitucí, která vytváří tiché (bez alterace aminokyselinové sekvence) nebo konzervativní změny aminokyseliny (výměna aminokyselin stejné velikosti, náboje, polarita nebo rozpustnosti).

Sekvence nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu také zahrnují funkční ekvivalenty genů, jako jsou eukaryotické homology například z bezobratlých, jako jsou *Caenorhabditis* nebo *Drosophila* nebo obratlovců, s výhodou ze savců, které jsou výše popsány. Geny, kterým je dáván přednost, jsou geny obratlovců, které kódují genový produkt, který má vlastnosti důležité pro předložený vynález, jak je výše uvedeno.

Nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu mohou být získány konvenční cestou různými cestami:

Například u genomické nebo cDNA knihovny může být proveden screening na DNA, která kóduje PARP molekulu nebo její část. Například, u cDNA knihoven získaných z lidského mozku, ze srdce nebo z ledvin může být proveden screening vhodnou sondou, jako například označeným jednovláknovým DNA fragmentem, který odpovídá částečné sekvenci vhodné délky vybrané z SEQ ID NO: 1 nebo 3 nebo sekvenci, která je k nim komplementární. Pro tento účel je možné například, aby fragmenty DNA knihovny, které byly přeneseny do vhodného klonujícího vektoru byly, po transformaci bakterie, která jimi byla provedena, nanášeny na agarové plotny. Klony mohou potom být přeneseny na nitrocelulózové filtry a po

denaturaci DNA být hybridizovány s označenou sondou. Pozitivní klony jsou potom izolovány a charakterizovány.

DNA kódující homology PARP podle předloženého vynálezu nebo parciální fragmenty mohou také být syntetizovány chemicky vycházejíce z informace o sekvenci, obsažené v předloženém vynálezu. Například je možné pro tento účel syntetizovat a následně ligovat oligonukleotidy o délce okolo 100 bazí způsobem známým *per se*, například získáním vhodných koncových míst, na kterých probíhá trávicí štěpení.

Nukleotidová sekvence podle předloženého vynálezu může také být připravena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (polymerase chain reaction). Během polymerázové řetězové reakce (PCR) je cílová DNA, jako například DNA z vhodného klonu plné délky, hybridizovaná s párem syntetických oligonukleotidových primerů, které jsou dlouhé okolo 15 bazí a které se váží k opačným koncům cílové DNA. Sekvenční sekce ležící mezi nimi je potom přepsána za pomoci DNA polymerázy. Repetice tohoto cyklu, které několikrát proběhnou, dovolují, aby byla cílová DNA amplifikována (viz White a kol.(1989), Trends Genet. 5, 185).

U sekvencí nukleových kyselin podle předloženého vynálezu se také pokládá za zřejmé, že obsahují přepsané sekvence, jednovláknové DNA nebo RNA sekvence kódující a nekódující, komplementární DNA sekvence, mRNA sekvence a cDNA, které jsou z nich odvozeny.

Předložený vynález dále zahrnují nukleotidové sekvence, které hybridizují s výše uvedenými sekvencemi s výhodou za

stringentních podmínek. Podmínky stringentní hybridizace existují pro účel předložené přihlášky vynálezu, když hybridizační sekvence mají homologii okolo 70 do 100 %, jako například okolo 80 do 100 % nebo 90 do 100 % (s výhodou v aminokyselinové sekci alespoň okolo 40, jako například okolo 50, 100, 150, 200, 400 nebo 500 aminokyselin).

Stringentní podmínky pro screening DNA, obzvláště cDNA knihovny, existují například, když je hybridizační směs promývána 0,1X SSC pufr (20X SSC pufr = 3M NaCl, 0,3M citrát sodný, pH 7,0) a 0,1 % SDS při teplotě okolo 60°C.

Northern blotové analýzy jsou prováděny s výhodou za stringentních podmínek 0,1X SSC, 0,1 % SDS například při teplotě okolo 65°C.

Deriváty nukleových kyselin a konstrukty exprese:

U sekvencí nukleových kyselin se předpokládá, že také sestávají z derivátů, jako jsou například promotorové varianty nebo varianty alternativního sestřihu. Promotory operativně vázané protisměrně vzhledem k nukleotidové sekvenci podle předloženého vynálezu, mohou navíc být pozměněny přidáním nebo přidáními nukleotidů nebo substitucí či substitucemi, inverzí či inverzemi, inzercí či inzercemi a/nebo delecí či delecemi, ale bez poškození funkce nebo aktivity promotorů. Promotory mohou mít také zvýšenu svoji aktivitu pozměněním své sekvence nebo být úplně vyměněny více účinnými promotory, dokonce i z heterologních organismů. Promotorové varianty, které jsou

výše popsané, jsou použity k přípravě exprese kazet podle předloženého vynálezu.

Specifické příklady sestřihových variant lidského PARP2, které mohou být zmíněny, jsou:

Varianta lidského PARP2a: Delecí párů bazí od páru bazí v poloze 766 až do páru bazí v poloze 904 (viz SEQ ID NO:1). Toto vede k posunu čtecího rámce s novým stop kodonem ("TAA" - odpovídající nukleotidům od polohy 922 až do polohy 924 v SEQ ID NO:1). Varianta lidského PARP2b: Inzerce 5'-gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg -3' za nukleotid v poloze 204 (SEQ ID NO:1). To zvětší aminokyselinovou sekvenci inzercí: GMPGRSWASXRVS

Pod deriváty nukleových kyselin se také mají na mysli varianty jejichž nukleotidové sekvence v oblasti od -1 do -1000 protisměrně vzhledem k start kodonu byly pozměněny tak, že genová exprese a/nebo exprese proteinu je zvýšena.

Kromě nukleotidové sekvence, která je výše popsána, mohou být použity konstrukty nukleových kyselin, které podle předloženého vynálezu obsahují ve funkční, operativní vazbě jednu nebo více jiných regulačních sekvencí, jako jsou promotory, amplifikační signály, enhancery, polyadenylační sekvence, začátky replikace, reportérové geny, marker geny, které je možné selektovat a podobně. Tato vazba může, v závislosti zamýšleném použití, vést k zvýšené nebo snížené genové expresi.

U přirozených regulačních sekvencí je možné navíc ještě k

novým regulačním sekvencím jejich přítomnost protisměrně vzhledem k aktuálním strukturálním genům. Tato přirozená regulace může tam, kde je to vhodné, být vypnuta genetickou modifikací a exprese genů zvýšena nebo snížena. Nicméně genový konstrukt může mít také jednodušší strukturu tak, že žádné přídatné regulační signály nejsou inzertovány protisměrně vzhledem ke strukturálním genům a že přirozený promotor se svojí regulací není odstraněn. Namísto toho je přirozená regulační sekvence mutována takovou cestou, že k regulaci již dále nedochází a genová exprese je zvýšena nebo snížena. Také je možné inzertovat dodatečné výhodné regulační prvky na 3' konec sekvence nukleových kyselin. Sekvence nukleových kyselin mohou být přítomny v jedné nebo více kopiích v genovém konstrukt.

Výhodné regulační sekvence pro způsoby exprese podle předloženého vynálezu jsou například přítomny v promotorech jako jsou *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *Ipp*, *lac*, *Ipp-lac*, *lacIq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SPS*, *l-PR* nebo *l-PL*, které jsou výhodně užívány v Gram-negativních bakteriích. Jiné výhodné regulační sekvence jsou přítomny například v Gram-pozitivních promotorech *amy* a *SPO2*, v kvasinkových promotorech *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* nebo rostlinných promotorech *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* nebo v promotoru ubiquitinu nebo promotoru fazeolinu.

V principu je možné použít všechny přirozené promotory s jejich regulačními sekvencemi. Také je možné a výhodné použít syntetických promotorů.

U zmíněných regulačních sekvencí je zamýšlené provést specificky expresi sekvence nukleových kyselin a expresi proteinu. Toto může znamenat například v závislosti na hostitelském organismu, že je gen exprimován nebo nadměrně exprimován pouze po indukci nebo že je ihned exprimován a/nebo nadměrně exprimován.

Regulační sekvence nebo faktory mohou navíc s výhodou mít pozitivní vliv na expresi a takto zvyšovat nebo snižovat expresi. Zesílení regulačních prvků se může výhodně konat na úrovni transkripce za použití silných transkripčních signálů, jako jsou promotory a/nebo enhancery.

Nicméně je také možné zesílit translaci například zlepšením stability mRNA.

Enhancerem se má na mysli například DNA sekvence, která způsobuje zvýšenou expresi cestou zlepšené interakce mezi RNA polymerázou a DNA.

Rekombinantní konstrukt nukleové kyseliny nebo genový konstrukt je pro expresi ve vhodném hostitelském organismu výhodně inzertován do vektoru specifického pro hostitele, který vytváří podmínky pro optimální expresi genů v hostiteli. Vektory jsou dobře známé zkušenému pracovníkovi a mohou být také nalezeny v "Cloning vectors" (Pouwels P. H. a kol., Ed., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Kromě plasmidů se vektorem myslí také všechny jiné vektory známé zkušenému pracovníkovi, jako jsou například fágy, viry, jako jsou viry SV40, CMV, bakulovirus a adenovirus, transpozony, IS prvky, plazmidy, kosmidy a lineární nebo

cirkulární DNA. Tyto vektory se mohou autonomně replikovat v hostitelském organismu nebo replikovat jako součást chromozomu.

Exprese genových konstruktů:

Výše popsané rekombinantní konstrukty podle předloženého vynálezu jsou výhodně vneseny do vhodného hostitelského systému a jsou exprimovány. Klonovací způsoby a transfekční způsoby, které jsou známé zkušenému pracovníkovi, jsou s výhodou použity za účelem vytvoření exprese zmíněných nukleových kyselin v daném systému exprese. Vhodné systémy jsou popsané například v Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel a kol., ed., Wiley Interscience, New York 1997.

Vhodné hostitelské organismy jsou v principu všechny organismy, které umožňují expresi nukleových kyselin podle předloženého vynálezu, jejich alelické varianty, jejich funkční ekvivalenty nebo deriváty nebo rekombinantní konstrukty nukleových kyselin. Hostitelským organismem se mají na mysli například bakterie, houby, kvasinky, rostlinné nebo zvířecí buňky. Organismům, kterým je dáván přednost jsou bakterie, jako jsou bakterie rodů Escherichia, jako například bakterie Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus nebo Pseudomonas, eukaryotické mikroorganismy jako jsou Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, vyšší eukaryotické buňky ze zvířat nebo rostlin, například Sf9 nebo CHO buňky.

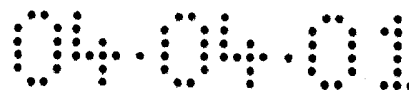
Genové produkty mohou být také exprimovány, pokud je to

požadováno, v transgenních organismech jako jsou transgenní zvířata, kterými jsou obzvláště myši, ovce nebo transgenní rostliny. Transgenní organismy mohou také být tak zvaná knock-outovaná zvířata nebo rostliny, ve kterých odpovídající endogenní gen byl vypnut, jako například mutací nebo parciální nebo úplnou delecí.

Kombinace hostitelského organismu a vektorů vhodných pro organismy, jako jsou plazmidy, viry nebo fágy, jako například plazmidy s RNA polymerázou/promotorovým systémem, fágy  $\mu$ ,  $\lambda$  nebo jiné temperované fágy nebo transpozony a/nebo jiných výhodných regulačních sekvencí, vytvářejí expresní systém. Termínem expresní systémy má s výhodou na mysli například kombinace savčích buněk, jako jsou CHO buňky a vektorů, jako je pcDNA3neo vektor, které jsou vhodné pro savčí buňky.

Jak je výše uvedeno, genové produkty mohou také být exprimovány výhodně v transgenních zvířatech, například myších, ovčích nebo transgenních rostlinách. Podobně je možné programovat bezbuněčné translační systémy s RNA odvozenými z nukleových kyselin.

Genový produkt může také být exprimován ve formě terapeuticky nebo diagnosticky vhodných fragmentů. Pro izolaci rekombinantních proteinů je možné a výhodné použít vektorové systémy nebo oligonukleotidy, které prodlužují cDNA některými nukleotidovými sekvencemi a takto kódují pozměněné polypeptidy, který slouží k ulehčení purifikace. Vhodné modifikace tohoto typu jsou například tak zvané smyčky (tags), které působí jako kotvy, jako například

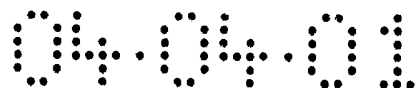


modifikace známá jako hexa-histidinová kotva nebo epitopy, které mohou být rozpoznány jako antigeny protilátkami (popsáno například v Harlow, E. a Pruh, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Tyto kotvy mohou být použity k uchycení proteinů na pevný nosič jako například na polymerovou matici, která může například být vložena do kolony na chromatografii nebo na mikrotitrační destičku nebo na jiný nosič.

Tyto kotvy mohou také být současně použity k rozpoznávání proteinů. Také je možné použít pro rozpoznání proteinů konvenční markery jako jsou fluorescenční barviva, enzymové markery, které tvoří reakční produkty po reakci se substrátem, které je možné detekovat nebo radioaktivní markery, samotné nebo v kombinaci s kotvami pro odvozování proteinů.

Produkce protilátek:

Anti-PARP2 protilátky jsou vytvořeny způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi. Protilátkami se mají na mysli jak polyklonální, tak monoklonální, lidské nebo polidštěné protilátky nebo fragmenty z protilátek, protilátky s jednoduchým řetězcem nebo také syntetické protilátky, podobně jako protilátkové fragmenty jako jsou Fv fragment, Fab fragment a F(ab')<sub>2</sub> fragment. Vhodné způsoby produkce jsou popsány například v Campbell, A.M., *Monoclonal Antibody Technology*, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford a v Breitling, F. a Dübel, S., *Rekombinante Antikörper* (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.



Další použití kódující sekvence:

Přítomná cDNA navíc vytváří základ pro klonování genomické sekvence nových PARP genů. Tato také obsahuje relevantní regulační nebo promotorovou sekvenci, která je k dispozici například sekvenací oblasti umístěné 5' směrem protisměrně cDNA podle předloženého vynálezu nebo umístěná v intronech genů. Informace cDNA sekvence je také základ pro tvorbu molekul, které mají opačnou polaritu nebo ribozymů, za pomoci známých způsobů (viz Jones, J.T. a Sallenger, B.A. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 902; Nellen, W. a Lichtenstein, C. (1993) TIBS, 18, 419). Genomická DNA může být podobně použita k tvorbě genových konstruktů, které jsou výše popsány.

Jinou možností použití nukleotidových sekvencí nebo částí nukleotidových sekvencí je tvorba transgenních zvířat. Transgenní nadměrně zvýšená exprese nebo genetický knock-out informace v sekvenci ve vhodném zvířecím modelu může dále poskytnout cenné informace, které se týkají (pato)fyziologie nových genů.

Terapeutické aplikace:

V případech, kdy je převládající nedostatek proteinu podle předloženého vynálezu, je možné použít několik způsobů pro nahrazení proteinu. Na jednu stranu může být protein, přirozený nebo rekombinantní, podáván přímo nebo cestou genové terapie ve formě jeho kódující nukleové kyseliny (DNA nebo RNA). Je proto možné použít jakýkoli vhodný

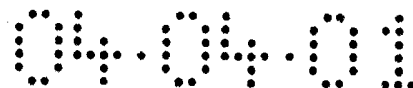
vektor, například jako virová a neviróvá vehikula. Vhodné způsoby jsou popsány například Straussem a Barrangerem v *Concepts in Gene Therapie* (1997), Walter de Gruyter, Publ. Jiných alternativ je docíleno stimulací endogenního genu prostřednictvím vhodného agens.

Také je možné blokovat obrat nebo inaktivaci enzymů PARP podle předloženého vynálezu, například proteázami. Konečně mohou být použity inhibitory nebo agonisté enzymů PARP podle předloženého vynálezu.

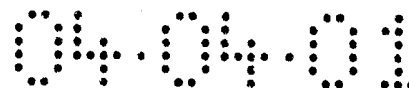
V situacích, kdy je PARP přítomno v nadbytku nebo je PARP nadměrně aktivován, mohou být použity různé typy inhibitorů. Tato inhibice může být docílena jak molekulami, které mají opačnou polaritu, ribozymy, oligonukleotidy nebo protilátkami, tak i nízkomolekulárními sloučeninami.

Aktivní látky podle předloženého vynálezu, tj. PARP proteiny, nukleové kyseliny a PARP vazebné partnery, jako jsou například protilátky nebo modulátory, mohou být podávány buď jako jednoduché terapeuticky aktivní látky nebo jako směsi s jinými terapeuticky aktivními látkami. Mohou být podávány jako takové, ale obecně jsou podávány ve formě farmaceutických kompozic, tj. jako směsi aktivní látky nebo látek s alespoň jedním vhodným farmaceutickým nosičem nebo ředidlem. Aktivní látky nebo kompozice mohou být podávány jakýmkoli vhodným způsobem pro daný terapeutický účel, například ústy nebo parenterálně.

Povaha farmaceutických kompozic a farmaceutického nosiče nebo ředidla je závislá na požadovaném způsobu podávání.



Kompozice, které jsou podávány ústy mohou být například ve formě tablet nebo kapsulí a mohou obsahovat obvyklé excipienty jako jsou pojidla (například sirup, akácie, želatina, sorbitol, kozinec nebo polyvinylpyrolidon), objemová činidla (například laktózu, cukr, obilný škrob, fosforečnan vápenatý, sorbitol nebo glycin), lubrikační činidla (například stearát hořečnatý, talek, polyetylen glykol nebo oxid křemičitý), disintegrační činidla (například škrob) nebo zvlhčovací činidla (například laurylsulfát sodný). Produkty, které jsou podávány ústy ve formě tekutin jsou ve formě vodních nebo olejových suspenzí, roztoků, emulzí, sirupů, elixírů nebo sprejů atd. nebo mohou být ve formě suchých prášků, ke kterým je přidána voda nebo jiný vhodný nosič. Tekuté produkty těchto typů mohou obsahovat konvenční aditiva, například suspenzní činidla, esence, ředidla nebo emulzifikátory. Pro parenterální podání je možné použít roztoky nebo suspenze s konvenčními farmaceutickými nosiči. Parenterální podání aktivních látek podle předloženého vynálezu se uskutečňuje s výhodou za použití tekutých farmaceutických kompozic, které mohou být podávány parenterálně, obzvláště intravenózně. Tyto s výhodou obsahují účinné množství alespoň jedné aktivní látky, s výhodou v rozpuštěné formě, ve farmaceuticky přijatelném nosiči vhodném pro tento účel. Příklady farmaceutických nosičů vhodných pro tento účel jsou obzvláště vodné roztoky, jako například fyziologický roztok, solný roztok ve fosfátovém pufru, Ringerův roztok, Ringerův roztok laktátu a tak podobně. Kompozice může navíc obsahovat dodatečné látky, jako jsou antioxidanty, chelatační činidla nebo antimikrobiální činidla.

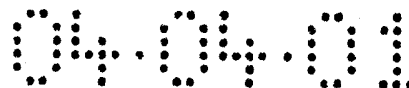


V každém případě je volba dávkování aktivní látky podle předloženého vynálezu a časové rozložení jednotlivých dávek závislé na rozhodnutí ošetřujícího lékaře. Ošetřující lékař vybere vhodnou dávku a vhodné časové rozložení dávkování v závislosti na zvolené cestě podávání, v závislosti na účinnosti léku v jednotlivých případech, v závislosti na povaze a závažnosti stavu nemoci, které má být léčena a v závislosti na stavu pacienta a jeho odpovědi na terapii. Farmakologicky aktivní látky mohou takto například být podávány savci (člověk nebo zvíře) v dávkách okolo 0,5 mg do okolo 100 mg na kg tělesné hmotnosti a den. Mohou být podávány v jednoduché dávce nebo v několika dávkách.

Neterapeutické aplikace:

Nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu, jako například cDNA, genomická DNA, promotor a polypeptid a jejich parciální fragmenty mohou také být užívány v rekombinantní nebo nerekombinantní formě pro vývoj různých testových systémů.

Například je možné vytvořit testový systém, který je vhodný pro měření aktivity promotoru nebo proteinu v přítomnosti testované látky. Způsoby měření v tomto případě jsou s výhodou jednoduché, například kolorimetrické způsoby, luminometrické způsoby, fluorimetrické způsoby, imunologické způsoby nebo radioaktivní způsoby a umožňují s výhodou rychlé měření velkého množství testované látky. Testy tohoto typu jsou vhodné a výhodné pro tak zvaný vysokovýkonostní screening. Tyto testové systémy umožňují u testovaných látek stanovit jejich vazbu k proteinům nebo



jejich agonismus proteinů, antagonismus proteinů nebo inhibici proteinů podle předloženého vynálezu.

Určení množství, aktivity a distribuce proteinů podle předloženého vynálezu nebo jejich podkladové mRNA v lidském těle může být použito pro diagnózu, pro určení predispozice a monitorování některých nemocí. Sekvence cDNA a genomické sekvence mohou podobně dále poskytnout informace týkající se genetických příčin a predispozicí k některým nemocím. Je možné použít pro tento účel DNA/RNA sond a protilátek širokého souboru různých typů. Nukleotidové sekvence podle předloženého vynálezu nebo části nukleotidových sekvencí mohou dále být použity ve formě vhodných sond pro detekci bodových mutací, delecí nebo inzercí.

Proteiny podle předloženého vynálezu mohou dále být použity k identifikaci a izolaci jejich přirozených ligandů nebo interagujících partnerů. Proteiny podle předloženého vynálezu mohou být navíc použity k identifikaci a izolaci umělých nebo syntetických ligandů. Pro tento účel rekombinantně připravený nebo purifikovaný přirozený protein může být odvozen takovou cestou, že vzniknou modifikace, který dovolí vazbu k nosičovým materiálům. Proteiny navázané touto cestou mohou být inkubovány s různými analyty, jako například proteinovými extrakty nebo peptidovými knihovnami nebo jinými zdroji ligandů. Specificky navázané peptidy, proteiny nebo nízkomolekulární neproteinové látky mohou být izolovány a charakterizovány touto cestou. Neproteinovými látkami se mají na mysli například nízkomolekulární chemické látky, který mohou vzniknout například z klasické syntézy léků nebo z tak



zvané látkové knihovny, které byly syntetizovány kombinatoricky.

Použité proteinové extrakty jsou odvozeny například z homogenátů rostlin nebo částí rostlin, mikroorganismů, lidských nebo zvířecích tkání nebo orgánů.

Ligandy nebo interagující partneři mohou také být určeni způsoby jako je kvasinkový dvou-hybridní systém (Fields, S. a Song, O. (1989) Nature, 340, 245). Expresivní banky, které mohou být použity v tomto případě, mohou být odvozeny například z lidských tkání, jako například z mozku, ze srdce, z ledvin atd.

Sekvence nukleových kyselin podle předloženého vynálezu a proteiny kódované sekvencemi nukleových kyselin mohou být použity pro vývoj reagensů, agonistů a antagonistů nebo inhibitorů pro diagnózu a terapii chronických a akutních nemocí spojených s expresí nebo aktivací jedné z proteinových sekvencí podle předloženého vynálezu, takové jako například se zvýšenou nebo sníženou expresí proteinových sekvencí. Vyvinuté reagensie, agonisté, antagonisté nebo inhibitory mohou následně být použity pro tvorbu farmaceutických přípravků pro léčbu nebo diagnózu nemocí. Příklady možných nemocí v této souvislosti jsou nemoci mozku, nemoci periferního nervového systému, nemoci kardiovaskulárního systému nebo nemoci oka, septický šok, reumatoidní artritida, diabetes, akutní selhání ledvin nebo rakovina.

Relevance proteinů podle předloženého vynálezu, pro zmíněné

indikace byla ověřena za použití specifických inhibitorů u relevantních zvířecích modelů.

### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady dále ilustrují podrobně předložený vynález.

#### Příklad 1: Izolace PARP2 a PARP3 cDNA

Přítomné cDNA sekvence byly nalezeny poprvé při sekvenční analýze cDNA klonů cDNA knihovny z lidského mozku (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, # HL3002a, Clontech). Myši PARP3 klony byly izolovány z "lambda triplex cDNA knihovny myšního mozku" (Clontech katalogové číslo ML5004t). Sekvence těchto klonů jsou popsány v SEQ ID NO: 1, 3, 7 a 9.

#### Příklad 2: Exprese PARP2 a PARP3 lidských tkání

Exprese lidského PARP2 a lidského PARP3 byla zkoumaná u dvanácti lišících se lidských tkání pomocí analýzy Northern blot. Mnohočetný Northern blot lidských tkání (Human Multiple Tissue Northern Blot) (MTN™) dodávaný Clontech (#7760-1 a #7780-1) byl hybridizován pro tento účel s RNA sondou. Sonda byla vytvořena *in vitro* transkripcí odpovídajících cDNA lidského PARP2 a lidského PARP3 v přítomnosti digoxigeninem označených nukleotidů ve shodě se způsobem podle výrobce (Boehringer Mannheim DIG Easy Hyb katalogové číslo 1603 558, DIG Easy Hyb způsob pro RNA:RNA hybridizaci). Protokol byl pozměněn provedením

prehybridizace: 2x1 hodina s přidáním DNA ze sledího sperma (10 mg/ml hybridizačního roztoku). Hybridizace potom proběhla přes noc s přidáním DNA z sledího sperma (10 mg/ml hybridizačního roztoku). Proužky byly detekovány za použití CDP-Star protokolu (Boehringer Mannheim CDP-StarN katalogové číslo 1685 627).

Po stringentním mytí byl transkript PARP2 hlavně detekován v lidském mozku, v srdci, v kosterním svalu, v ledvinách a v játrech. Transkript velikosti okolo 1,9 kb odpovídá délce určené cDNA (1,85kb) (viz Obr. 2(A)).

V jiných tkáních nebo orgánech je exprese lidského PARP2 znatelně slabší.

Po stringentním mytí byl transkript PARP3 hlavně detekován v srdci, v mozku, v ledvinách, v kosterním svalu a v játrech. Exprese v jiných tkáních (placenta, plíce, slinivka břišní) je o poznání menší (viz Figura 2(B)). Existují alespoň 2 transkripty lidského PARP3, které mohou pravděpodobně být vysvětleny lišícím se místem polyadenylace nebo alternativním sestřihem. Jejich velikosti (okolo 2,2 kb a 2,5 kb respektive) odpovídají délce určené cDNA (2,3kb). Mytí bylo provedeno za použití 0,2 x SSC/0,2 % SDS při teplotě prostředí po dobu 2 x 15 minut a potom za použití 0,1 x SSC/0,1 % SDS při teplotě 65°C po dobu 2 x 15 minut (připravený z 20X SSC: 3M NaCl, 0,3M citrát sodný, pH 7,0).

Příklad 3: Produkce protilátek

Byly vytvořeny specifické protilátky proti proteinům podle předloženého vynálezu. Tyto specifické protilátky byly užívány mezi jiným pro analýzu tkáňového rozložení na úrovni proteinů PARP2 a PARP3 imunoblotingovou (Western blot) analýzou. Příklady produkce takových protilátek jsou uvedeny níže.

Následující peptidy byly připraveny syntézou pomocí způsobu pro výrobu protilátek, který je známý zkušenému pracovníkovi. V některých případech byl cysteinový zbytek připevněn na N nebo C konec sekvence za účelem ulehčení párování k KLH ("keyhole limpet hemokyanin").

PARP-2: NH<sub>2</sub>-MAARRRSTGGGRARALNES-CO<sub>2</sub>H (aminokyseliny v poloze 1 až 20; SEQ ID NO: 23)

NH<sub>2</sub>-KTELQSPHPLDQHYRNLHC-CO<sub>2</sub>H (aminokyseliny v poloze 335 až 353; SEQ ID NO: 24)

PARP-3: NH<sub>2</sub>-CKGRQAGREEDPFRSTAEALK-CO<sub>2</sub>H (aminokyseliny v poloze 25 až 44 SEQ ID NO: 25)

NH<sub>2</sub>-CKQIARGFEALEALEEALK-CO<sub>2</sub>H (aminokyseliny v poloze 230 až 248; SEQ ID NO: 26)

Produkce anti-PARP3 protilátky je popsána jako modelový příklad.

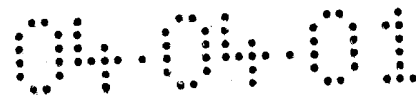
Polyklonální protilátky proti lidskému PARP3 byly získány z králíka za použití syntetického peptidu majícího peptidovou sekvenci H<sub>2</sub>N-KQIARG-FEALEALEEALK-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO: 27) (aminokyseliny v poloze 230 až 248 lidské PARP3 proteinové sekvence). Odpovídající myší sekvence se liší v této oblasti pouze jednou aminokyselinou (H<sub>2</sub>N-

KQQIARGFEALEALEEAMK-CO<sub>2</sub>H; SEQ ID NO: 28). Cystein byl také připevněn na N-konec, aby proteinu umožnil se párovat s KLH.

Zajíci byly imunizováni celkově pětkrát, v intervalech 7 až 14 dnů konjugátem KLH-peptid. Antisérum bylo získáno afinně-purifikované za použití antigenu. Specifická IgG protilátková frakce byla izolována ze séra za použití odpovídajících peptidů, které byly pro tento účel nejprve imobilizovány na afinní koloně způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi. Odpovídající antiséra byla vložena do této afinní kolony a nespecificky nasorbované proteiny byly vymyty puřrem.

Specificky navázaná IgG protilátková frakce byla vymyta pomocí 0,2 M glycin/HCl puřr pH 2,2. pH bylo ihned zvýšeno za použití 1M TRIS/ HCl puřru pH 7,5. Eluát obsahující IgG protilátkovou frakci byl smísen 1:1 (objemově) s nasyceným roztokem síranu amonného a inkubován při teplotě +40šC po dobu 30 minut až do úplné precipitace. Vzniklý precipitát byl centrifugován při 10 000 g a po odstranění supernatantu rozpuřtěn v minimálním množství PBS/TBS. Vzniklý roztok byl potom dialyzován proti PBS/TBS v poměru 1:100 (objemově). Protílátky byly upraveny na koncentraci okolo 100 μg IgG protílátky/ml. PARP3 protílátky purifikované touto cestou měly vysokou specificitu pro PARP3. Přestože myší PARP3 byl rozpoznány dobře, neproběhla zkřížená reakce s PARP1 nebo PARP2, kterou by bylo možno pozorovat.

Příklad 4: Analýza tkáňového rozložení imunoblotingovou analýzou (Western blot)



Tkáňové rozložení na úrovni proteinů bylo také zkoumáno pro PARP2 a PARP3 imunoblotingovou analýzou (Western blot).

Příprava myších tkání pro proteinové gely:

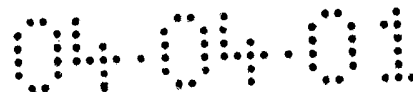
Tkáňe nebo buňky byly homogenizované za použití Potteru nebo Ultra-Turraxu. Pro homogenizaci 0,5 g tkáňe (nebo buněk) bylo inkubováno v 5 ml pufru (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl<sub>2</sub>), jedna tableta koktailu proteázového inhibitoru (Boehringer Mannheim, katalogové číslo: 1836153) a benzonáza (stupeň čistoty I, MERCK) při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Tkáňové vzorky z myši byly vytvořeny ze srdce, z plic, z jater, z sleziny, z ledvin, z tenkého střeva, ze svalů, z mozku a z lidských embryonálních buněk ledvin (HEK293, lidské embryonální ledviny).

Proteinové gely:

NUPAGE systém dodávaný společností NOVEX byl použit ve shodě s instrukcemi pro proteinové gely. Byly použity polyakrylamidové gely (NuPAGE 4-12 % BisTris, NOVEX NP 0321), pracovní pufr (MES-Running pufr, NOVEX NP 0002), antioxidant (NOVEX NP 0005), protein standartní velikosti (Multi Mark Multi Colored Standard, NOVEX LC 5725), pufr pro vzorek (NuPAGE LDS Sample pufr (4X), NOVEX NP 0007). S gely bylo pracováno po dobu 45 minut při napětí 200 V.

Western blot:

Western bloty byly provedeny za použití NOVEX systému ve

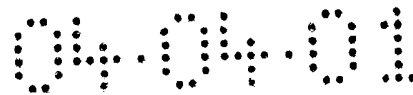


shodě s instrukcemi. Byla použita nitrocelulózová membrána (nitrocelulóza s póry o velikosti 45  $\mu\text{m}$ , NOVEX LC 2001). Přenos probíhal po dobu 1 hodiny za působení proudu velikosti 200 mA. Pufř pro přenos se skládal z 50 ml koncentrátu pufřu pro přenos (NOVEX NP 0006), 1 ml antioxidantu (NOVEX NP 0002), 100 ml metanolu analytické stupnice a 849 ml dvakrát destilované vody.

Kromě blotů vytvořených touto cestou byly také použity předem vytvořené bloty, například od Chemicon (blot myšího mozku, Chemicon, katalogové číslo: NS 106 s tkáněmi 1. frontální kůra mozková, 2. zadní kůra mozková, 3. mozeček, 4. hippocampus, 5. bulbus olfaktorius, 6. striatum, 7. talamus, 8. mezencefalón, 9. entorhinální kůra mozková, 10. most, 11. medulla, 12. mícha).

Prottilátková reakce s PARP3:

Western bloty byly blokovány v TBST (TBS + 0,3 % Tween 20) s 5 % práškem sušeného mléka po dobu alespoň 2 hodin (TBS: 100 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl). Prottilátková reakce s primární prottilátkou (ředění 1:1000) proběhlo v TBST s 5 % práškem sušeného mléka (viz výše) při teplotě prostředí, po dobu alespoň 2 hodin nebo při teplotě 4 $\text{°C}$  přes noc, za mírného míchání (vertikální rotátor). Prottilátková reakce byla následována mytím, které proběhlo třikrát, v TBST po dobu 5 minut. Inkubace s druhotnou prottilátkou (anti-králičí IgG prottilátky, s navázanou peroxidázou, SIGMA A-6154, ředění 1:2000) proběhlo v TBST s 5 % práškem sušeného mléka po dobu jedné hodiny. Inkubace s druhotnou prottilátkou byla následována mytím, které proběhlo třikrát,



po dobu 5 minut, po každé stejným způsobem jako je výše uvedeno. Následná detekce byla založena na chemiluminescenci za použití SUPER BLAZE kitu (Pierce, Signal BLAZE Chemiluminescent substrate 34095) podle způsobu uvedeném výrobcem. Byl použit "Lumi-Film" (Chemiluminescenční Detekční Film, Boehringer katalogové číslo: 1666916). Filmy byly vyvolávané po dobu asi 2 minut (vyvolávací koncentrát pro rentgenové záření, ADEFO-Chemie GmbH), hydratované, fixované po dobu asi 4 minut (Acidofix 85 g/l /AGFA), hydratované a potom sušené.

#### Příklad 5: Příprava enzymů

Lidská PARP1 byla pro srovnání exprimována rekombinantně bakulovirovým systémem způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi a částečně purifikována popsáním způsobem (Shah a kol., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13). Hovězí PARP1 o čistotě 30-50 % ( $c=0,22$  mg/ml, specifická aktivita 170 nmol ADP-ribóz/min/mg celkového proteinu při teplotě 25°C) byla zakoupen u BIOMOL (katalogové číslo SE-165). Lidské a myší PARP2 a PARP3 byly exprimovány rekombinantně v bakulovirovém systému (Bac-to-Bac systém, BRL LifeScience). Pro tento účel byly vhodné cDNA klonovány v pFASTBAC-1 vektoru. Příprava rekombinantní bakulovirové DNA rekombinací v *E. coli* byla následována transfekcí hmyzích buněk (Sf9 nebo High-Five) vhodnými rekombinantními bakulovirovými DNA. Expres odpovídajících proteinů byla ověřena Western blotovou analýzou. Virové kmeny byly amplifikovány způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi. Větší množství rekombinantních proteinů bylo získáno infekcí 500 ml kultury hmyzích buněk (2 x 10<sup>6</sup>

buněk/ml) s viry v MOI (multiplicita infekce; poměr virů k buňkám) nabývajícími hodnotu 5-10 a inkubací probíhající po dobu 3 až 4 ddnů. Hmyzí buňky byly potom peletovány centrifugací a proteiny byly purifikované z peletu.

Purifikace proběhla způsobem klasické proteinové purifikace známými zkušenému pracovníkovi, detekce enzymů proběhla vhodnými specifickými protilátkami. V některých případech, byly proteiny také afinně-purifikovány na 3-aminobenzamidové afinní koloně známým způsobem (Burtscher a kol., Anal Biochem 1986, 152:285-290). Čistota přeshovala 90 %.

Příklad 6: Detekční systémy pro určení aktivity PARP2 a PARP3 a inhibiční účinek efektorů na PARP1, PARP2 a PARP3.

a) Produkce protilátek proti poly(ADP-ribóze)

Je možné použít poly(ADP-ribózu) jako antigen pro tvorbu anti-poly(ADP-ribóza) protilátek. Produkce anti-poly(ADP-ribóza) protilátek je popsána v literatuře (Kanai, Y. a kol. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 59:1, 300-306; Kawamitsu, H. a kol. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai, Y. a kol. (1978) Immunology 34, 501-508).

Byly mezi jiným použity následující protilátky: anti-poly(ADP-ribóza) protilátky (polyklonálního králičího antiséra), BIOMOL; katalogové číslo SA-276, anti-poly(ADP-ribóza) protilátky (monoklonální, myší; klon 10H; hybridomový supernatant, afinně-purifikovaný).

Antiséra nebo monoklonální protilátky získané ze supernatantu hybridomu byly purifikovány proteinem afinní chromatografií způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi.

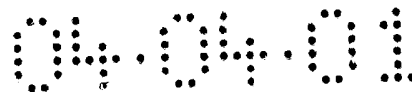
b) ELISA

Pomůcky:

ELISA barevné reagens: TMB mix, SIGMA T-8540

96 jamková mikrotitrační destička (FALCON Mikro-Test IIITM Flexible Assay Plate, # 3912) byla povlečena histony (SIGMA, H-7755). Histony byly pro tento účel rozpuštěny v karbonátovém pufru (0,05M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>; pH 9,4) o koncentraci of 50 µg/ml. Jednotlivé jamky mikrotitrační destičky byly každá inkubovaná s objemem 150 µl tohoto roztoku histonů při teplotě prostředí po dobu alespoň 2 hodin nebo při teplotě 4°C přes noc. Jamky byly potom blokovány přidáním 150 µl 1 % BSA roztoku (SIGMA, A-7888) v karbonátovém pufru při teplotě prostředí po dobu 2 hodin. Toto bylo následováno třemi kroky mytí mycím puftrem (0,05 % Tween10 v 1x PBS; PBS (Fosfátový solný roztok; Gibco, katalogové číslo 10010): 0,21 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 g/l NaCl, 0,726 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O, pH 7,4). Kroky mytí byly všechny provedeny v mycím zařízení mikrotitračních destiček ("Columbus", mycí zařízení mikrotitračních destiček, SLT-Labinstruments, Rakousko).

Pro enzymatickou reakci byly požadovány roztoky pro enzymatickou reakci a roztok substrátu, v každém případě



jako již předem připravená směs. Absolutní množství těchto roztoků záleželo na očekávaném počtu detekčních jamek.

Složení roztoku pro enzymatickou reakci na jamku:

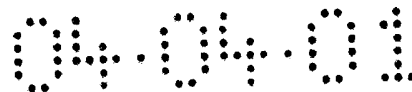
- 4  $\mu$ l PARP reakčního pufru (1M Tris-HCl pH 8,0, 100mM  $MgCl_2$ , 10mM DTT)
- 20 ng PARP1 (lidská nebo hovězí) nebo 8 ng PARP2 (lidská nebo myší)
- 4  $\mu$ l aktivané DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)
- $H_2O$  do objemu 40  $\mu$ l

Složení roztoku substrátu na jamku:

- 5  $\mu$ l PARP reakčního pufru (10x)
- 0,8  $\mu$ l NAD roztoku (10mM, SIGMA N-1511)
- 44  $\mu$ l  $H_2O$

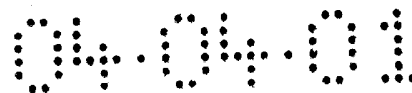
Inhibitory byly rozpuštěny v 1x PARP reakčním pufru. DMSO, který byl příležitostně použit pro rozpuštění inhibitorů ve vyšších koncentracích, byl bez problému až do konečné koncentrace 2 %. Pro enzymatickou reakci bylo vneseno 40  $\mu$ l roztoku pro enzymatickou reakci do každé jamky a inkubováno s 10  $\mu$ l roztoku inhibitoru po dobu 10 minut. Enzymatická reakce byla potom spuštěna přidáním 50  $\mu$ l roztoku substrátu na jamku. Reakce byla provedena při teplotě prostředí po dobu 30 minut a potom zastavena mytím mycím puforem, které proběhlo třikrát.

Primární protilátky, které byly použity, byly specifické anti-poly(ADP-ribóza) protilátky v ředění 1:5000. Ředění proběhlo v protilátkovém pufru (1 % BSA v PBS; 0,05 % Tween20). Inkubační doba pro primární protilátky byla



dlouhá jednu hodinu při teplotě prostředí. Po následném mytí mycím pufrem, které proběhlo třikrát byla provedena inkubace s druhotnými protilátkami (anti-myší IgG protilátka, Fab fragmenty, s navázanou peroxidázou, Boehringer Mannheim, katalogové číslo 1500,686; anti-králičí IgG protilátka, s navázanou peroxidázou, SIGMA, katalogové číslo A-6154) v ředění 1:10,000 v protilátkovém pufru při teplotě okolí po dobu jedné hodiny. Mytí mycím pufrem, které proběhlo třikrát bylo následováno barevnou reakcí za použití objemu 100  $\mu$ l barevného reagens (TMB mix, SIGMA) na jamku při teplotě prostředí po dobu asi 15 minut. Barevná reakce byla zastavena přidáním objemu 100  $\mu$ l 2M  $H_2SO_4$ . Zastavení bylo následováno měřením, které proběhlo ihned, ve čtecím zařízení pro ELISA destičku (EAR340AT "Easy Reader", SLT-Labinstruments, Rakousko) (vlnová délka 450nm versus vlnové délce 620nm). Princip měření je zobrazen diagramaticky na obrázku 6.

Různé koncentrace byly použity pro vytvoření grafu zobrazujícího vliv dávky na účinek, pro určení hodnoty  $K_i$  inhibitoru. Hodnoty jsou získány v tripletu pro jednotlivou koncentraci inhibitoru. Aritmetické údaje jsou určeny za použití softwaru Mikrosoft® Excel.  $IC_{50}$  je určena za použitím Mikrocal® Origin Softwaru (Verze 5,0) ("Sigmoidal Fit"). Konverze hodnoty  $IC_{50}$  byla spočítaná touto cestou, hodnoty  $K_i$  byly určeny za použití "kalibračních inhibitorů". "Kalibrační inhibitory" byly také měřeny v každé analýze. Hodnoty  $K_i$  "kalibračních inhibitorů" byly určeny u téhož detekčního systému analýzou Dixonova diagramu způsobem, který je známý zkušenému pracovníkovi.



b) HTRF detekce (homogenous time-resolved fluorescence)

Při HTRF detekci PARP podle předloženého vynálezu jsou označeny histony, které jsou cílovými proteiny pro modifikaci PARP, nepřímo za pomoci XL665 fluoroforu. Anti-poly(ADP ribóza) protilátka je přímo označena europium kryptátem (anti-PAR-kryptát). Pokud je XL665 fluorofor v bezprostřední prostorové blízkosti, která je zaručena vazbou na poly(ADP-ribózy) na histon, potom je možný přesun energie. Emise při vlnové délce 665 nm je takto přímo úměrná množství navázané protilátky, které je jako takové ekvivalentní k množství poly(ADP-ribózy). Měřený signál takto odpovídá PARP aktivitě. Princip měření je zobrazen diagramaticky na obrázku 7. Použité pomůcky jsou shodné s pomůckami užívanými v ELISA detekci (viz výše), pokud by výslovně nebylo uvedeno jinak.

Histony byly rozpuštěny v koncentraci 3 mg/ml Hepes pufru (50mM, pH=7,5). Navázání biotinu proběhlo za pomoci sulfo-NHS-LC-biotinu (Pierce, #21335T). Byl použit molární poměr 4 molekul biotinu na histon. Inkubační doba byla dlouhá 90 minut (RT). Histony s navázaným biotinem byly potom purifikované na G25 SF HR10/10 koloně (Pharmacia, 17-0591-01) v Hepes pufru (50mM, pH=7,0) za účelem odstranění nadbytku navázaného biotinového reagens. Anti-poly(ADP-ribóza) protilátka byla označena za pomoci europium kryptátu za použití bifunkčních párovacích reagensů (Lopez, E. a kol., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); US Patent 5,534,622).

Purifikace proběhla na G25SF HR10/30 koloně. Byl docílen molární poměr 3,1 kryptátu na protilátku. Výtěžek byl 25 %. Konjugáty byly skladované při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  v přítomnosti 0,1 % BSA ve fosfátovém pufru (0,1M, pH=7).

Pro enzymatickou reakci byly následující látky napipetované do každé jamky:

- 10  $\mu\text{l}$  PARP roztoku PARP HTRF reakčním pufru (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM DTT) s 20ng PARP1 (lidské nebo hovězího) nebo 8ng PARP2 (lidské nebo myšího)
- 10  $\mu\text{l}$  aktivané DNA v PARP HTRF reakčním pufru (50pg/ml)
- 10  $\mu\text{l}$  histonů s navázaným biotinem v PARP HTRF reakčním pufru (1,25pM)
- 10  $\mu\text{l}$  inhibitor v PARP HTRF reakčním pufru

Tyto reagensie byly inkubovány po dobu 2 minut před tím, než byla reakce spuštěna přidáním

- 10  $\mu\text{l}$  NAD roztoku v PARP HTRF reakčním pufru (41  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ).
- Reakční doba byla 30 minut při teplotě prostředí.

Reakce byla potom zastavena přidáním

- 10  $\mu\text{l}$  PARP inhibitoru (25  $\mu\text{M}$ ,  $K_i=10\text{nM}$ ) ve "vývojovém" pufru (100mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2M KF, 0,05 % BSA).

v následujících látky byly potom přidány:

- 10  $\mu\text{l}$  EDTA roztoku (SIGMA, E-7889, 0,5M v  $\text{H}_2\text{O}$ )
- 100  $\mu\text{l}$  Sa-XL665 (Packard Instruments) ve "vývojovém" pufru (15-31,25nM)
- 50  $\mu\text{l}$  anti-PAR kryptátu ve "vývojovém" pufru (1,6-3,3nM).

Měření bylo potom možné po dobu 30 minut (po uplynutí doby

4 hodin). Měření proběhlo v "analyzujícím zařízení pro HTRF mikrodestičky" (Canberra Packard Instruments). Hodnoty  $K_i$  byly spočítané stejným způsobem jako je popsáno pro Způsob ELISA.

Příklad 7: Testové systémy pro určení terapeutické účinnosti PARP inhibitorů

U nových PARP inhibitorů může být zkontrolována jejich terapeutická účinnost v relevantním farmakologických modelech. Příklady několika vhodných modelů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Porucha	Model	Literatura
Neurodegenerativní porucha (mrtvice, Parkinsonova nemoc atd.)	NMDA excitotoxicita u myši nebo krys	viz dále
Mrtvice	Permanentní MCAO ("middle cerebral arterial occlusion")	Tokime, T. a kol., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18(9): 991-7, 1998. Guegan, C., Brain Research. Molecular Brain Research, 55(1): 133-40, 1998.
	Transientní, fokální MCAO in krys nebo myši	Eliasson MJL a kol., Nat Med 1997, 3:1089-1095. Endres, M. a kol., J. Cereb. Blood Flow Metab. 1997, 17:1143-1151. Takahashi, K. a kol., J. Cereb. Blood Flow Metab. 1997, 17:1137-1142.

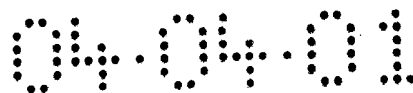
Parkinsonova nemoc	MPTP (1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) toxicita u myši/krys	Cosi, C. a kol. Brain Res., 1998, 809(1):58-67. Cosi, C. a kol. Brain Res., 1996, 729(2), 264-269
Srdeční infarkt	Koronární cévní okluze u krys, prasat a králíka	Richard, V. a kol., Br. J. Pharmacol. 1994, 113, 869-876. Thiemermann, C. a kol, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997, 94(2):679-83. Zingarelli, B. a kol., Cardiovasc. Res. 2 1997, 36(2):205-15.
	Langendorfov srdeční model u krys a králíků	Viz dále
Septický šok	Endotoxin šoku u krys	Szabo C a kol., J. Clin Invest, 1997, 100 (3), 723-735.
	Zymosanem nebo carrageenanem indukované vícenásobné selhání orgánů u krys a myší	Szabo, C. a kol. J. Exp Med. 1997, 186(7):1041-9. Cuzzocrea, S. a kol. Eur J. Pharmacol. 1998, 342 (1), 67-76.
Revmatická artritida	Adjuvantem nebo kolagenem indukovaná artritida u krys nebo myší	Szabo, C. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, 95(7):3867-72.
Diabetes	Streptozotocinem nebo alloxanem indukovaný nebo	Uchigata, Y. a kol., Diabetes 1983, 32, 316-318. Masiello, P. a kol., Diabetologia 1985, 28,

	související s obezitou	Diabetologia 1985, 28, 683-686. Shimabukuro, M. a kol., J. Clin. Invest. 1997, 100, 290-295.
Rakovina	<i>In vitro</i> model, viz dále	Schlicker a kol., 1999, 75(1), 91-100.

a) model NMDA excitotoxicity

Glutamát je nejdůležitější excitační neurotransmitter v mozku. V normálním případě je glutamát secernován do synaptické štěrbiny a stimuluje post-synaptické glutamátové receptory, konkrétně glutamátové receptory typu "NMDA" a typu "AMPA". Tato stimulace hraje nezastupitelnou úlohu v nesčetných funkcích mozku, mezi které je možné počítat učení, paměť a motorickou kontrolu.

V případě akutní a chronické neurodegenerace (například mrtvice) vznikne zvýšená presynaptická sekrece glutamátu, která tímto mechanismem v nadbytku stimuluje receptory. Zvýšená presynaptická sekrece glutamátu vede k smrti buněk stimulovaných touto cestou. Tyto zvýšené aktivity glutamátu vznikají u velkého počtu neurologických nemocí nebo psychologických poruch a vedou ke stavům nadměrně zvýšené excitace nebo toxickým efektům na centrální nervový systém (CNS), ale také na periferní nervový systém. Glutamát je takto účasten na velkém počtu neurodegenerativních nemocí, obzvláště neurotoxických poruch, které následují po hypoxii, anoxii, ischemii a po lézích jako jsou léze, které vznikají po mrtvici a traumatu a mrtvici, Alzheimerově nemoci, Huntingtonově chorobě, amyotrofické laterální



skleróze (ALS; "Lou Gehringova nemoc"), lebečních traumatech, traumatech míchy, periferních neuropatiích, u s AIDS spojené demence a Parkinsonově chorobě. Jinou nemocí, ve které jsou glutamátové receptory důležité, je epilepsie (viz Brain Res Bull 1998; 46(4):281-309, Eur. Neuropsychopharmacol. 1998, 8(2):141-52.).

Účinky glutamátu jsou zprostředkované cestou různých receptorů. Jeden z těchto receptorů je nazýván NMDA (N-metyl-D-aspartátový) receptor po specifickém agonistovi (Arzneim. Forschung 1990, 40, 511-514; TIPS, 1990, 11, 334-338; Drugs of the Future 1989, 14, 1059-1071). N-Metyl-D-aspartát je silným agonistou jedné třídy glutamátových receptorů ("NMDA" typu). Stimulace NMDA receptoru vede k influxu kalcia do buňky a k tvorbě volných radikálů. Volné radikály vedou k DNA poškození a aktivaci PARP. PARP jako taková způsobí buněčnou smrt cestou deplece makroergních fosfátů (NAD a ATP) v buňce. Deplece makroergních fosfátů vysvětluje toxicitu NMDA. Na působení prostřednictvím NMDA na zvířata se tedy může nahlížet jako na model výše uvedených nemocí, ve kterých je zavzata excitotoxicita.

Vzhledem k důležitosti glutamátových receptorů v neurodegenerativních chorobách bylo mnoho farmacologických přístupů do současnosti vedeno cestou specifického zablokování právě těchto receptorů. Nicméně tyto přístupy prokázaly, že jsou provázeny problémy (vedlejšími účinky), protože NMDA receptory jsou důležité v normálním vedení stimulu. Navíc je stimulace receptorů dějem, který proběhne velmi rychle tak, že podávání receptorů je často provázeno přílišným zpožděním (problém "časového okna"). Naskýtá se

zde tedy takto velká potřeba nových principů účinků a inhibitorů proti NMDA-spojené neurotoxicitě.

Na ochranu proti mozkové nadměrně zvýšené excitaci excitačními aminokyselinami (NMDA antagonismus u myši) může být pohlíženo jako na adekvátní důkaz aktivity farmakologického efektoru PARP u nemocí založených na excitotoxicitě. Intracerebrálním podáním excitačních aminokyselin (EAA) se indukuje tak masivní nadměrně zvýšená excitace, že tato masivní nadměrně zvýšená excitace vede během krátké doby ke křečím a smrti zvířete (myši).

V uvedeném případě zde bylo podáno unilaterálně intracerebroventrikulárně množství 10  $\mu$ l o síle 0,035 % vodného roztoku NMDA po uplynutí doby 120 minut po intraperitoneálním (i.p.) podání testované látky. Tyto symptomy mohou být inhibovány systémovým, například intraperitoneálním, podáním centrálně účinkujících léků. Vzhledem k tomu, že nadměrná aktivace EAA receptorů v centrálním nervovém systému hraje důležitou roli v patogenezi různých neurologických nemocí, tak může být získána informace, z detekovaného EAA antagonizmu *in vivo*, o možném terapeutickém použití látky u takových nemocí centrálního nervového systému. ED<sub>50</sub>, při které je 50 % zvířat po předcházejícím intraperitoneálním podání měřené látky bez symptomů se stanovenou dávkou NMDA, byla určena jako míra aktivity látky.

b) Langendorfovův model srdce (model srdečního infarktu)

Kryší samci Sprague-Dawley (tělesná hmotnost 300-400 g;



narození v lednu, Le Genest-St-Isle, Francie) byly použity pro test. Na krysy bylo působeno orálním podáním aktivní látky nebo placebo (objemově: 5 ml/kg). O 50 minut později byl podáván heparin intraperitoneální cestou (Liquemin N Roche, 125 IU/zvířecích v 0,5 ml). Zvířata byla uvedena do narkózy za pomoci Inactinu® T133 (thiobetabarbital sodný v 10 % koncentraci), fixována na operačním stole, tracheotomizovaná a ventilovaná pomocí "Harvard ventilatory pump" (40 úderů/min, 4,5 ml/úder). Thorakotomie byla následována bezprostřední kateterizací aorty, odstraněním srdce a bezprostřední retrogradní perfuzí. Srdce byla perfundovaná při konstantním tlaku o hodnotě 75 mmHg, který je docílen za použití "Gilson Miniplus 2 perfusion pump". Složení perfundované tekutiny (v mmol/l): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,52, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glukóza 11. Teplota byla udržována na hodnotě 37 °C po dobu trvání pokusu. Funkční parametry byly neustále zaznamenávány za použití "Gould 4-channel recorder". Měření hodnot byla provedena pro veličiny tlaku krve v levé komoře srdce (LVP; mmHg), tlaku krve v levé komoře srdce na konci diastoly (LVEDP mmHg), uvolňování enzymů (kreatin kináza, mU/ml/g), velikost průtoku krve koronárním řečištěm (ml/min), HR (tepovou frekvenci, min<sup>-1</sup>). Tlak krve v levé komoře srdce byl měřen za použití latexového balónu, který je plněný tekutinou a Statham23 Db tlakovým transduktorem. Objem balónu byl nejprve uzpůsoben tomu, aby dosáhl hodnoty tlaku krve v levé komoře srdce na konci diastoly LVEDP okolo hodnoty 12 mmHg. Hodnota dP/dt<sub>max</sub> (maximální pumpovací síla) je odvozena ze signálu tlaku za použití diferenciátoru modulu. Srdeční frekvence byla spočítána ze signálu tlaku. Velikost průtoku byla určena za

použití zařízení počítajícího kapky (drop counter) (BMT Messtechnik GmbH Berlin). Po ekvilibrační době 20 minut byla srdce vystavena po dobu 30 minut trvající globální ischemii, která vznikala zastavením perfuzní dodávky krve při teplotě udržované na hodnotě 37 °C. Během následující 60 minutové reperfuzní periody byly odebírány vzorky perfuzátu po době 3, 5, 10, 15, 30, 45 a 60 minut pro analýzu aktivity kreatin kinázy (CK). Hodnoty a standartní deviace měřených parametrů byly analyzovány statisticky (Dunnett test). Limit významnosti byl  $p=0,05$ .

Pokus na králičích srdcích byl proveden podobně. Byly použiti samci bíých Novozélandských králíků (získaných z Interfauna). Srdce byla připravena také způsobem, který je shodný se způsobem, který je výše uveden pro krysí model. Perfuzní tlak byl nastaven na maximální hodnotu 60 mmHg a velikost průtoku byla nastavena na hodnotu přibližně 25ml/min. Ekvilibrační čas byl okolo 30 minut. Látka byla podávána infuzí přímo proti proudu ze srdce. Po uplynutí 15 minut po začátku infuze byla provedena 30 minut trvající celková ischemie, která vznikla zastavením proudu krve zatímco se udržovala stálá teplota srdce. Potom následovala 30 minut trvající reperfuze. Perfuzát byl odebírán za účelem vyšetření aktivity kreatin kinázy (CK) před podáním látky, po uplynutí doby 15 minut a po uplynutí různě dlouhých dob (5, 10, 15, 20, 30 minut) během reperfuze. Byly měřeny následující parametry: tlak krve v levé komoře srdce (LVP; mmHg), tlak krve v levé komoře srdce na konci diastoly (LVEDP; mmHg), LVdP/dt, PP (mmHg), HR (srdeční frekvence; úderů/min), CK aktivita (U/min/g srdeční hmotnosti).

c) Zvířecí modely pro akutní selhání ledvin

Byl zkoumán ochranný účinek intravenózního podávání PARP inhibitorů (po dobu 4 dnů) na funkci ledvin u krys s postischemickým akutním selháním ledvin.

Byly použiti krysy samci Sprague-Dawley (hmotnosti okolo 330 g na začátku pokusů; chovatel: Charles River). 10-15 zvířat byly použito v každé pokusné skupině. Podávání aktivní látky/placeba probíhalo neustále osmotickou mikropumpou do véna femoralis. Byly provedeny odběry krve z orbity (v množství 1,5 ml plné krve), během kterých byla zvířata v narkóze, do které byla uvedena inhalační cestou za pomoci enfluranu (Ethrane Abbot, Wiesbaden).

Po průvodních měřeních (krevního vzorku) a určení množství vyloučené moči za dobu 24 hodin, byly krysy uvedeny do narkózy ("Nembutal", pentobarbital sodný, Sanofi CEVA; 50mg/kg intraperitoneálně, objemově injikovaný v množství 1,0 ml/kg) a připevněny na operačním stole, který bylo možno zahřívat na teplotu 37°C. 125 IU/kg heparinu (Liquemin N, Roche) byly podáno intravenózně do vena caudalis. Bylo provedeno otevření břišní dutiny a bylo provedeno vypreparování pravé ledviny. Větvení arteria renalis bylo vypreparováno a při odstupu podvázáno za použití podvazů (Diefenbach 38mm). Levá arteria renalis byla podobně vypreparována a podvázána (při odstupu, asi v polovině cesty k ledvině). Během operace byla implantována osmotická mikropumpa do vena femoralis. Tenké střevo bylo reinzertováno a ztráta tekutin byla kompenzována vlažným

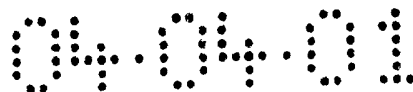
0,9 % NaCl. Zvířata byla přikryta vlhkou pokrývkou a udržována v teple pod červeným světlem. Po 40 minutách byl zazamenáván vzhled ledvin a podvazy byly odstraněny, první pravý, potom levý. Tenké střevo byl vráceno nazpět a byly přidány 2 kapky antibiotik (Tardomyocel, Bayer). Břišní stěna byla uzavřena sterilním kočičím střevem (Ethicon no. 4) a bylo na ni působeno ještě jednou 1 kapkou antibiotika. Epidermis byla zašita sterilním šicím materiálem Ethibond Exel (Ethicon) no. 3/0 a steh byl posprejován Nebacetin N (Yamanouchi) sprejem na rány. Desetina denní dávky lék/placebo byla podána intravenózně jako bolus.

Vzorky a krev byly odebírány pro zkoumání biochemických parametrů séru a moči: ionty sodíku, draslíku, kreatinin, proteiny (pouze u moči), ve dnech 1, 2 a 4 pokusu. Navíc byl zaznamenáván příjem potravy a spotřeba vody, tělesná hmotnost a objem moči. Po uplynutí 14 dnů byla zvířata utracena a ledviny byly zkoumány.

Zkoumání se netýkalo těch zvířat, která zemřela na infarkt během pokusu nebo u nichž se prokázal infarkt pomocí nekropsie provedené 14. den. Clearance kreatininu a exkreční frakce sodíku byly použity pro výpočet ledviných funkčních parametrů, ve srovnání se zvířaty, kterým bylo podáváno placebo.

d) *In vitro* model pro studium radiosenzitizace (nádorová terapie)

MCF-7-buňky (lidský karcinom prsu) byly kultivované v Dulbeccově pozměněném Eaglově médiu s 10 % teplem

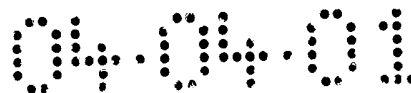


inaktivovaným FCS a 2 mM L-glutaminu. Buňky byly naočkovány přes noc v buněčných hustotách 100, 1000 nebo 10 000 buněk na jamku do 6 jamkové destičky a potom exponované ionizačnímu záření, jehož dávka se pohybovala v oblasti od 0 do 10 Gy (137CS, Shepard Mark, model 1-68A, rychlost ionizace 3,28 Gy/min). 10 dnů po iradiaci byl pokus zkoumán způsobem, při kterém se kolonie s padesáti buňkami počítaly jako pozitivní.

e) Model mrtvice (fokální mozková ischemie; okluze MCA (arteria cerebri média) na kryse

Fokální ischemie byla provedena prostřednictvím kauterizace pravé distální MCA (arteria cerebri média) na Sprague-Dawley nebo Long-Evans krysách. Na krysy se mohlo působit před nebo po začátku okluze MCA (arteria cerebri média) modulátory proteinů podle předloženého vynálezu. Obvykle byly dávky vybírány v rozmezí hodnot 1-10 mg/kg (aplikace bolu), s možností následovné nepřetržité infuze 0,5-5 mg/kg/hodinu.

Krysy byly uvedeny do narkózy za pomoci halothanu ve směsi se 70 % dusíkem a se 30 % kyslíkem (4 % v počáteční fázi a 0,8-1,2 % během operace). Tělesná teplota byla neustále měřena rektálně a byla udržována na konstantní hodnotě při teplotě  $37,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  prostřednictvím oteplovacího blanketu, jehož funkci je možné kontrolovat. Katetr v ocasní žíle poskytoval možnost měření arteriálního krevního tlaku, arteriálního pH, (parciálního tlaku kyslíku  $\text{Pa}(\text{O}_2)$  a parciálního tlaku oxidu uhličitého  $\text{Pa}(\text{CO}_2)$ ). Potom byla provedena fokální ischemie za použití způsoby Chen a kol.



(Stroke 17: 738-743; 1986) nebo Liu a kol. (Am. J. physiol. 256: H589-593; 1989) prostřednictvím nepřetržité kauterizace distální části pravé MCA (arteria cerebri média). Když byla operace ukončena, byla zvířata udržována v teplém prostředí po dobu dalších 24 hodin. Potom byla zvířata utracena za použití CO<sub>2</sub> a dekapitována. Jejich mozky byly odebrány, zmrazeny šokem (suchým ledem nebo tekutým dusíkem) a skladované při teplotě -80°C. Mozky byly nařezány na 0,02 mm tlusté plátky a každý dvacátý plátek byl použit pro následnou analýzu. Uvedené řezy byly obarveny za pomoci kresyl violetě (Nisslovo barvení). TTC (2,3,4-trifenyltetrazoliumchlorid) může být alternativně použit pro barvení. Velikost infarktu může potom být analyzována pod mikroskopem. Pro přesnou kvantifikaci může být použit počítačový software, který analyzuje obrazy (J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10: 290-293; 1990).

f) Septický šok

Na skupinu 10 samců myši C57/BL (tělesná hmotnost nabývá hodnot 18-20 g) bylo působeno LPS (lipopolysacharidem z E. coli, LD<sub>100</sub> 20 mg/zvíře intravenózně) spolu s galaktozaminem (20 mg/zvíře intravenózně). Látka, která má být testovaná byla podána intraperitoneálně nebo intravenózně během tří po sobě následujících dnů (například 1 až 10 mg/kg), přičemž první dávka byla podána po uplynutí doby 30 minut po začátku působení lipopolysacharidem (LPS). Stupeň úmrtnosti byl určován každých 12 hodin. Alternativně může být také látka podána v několika dávkách, které jsou rozloženy na několik dní.

g) Určení pozměněné genové exprese ve stárnoucích buňkách

Stárnutí buněk je simulováno změnou média buněčné kultury z úplného média na médium s redukovanou koncentrací séra a následně potom je analyzováno prostřednictvím kvantitativní PCR nebo Northern Blotingu (Linskens a kol., Nucleic Acids Res. 1995, 23(16): 3244-51). Jako typické markery pro stárnutí kůže mohou být například použity kolagen nebo elastin. Jsou použity lidské fibroblasty nebo buněčné linie fibroblastů, který simulují stárnutí kůže. Modulátory proteinů podle předloženého vynálezu jsou přidány do média a je pozorován jejich účinek na změnu genové exprese. Může být pozorovaná zvýšená produkce elastinu v buňkách, u kterých je patrné snížení procesu stárnutí, které vzniklo prostřednictvím zmíněných modulátorů.

Zastupuje:

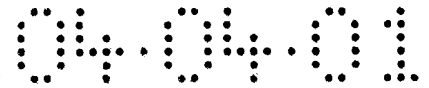
dr. O. Švorčík

## Seznam sekvencí

- (1) Obecné informace
- (i) Přihlašovatel
- (A) Jméno: BASF Aktiengesellschaft
- (B) Ulice:
- (C) Město: Ludwigshafen
- (D) Země: Německo
- (E) Poštovní kód: 67065
- (ii) Název vynálezu: Nové poly ADP ribóza polymerázové geny
- (iii) Počet sekvencí: 28
- (iv) Počítačová forma
- (A) Typ média: floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC compatible
- (C) Operační systém: PC DOS/MS DOS
- (D) Software: PatentIn Relesase 1.0, Version 1.30 (EPO)
- (2) Informace pro SEQ ID NO: 1
- (i) vlastnosti sekvence:
- (A) Délka: 1843 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) negativní orientace: ne
- (v) Původní zdroj:
- (F) Typ tkáně: mozek
- (ix) Znaky:
- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Poloha: 3..1715
- (D) Další informace: /produkt="poly ADP ribóza polymeráza"
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1
- CC ATG GCG GCG CGG CGG CGA CGG AGC ACC GGC GGC GGC AGG GCG AGA 47  
 Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg  
 1 5 10 15
- GCA TTA AAT GAA AGC AAA AGA GTT AAT AAT GGC AAC ACG GCT CCA GAA 95  
 Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu  
 20 25 30



GAC TCT TCC CCT GCC AAG AAA ACT CGT AGA TGC CAG AGA CAG GAG TCG Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	143
35 40 45	
AAA AAG ATG CCT GTG GCT GGA GGA AAA GCT AAT AAG GAC AGG ACA GAA Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	191
50 55 60	
GAC AAG CAA GAT GAA TCT GTG AAG GCC TTG CTG TTA AAG GGC AAA GCT Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala	239
65 70 75	
CCT GTG GAC CCA GAG TGT ACA GCC AAG GTG GGG AAG GCT CAT GTG TAT Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr	287
80 85 90 95	
TGT GAA GGA AAT GAT GTC TAT GAT GTC ATG CTA AAT CAG ACC AAT CTC Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu	335
100 105 110	
CAG TTC AAC AAC AAC AAG TAC TAT CTG ATT CAG CTA TTA GAA GAT GAT Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp	383
115 120 125	
GCC CAG AGG AAC TTC AGT GTT TGG ATG AGA TGG GGC CGA GTT GGG AAA Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys	431
130 135 140	
ATG GGA CAG CAC AGC CTG GTG GCT TGT TCA GGC AAT CTC AAC AAG GCC Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala	479
145 150 155	
AAG GAA ATC TTT CAG AAG AAA TTC CTT GAC AAA ACG AAA AAC AAT TGG Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp	527
160 165 170 175	
GAA GAT CGA GAA AAG TTT GAG AAG GTG CCT GGA AAA TAT GAT ATG CTA Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu	575
180 185 190	
CAG ATG GAC TAT GCC ACC AAT ACT CAG GAT GAA GAG GAA ACA AAG AAA Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys	623
195 200 205	
GAG GAA TCT CTT AAA TCT CCC TTG AAG CCA GAG TCA CAG CTA GAT CTT Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu	671
210 215 220	
CGG GTA CAG GAG TTA ATA AAG TTG ATC TGT AAT GTT CAG GCC ATG GAA Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu	719
225 230 235	
GAA ATG ATG ATG GAA ATG AAG TAT AAT ACC AAG AAA GCC CCA CTT GGG Glu Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly	767
240 245 250 255	
AAG CTG ACA GTG GCA CAA ATC AAG GCA GGT TAC CAG TCT CTT AAG AAG Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys	815



260					265					270						
ATT	GAG	GAT	TGT	ATT	CGG	GCT	GGC	CAG	CAT	GGA	CGA	GCT	CTC	ATG	GAA	863
Ile	Glu	Asp	Cys	Ile	Arg	Ala	Gly	Gln	His	Gly	Arg	Ala	Leu	Met	Glu	
			275					280					285			
GCA	TGC	AAT	GAA	TTC	TAC	ACC	AGG	ATT	CCG	CAT	GAC	TTT	GGA	CTC	CGT	911
Ala	Cys	Asn	Glu	Phe	Tyr	Thr	Arg	Ile	Pro	His	Asp	Phe	Gly	Leu	Arg	
		290					295					300				
ACT	CCT	CCA	CTA	ATC	CGG	ACA	CAG	AAG	GAA	CTG	TCA	GAA	AAA	ATA	CAA	959
Thr	Pro	Pro	Leu	Ile	Arg	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Ile	Gln	
	305					310					315					
TTA	CTA	GAG	GCT	TTG	GGA	GAC	ATT	GAA	ATT	GCT	ATT	AAG	CTG	GTG	AAA	1007
Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Ile	Lys	Leu	Val	Lys	
	320				325					330					335	
ACA	GAG	CTA	CAA	AGC	CCA	GAA	CAC	CCA	TTG	GAC	CAA	CAC	TAT	AGA	AAC	1055
Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Leu	Asp	Gln	His	Tyr	Arg	Asn	
				340					345						350	
CTA	CAT	TGT	GCC	TTG	CGC	CCC	CTT	GAC	CAT	GAA	AGT	TAC	GAG	TTC	AAA	1103
Leu	His	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Asp	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Phe	Lys	
			355					360					365			
GTG	ATT	TCC	CAG	TAC	CTA	CAA	TCT	ACC	CAT	GCT	CCC	ACA	CAC	AGC	GAC	1151
Val	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Thr	His	Ala	Pro	Thr	His	Ser	Asp	
		370					375						380			
TAT	ACC	ATG	ACC	TTG	CTG	GAT	TTG	TTT	GAA	GTG	GAG	AAG	GAT	GGT	GAG	1199
Tyr	Thr	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu	
		385				390					395					
AAA	GAA	GCC	TTC	AGA	GAG	GAC	CTT	CAT	AAC	AGG	ATG	CTT	CTA	TGG	CAT	1247
Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	His	Asn	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	His	
	400				405					410					415	
GGT	TCC	AGG	ATG	AGT	AAC	TGG	GTG	GGA	ATC	TTG	AGC	CAT	GGG	CTT	CGA	1295
Gly	Ser	Arg	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Gly	Ile	Leu	Ser	His	Gly	Leu	Arg	
				420				425						430		
ATT	GCC	CCA	CCT	GAA	GCT	CCC	ATC	ACA	GGT	TAC	ATG	TTT	GGG	AAA	GGA	1343
Ile	Ala	Pro	Pro	Glu	Ala	Pro	Ile	Thr	Gly	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Gly	
			435					440						445		
ATC	TAC	TTT	GCT	GAC	ATG	TCT	TCC	AAG	AGT	GCC	AAT	TAC	TGC	TTT	GCC	1391
Ile	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ala	
		450						455					460			
TCT	CGC	CTA	AAG	AAT	ACA	GGA	CTG	CTG	CTC	TTA	TCA	GAG	GTA	GCT	CTA	1439
Ser	Arg	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	
		465				470						475				
GGT	CAG	TGT	AAT	GAA	CTA	CTA	GAG	GCC	AAT	CCT	AAG	GCC	GAA	GGA	TTG	1487
Gly	Gln	Cys	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala	Glu	Gly	Leu	
	480				485					490					495	
CTT	CAA	GGT	AAA	CAT	AGC	ACC	AAG	GGG	CTG	GGC	AAG	ATG	GCT	CCC	AGT	1535



Leu Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser  
500 505 510

TCT GCC CAC TTC GTC ACC CTG AAT GGG AGT ACA GTG CCA TTA GGA CCA 1583  
Ser Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro  
515 520 525

GCA AGT GAC ACA GGA ATT CTG AAT CCA GAT GGT TAT ACC CTC AAC TAC 1631  
Ala Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr  
530 535 540

AAT GAA TAT ATT GTA TAT AAC CCC AAC CAG GTC CGT ATG CGG TAC CTT 1679  
Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu  
545 550 555

TTA AAG GTT CAG TTT AAT TTC CTT CAG CTG TGG TGA ATGTTGATAT 1725  
Leu Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp \*  
560 565 570

TAAATAAACC AGAGATCTGA TCTTCAAGCA AGAAAATAAG CAGTGTGTGTA CTTGTGAATT 1785

TTGTGATATT TTATGTAATA AAAACTGTAC AGGTCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1843

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) Délka: 571 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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



450		455		460
Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly				
465		470		475 480
Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Leu				
		485		490 495
Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser Ser				
		500		505 510
Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro Ala				
		515		520 525
Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr Asn				
		530		535 540
Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu Leu				
		545		550 555 560
Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp *				
		565		570

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) Délka: 2265 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) negativní orientace: ne

(v) Původní zdroj:

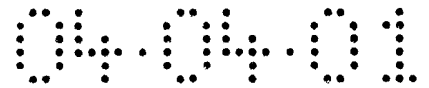
- (F) Typ tkáně: uterus

(ix) Znaky:

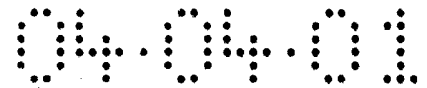
- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Poloha: 242..1843
- (D) Další informace: /produkt="poly ADP ribóza polymeráza"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATGTCCCTGC TTTTCTTGGC	240
C ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT GAG	286
Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu	



575					580					585						
AAG	AAG	AAG	GGC	CGG	CAG	GCA	GGA	AGG	GAG	GAG	GAC	CCC	TTC	CGC	TCC	334
Lys	Lys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu	Glu	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	
			590					595					600			
ACC	GCT	GAG	GCC	CTC	AAG	GCC	ATA	CCC	GCA	GAG	AAG	CGC	ATA	ATC	CGC	382
Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Arg	
		605					610						615			
GTG	GAT	CCA	ACA	TGT	CCA	CTC	AGC	AGC	AAC	CCC	GGG	ACC	CAG	GTG	TAT	430
Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	
	620					625					630					
GAG	GAC	TAC	AAC	TGC	ACC	CTG	AAC	CAG	ACC	AAC	ATC	GAG	AAC	AAC	AAC	478
Glu	Asp	Tyr	Asn	Cys	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr	Asn	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	
	635					640					645				650	
AAC	AAG	TTC	TAC	ATC	ATC	CAG	CTG	CTC	CAA	GAC	AGC	AAC	CGC	TTC	TTC	526
Asn	Lys	Phe	Tyr	Ile	Ile	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ser	Asn	Arg	Phe	Phe	
				655					660					665		
ACC	TGC	TGG	AAC	CGC	TGG	GGC	CGT	GTG	GGA	GAG	GTC	GCC	CAG	TCA	AAG	574
Thr	Cys	Trp	Asn	Arg	Trp	Gly	Arg	Val	Gly	Glu	Val	Gly	Gln	Ser	Lys	
			670					675					680			
ATC	AAC	CAC	TTC	ACA	AGG	CTA	GAA	GAT	GCA	AAG	AAG	GAC	TTT	GAG	AAG	622
Ile	Asn	His	Phe	Thr	Arg	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Lys	
		685					690						695			
AAA	TTT	CGG	GAA	AAG	ACC	AAG	AAC	AAC	TGG	GCA	GAG	CGG	GAC	CAC	TTT	670
Lys	Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Trp	Ala	Glu	Arg	Asp	His	Phe	
	700						705					710				
GTG	TCT	CAC	CCG	GGC	AAG	TAC	ACA	CTT	ATC	GAA	GTA	CAG	GCA	GAG	GAT	718
Val	Ser	His	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	
	715				720						725				730	
GAG	GCC	CAG	GAA	GCT	GTG	GTG	AAG	GTG	GAC	AGA	GGC	CCA	GTG	AGG	ACT	766
Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Arg	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	
				735					740					745		
GTG	ACT	AAG	CGG	GTG	CAG	CCC	TGC	TCC	CTG	GAC	CCA	GCC	ACG	CAG	AAG	814
Val	Thr	Lys	Arg	Val	Gln	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	
			750					755					760			
CTC	ATC	ACT	AAC	ATC	TTC	AGC	AAG	GAG	ATG	TTC	AAG	AAC	ACC	ATG	GCC	862
Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Thr	Met	Ala	
			765				770						775			
CTC	ATG	GAC	CTG	GAT	GTG	AAG	AAG	ATG	CCC	CTG	GGA	AAG	CTG	AGC	AAG	910
Leu	Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	
	780						785					790				
CAA	CAG	ATT	GCA	CGG	GGT	TTC	GAG	GCC	TTG	GAG	GCG	CTG	GAG	GAG	GCC	958
Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	
	795				800						805				810	
CTG	AAA	GGC	CCC	ACG	GAT	GGT	GGC	CAA	AGC	CTG	GAG	GAG	CTG	TCC	TCA	1006



Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser  
815 820 825

CAC TTT TAC ACC GTC ATC CCG CAC AAC TTC GGC CAC AGC CAG CCC CCG 1054  
His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro  
830 835 840

CCC ATC AAT TCC CCT GAG CTT CTG CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG 1102  
Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu  
845 850 855

GTG CTG GCG GAC ATC GAG CTG GCC CAG GCC CTG CAG GCA GTC TCT GAG 1150  
Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu  
860 865 870

CAG GAG AAG ACG GTG GAG GAG GTG CCA CAC CCC CTG GAC CGA GAC TAC 1198  
Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr  
875 880 885 890

CAG CTT CTC AAG TGC CAG CTG CAG CTG CTA GAC TCT GGA GCA CCT GAG 1246  
Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu  
895 900 905

TAC AAG GTG ATA CAG ACC TAC TTA GAA CAG ACT GGC AGC AAC CAC AGG 1294  
Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg  
910 915 920

TGC CCT ACA CTT CAA CAC ATC TGG AAA GTA AAC CAA GAA GGG GAG GAA 1342  
Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu  
925 930 935

GAC AGA TTC CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGT AAT CGG AAG CTG CTG TGG 1390  
Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp  
940 945 950

CAT GGC ACC AAC ATG GCC GTG GTG GCC GCC ATC CTC ACT AGT GGG CTC 1438  
His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu  
955 960 965 970

CGC ATC ATG CCA CAT TCT GGT GGG CGT GTT GGC AAG GGC ATC TAC TTT 1486  
Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe  
975 980 985

GCC TCA GAG AAC AGC AAG TCA GCT GGA TAT GTT ATT GGC ATG AAG TGT 1534  
Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys  
990 995 1000

GGG GCC CAC CAT GTC GGC TAC ATG TTC CTG GGT GAG GTG GCC CTG GGC 1582  
Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly  
1005 1010 1015

AGA GAG CAC CAT ATC AAC ACG GAC AAC CCC AGC TTG AAG AGC CCA CCT 1630  
Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro  
1020 1025 1030

CCT GGC TTC GAC AGT GTC ATT GCC CGA GGC CAC ACC GAG CCT GAT CCG 1678  
Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro  
1035 1040 1045 1050

ACC CAG GAC ACT GAG TTG GAG CTG GAT GGC CAG CAA GTG GTG GTG CCC 1726  
 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro  
 1055 1060 1065

CAG GGC CAG CCT GTG CCC TGC CCA GAG TTC AGC AGC TCC ACA TTC TCC 1774  
 Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser  
 1070 1075 1080

CAG AGC GAG TAC CTC ATC TAC CAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC 1822  
 Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr  
 1085 1090 1095

CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCCCGCC TGTCCCCCGG GGTCCCTGCAA 1873  
 Leu Leu Glu Val His Leu \*  
 1100 1105

GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTTT 1933

TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA 1993

CTTATGCCTC CTAAGTAA TTTTGTATC TTTGACACAT CTGCCAGTC CCTCTCCTCC 2053

CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGCAGCTTT TATAGGTTC 2113

ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTTTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT 2173

AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTTTCAT AAATGACAAG ATTCCTCCT TAAAAA 2233

AAAAA 2265

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4

- (i) vlastnosti sekvence:
  - (A) Délka: 534 aminokyselin
  - (B) Typ: aminokyselina
  - (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: protein
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4

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

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

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

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

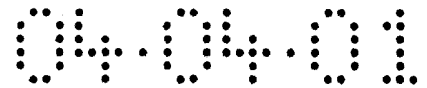
Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

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

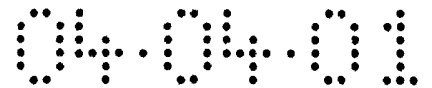
Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile





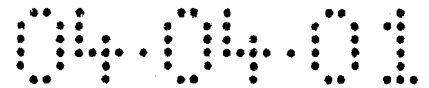


Leu	Ala	Met	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Trp	Val	Gln	Thr	Glu	Gly	Pro		
540					545					550					555		
GAG	AAG	AAG	AAG	GGC	CGG	CAG	GCA	GGA	AGG	GAG	GAG	GAC	CCC	TTC	CGC		331
Glu	Lys	Lys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu	Glu	Asp	Pro	Phe	Arg		
				560					565					570			
TCC	ACC	GCT	GAG	GCC	CTC	AAG	GCC	ATA	CCC	GCA	GAG	AAG	CGC	ATA	ATC		379
Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile		
			575					580					585				
CGC	GTG	GAT	CCA	ACA	TGT	CCA	CTC	AGC	AGC	AAC	CCC	GGG	ACC	CAG	GTG		427
Arg	Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Gln	Val		
		590					595					600					
TAT	GAG	GAC	TAC	AAC	TGC	ACC	CTG	AAC	CAG	ACC	AAC	ATC	GAG	AAC	AAC		475
Tyr	Glu	Asp	Tyr	Asn	Cys	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr	Asn	Ile	Glu	Asn	Asn		
	605					610					615						
AAC	AAC	AAG	TTC	TAC	ATC	ATC	CAG	CTG	CTC	CAA	GAC	AGC	AAC	CGC	TTC		523
Asn	Asn	Lys	Phe	Tyr	Ile	Ile	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ser	Asn	Arg	Phe		
620					625					630				635			
TTC	ACC	TGC	TGG	AAC	CGC	TGG	GGC	CGT	GTG	GGA	GAG	GTC	GGC	CAG	TCA		571
Phe	Thr	Cys	Trp	Asn	Arg	Trp	Gly	Arg	Val	Gly	Glu	Val	Gly	Gln	Ser		
				640					645					650			
AAG	ATC	AAC	CAC	TTC	ACA	AGG	CTA	GAA	GAT	GCA	AAG	AAG	GAC	TTT	GAG		619
Lys	Ile	Asn	His	Phe	Thr	Arg	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu		
			655						660					665			
AAG	AAA	TTT	CGG	GAA	AAG	ACC	AAG	AAC	TGG	GCA	GAG	CGG	GAC	CAC			667
Lys	Lys	Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Trp	Ala	Glu	Arg	Asp	His		
		670					675					680					
TTT	GTG	TCT	CAC	CCG	GGC	AAG	TAC	ACA	CTT	ATC	GAA	GTA	CAG	GCA	GAG		715
Phe	Val	Ser	His	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Ala	Glu		
	685					690					695						
GAT	GAG	GCC	CAG	GAA	GCT	GTG	GTG	AAG	GTG	GAC	AGA	GGC	CCA	GTG	AGG		763
Asp	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Arg	Gly	Pro	Val	Arg		
700					705					710				715			
ACT	GTG	ACT	AAG	CGG	GTG	CAG	CCC	TGC	TCC	CTG	GAC	CCA	GCC	ACG	CAG		811
Thr	Val	Thr	Lys	Arg	Val	Gln	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln		
				720						725				730			
AAG	CTC	ATC	ACT	AAC	ATC	TTC	AGC	AAG	GAG	ATG	TTC	AAG	AAC	ACC	ATG		859
Lys	Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Thr	Met		
			735					740					745				
GCC	CTC	ATG	GAC	CTG	GAT	GTG	AAG	AAG	ATG	CCC	CTG	GGA	AAG	CTG	AGC		907
Ala	Leu	Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser		
		750					755						760				
AAG	CAA	CAG	ATT	GCA	CGG	GGT	TTC	GAG	GCC	TTG	GAG	GCG	CTG	GAG	GAG		955
Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu		
		765					770						775				



GCC	CTG	AAA	GGC	CCC	ACG	GAT	GGT	GGC	CAA	AGC	CTG	GAG	GAG	CTG	TCC	1003
Ala	Leu	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	
780					785				790						795	
TCA	CAC	TTT	TAC	ACC	GTC	ATC	CCG	CAC	AAC	TTC	GGC	CAC	AGC	CAG	CCC	1051
Ser	His	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	His	Ser	Gln	Pro	
				800					805						810	
CCG	CCC	ATC	AAT	TCC	CCT	GAG	CTT	CTG	CAG	GCC	AAG	AAG	GAC	ATG	CTG	1099
Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	
			815					820							825	
CTG	GTG	CTG	GCG	GAC	ATC	GAG	CTG	GCC	CAG	GCC	CTG	CAG	GCA	GTC	TCT	1147
Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	
			830					835							840	
GAG	CAG	GAG	AAG	ACG	GTG	GAG	GAG	GTG	CCA	CAC	CCC	CTG	GAC	CGA	GAC	1195
Glu	Gln	Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	
			845					850							855	
TAC	CAG	CTT	CTC	AAG	TGC	CAG	CTG	CAG	CTG	CTA	GAC	TCT	GGA	GCA	CCT	1243
Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	
860					865						870				875	
GAG	TAC	AAG	GTG	ATA	CAG	ACC	TAC	TTA	GAA	CAG	ACT	GGC	AGC	AAC	CAC	1291
Glu	Tyr	Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Asn	His	
					880						885				890	
AGG	TGC	CCT	ACA	CTT	CAA	CAC	ATC	TGG	AAA	GTA	AAC	CAA	GAA	GGG	GAG	1339
Arg	Cys	Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	
					895				900						905	
GAA	GAC	AGA	TTC	CAG	GCC	CAC	TCC	AAA	CTG	GGT	AAT	CGG	AAG	CTG	CTG	1387
Glu	Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	
			910						915						920	
TGG	CAT	GGC	ACC	AAC	ATG	GCC	GTG	GTG	GCC	GCC	ATC	CTC	ACT	AGT	GGG	1435
Trp	His	Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	
			925						930						935	
CTC	CGC	ATC	ATG	CCA	CAT	TCT	GGT	GGG	CGT	GTT	GGC	AAG	GGC	ATC	TAC	1483
Leu	Arg	Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	
940					945						950				955	
TTT	GCC	TCA	GAG	AAC	AGC	AAG	TCA	GCT	GGA	TAT	GTT	ATT	GGC	ATG	AAG	1531
Phe	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Met	Lys	
					960						965				970	
TGT	GGG	GCC	CAC	CAT	GTC	GGC	TAC	ATG	TTC	CTG	GGT	GAG	GTG	GCC	CTG	1579
Cys	Gly	Ala	His	His	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	
					975						980				985	
GGC	AGA	GAG	CAC	CAT	ATC	AAC	ACG	GAC	AAC	CCC	AGC	TTG	AAG	AGC	CCA	1627
Gly	Arg	Glu	His	His	Ile	Asn	Thr	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	
					990										1000	
CCT	CCT	GGC	TTC	GAC	AGT	GTC	ATT	GCC	CGA	GGC	CAC	ACC	GAG	CCT	GAT	1675
Pro	Pro	Gly	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	His	Thr	Glu	Pro	Asp	





85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

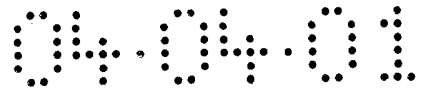
Thr Gly Ser Asn His Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val  
355 360 365

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

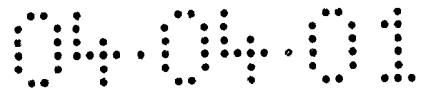
Asn Arg Lys Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala  
385 390 395 400

Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val





CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG GCT CTC Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu 560 565 570 575	213
AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC TCA TGT Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys 580 585 590	261
CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT GAC TGT Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys 595 600 605	309
ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC TAT ATT Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile 610 615 620	357
ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT CGC TGG Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp 625 630 635	405
GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC ACC TGC Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys 640 645 650 655	453
CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG AAG ACT Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr 660 665 670	501
AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC AAC AAG Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys 675 680 685	549
TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG GCT GTA Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu Ala Val 690 695 700	597
GTG AAG GCC TTA TCT CCC CAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val 705 710 715	645
GTC AAG CCC TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn 720 725 730 735	693
ATC TTC AGC AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu 740 745 750	741
GAT GTG AAG AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala 755 760 765	789
CGT GGC TTC GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro 770 775 780	837
ACA GGG GAT GGC CAG AGC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr 885	885



785	790	795	
GTC ATC CCA CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser 800 805 810 815			933
CCT GAT GTG CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp 820 825 830			981
ATC GAG TTG GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu 835 840 845			1029
AAA GTG GAA GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu 850 855 860			1077
AGG TGC CAG CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala 865 870 875			1125
ATA CAG ACC TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn 880 885 890 895			1173
CTG CGG CAT GTT TGG AAA GTG AAC CGA GAA GGG GAG GGA GAC AGG TTC Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe 900 905 910			1221
CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr 915 920 925			1269
AAT GTG GCC GTG GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met 930 935 940			1317
CCA CAC TCG GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu 945 950 955			1365
AAC AGC AAG TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His 960 965 970 975			1413
CAG GTG GGC TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His 980 985 990			1461
CAC ATC ACC ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe 995 1000 1005			1509
GAC AGC GTC ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp 1010 1015 1020			1557
ATT GAA CTT GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG			1605

```

Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro
  1025                      1030                      1035

CCT GTG CAG TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA      1653
Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu
1040                      1045                      1050                      1055

TAC CTC ATA TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG      1701
Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu
                      1060                      1065                      1070

ATT CAC CTC TAAGCTGCTT GCCCTCCCTA GGTCCAAGCC      1740
Ile His Leu

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) Délka: 533 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8

```

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

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

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

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

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

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

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

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

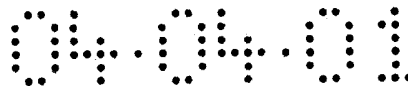
Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro
                      130                     135                     140

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

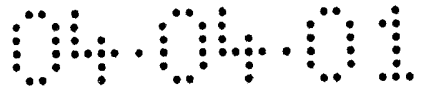
Ala Val Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg
                      165                     170                     175

Thr Val Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile

```



180					185					190					
Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met
	195						200					205			
Asn	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln
	210					215					220				
Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys
225					230					235					240
Asn	Pro	Thr	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe
				245					250					255	
Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile
			260					265						270	
Asn	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu
		275					280					285			
Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu
	290					295					300				
Glu	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln
305					310					315					320
Leu	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr
				325					330					335	
Lys	Ala	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys
			340					345						350	
Pro	Asn	Leu	Arg	His	Val	Trp	Lys	Val	Asn	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp
		355					360					365			
Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Arg	Leu	Leu	Trp	His
	370					375					380				
Gly	Thr	Asn	Val	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg
385					390					395					400
Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala
				405					410					415	
Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	Met	His	Cys	Gly
			420					425					430		
Gly	His	Gln	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Lys
		435					440					445			
Glu	His	His	Ile	Thr	Ile	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Pro	Pro
	450					455					460				
Gly	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	Gln	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro	Ala
465					470					475					480
Gln	Asp	Ile	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Gln	Pro	Val	Val	Val	Pro	Gln
				485					490					495	
Gly	Pro	Pro	Val	Gln	Cys	Pro	Ser	Phe	Lys	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Gln



500 505 510  
Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu  
515 520 525  
Leu Glu Ile His Leu  
530

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) Délka: 1587 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) negativní orientace: ne

(v) Původní zdroj:

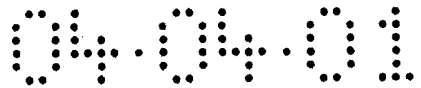
- (A) Organismus: Mus musculus

(ix) Znaky:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Poloha: 1..1584

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9

ATG GCT CCA AAA CGA AAG GCC TCT GTG CAG ACT GAG GGC TCC AAG AAG	48
Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys	
535 540 545	
CAG CGA CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG	96
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
550 555 560 565	
GCT CTC AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC	144
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
570 575 580	
TCA TGT CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT	192
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr	
585 590 595	
GAC TGT ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC	240
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe	
600 605 610	
TAT ATT ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT	288
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn	
615 620 625	
CGC TGG GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC	336
Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe	
630 635 640 645	



ACC TGC CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG 384  
Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu  
650 655 660

AAG ACT AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC 432  
Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro  
665 670 675

AAC AAG TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG 480  
Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu  
680 685 690

GCT GTA GTG AAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG GTC AAG CCC 528  
Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro  
695 700 705

TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC ATC TTC AGC 576  
Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser  
710 715 720 725

AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG GAT GTG AAG 624  
Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys  
730 735 740

AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC CGT GGC TTC 672  
Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe  
745 750 755

GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC ACA GGG GAT 720  
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp  
760 765 770

GGC CAG AGC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT GTC ATC CCA 768  
Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro  
775 780 785

CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC CCT GAT GTG 816  
His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val  
790 795 800 805

CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC ATC GAG TTG 864  
Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu  
810 815 820

GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG AAA GTG GAA 912  
Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu  
825 830 835

GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC AGG TGC CAG 960  
Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln  
840 845 850

CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA ATA CAG ACC 1008  
Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr  
855 860 865

TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC CTG CGG CAT 1056  
Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His

870		875		880		885	
GTT TGG AAA GTG AAC CGA GAA GGG GAG GGA GAC AGG TTC CAG GCC CAC							1104
Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His		890		895		900	
TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC AAT GTG GCC							1152
Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala		905		910		915	
GTG GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG CCA CAC TCG							1200
Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser		920		925		930	
GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG AAC AGC AAG							1248
Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys			940		945		
TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC CAG GTG GGC							1296
Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly			955		960	965	
TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC CAC ATC ACC							1344
Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr		970		975		980	
ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT GAC AGC GTC							1392
Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val		985		990		995	
ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC ATT GAA CTT							1440
Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu		1000		1005		1010	
GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG CCT GTG CAG							1488
Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln		1015		1020		1025	
TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA TAC CTC ATA							1536
Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile			1035		1040	1045	
TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG ATT CAC CTC							1584
Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu		1050		1055		1060	
TAA							1587

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10

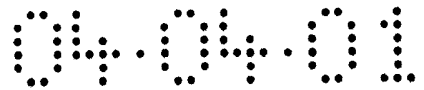
(i) vlastnosti sekvence:

- (A) Délka: 528 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10

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



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





- (A) Délka: 45 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ano

- (ix) Znaky:
  - (A) Jméno/klíč: Oblast
  - (B) Poloha: 16
  - (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Ser nebo Thr

- (ix) Znaky:
  - (A) Jméno/klíč: Oblast
  - (B) Poloha: 21
  - (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Ile nebo Val

- (ix) Znaky:
  - (A) Jméno/klíč: Oblast
  - (B) Poloha: 24
  - (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo 1 až 5  
dalších aminokyselin

- (ix) Znaky:
  - (A) Jméno/klíč: Oblast
  - (B) Poloha: 25
  - (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Ser nebo Thr

- (ix) Znaky:
  - (A) Jméno/klíč: Oblast
  - (B) Poloha: 6
  - (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Ser nebo Thr

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

Leu	Leu	Trp	His	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Leu	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Gly	Leu	Arg	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Lys	Gly
			20					25					30		
Ile	Tyr	Phe	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Lys	Ser	Ala	Xaa	Tyr			
			35				40					45			

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 14

- (i) Vlastnosti sekvence:
  - (A) Délka: 22aminokyselin
  - (B) Typ: aminokyselina
  - (C) Vlákňitost: jednoduchá
  - (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano

- (ix) Znaky:  
 (A) Jméno/klíč: Oblast  
 (B) Poloha: 1  
 (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Leu nebo Val

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu  
 20

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 15

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 27 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano

- (ix) Znaky:  
 (A) Jméno/klíč: Oblast  
 (B) Poloha: 21  
 (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Asp nebo Glu

- (ix) Znaky:  
 (A) Jméno/klíč: Oblast  
 (B) Poloha: 22  
 (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo 10 až 11  
 dalších aminokyselin

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

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Leu Xaa Xaa Xaa Trp Gly Arg Val Gly  
 20 25

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 16

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 29 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina



(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18

Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro  
 1 5 10 15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 17 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19

Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Leu

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 20 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 21

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 20 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano

(ix) Znaky:

- (A) Jméno/klíč: Oblast  
 (B) Poloha: 14  
 (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo 7 až 9  
 dalších aminokyselin

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21

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

Gly Xaa Xaa Val  
 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 22

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 16 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ano
- (ix) Znaky:  
 (A) Jméno/klíč: Oblast  
 (B) Poloha: 2  
 (D) Další informace: /poznámka=Xaa místo Tyr nebo Phe

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 23

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 20 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23

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

Leu Asn Glu Ser



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

Glu Ala Leu Lys  
 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 27

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 19 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ne  
 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 27

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

Ala Leu Lys

(2) Informace pro SEQ ID NO: 28

- (i) Vlastnosti sekvence:  
 (A) Délka: 19 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ Molekuly: peptid  
 (iii) Hypotetická: ne  
 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 28

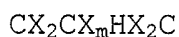
Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Ala Met Lys

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP), získaný z člověka nebo jiných zdrojů, který má aminokyselinovou sekvenci, která obsahuje

- a) funkční NAD<sup>+</sup> vazebnou doménu a
- b) neobsahuje sekvenci motivu zinkového prstu obecného vzorce



ve kterém

m je celé číslo od 28 nebo 30 a X jsou zbytky, kterými jsou nezávisle sobě jakékoli aminokyseliny.

2. Homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle nároku 1, ve kterém funkční NAD<sup>+</sup> vazebná doména obsahuje jeden z následujících obecných motivů:

PX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA,

(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA nebo

LLWHG(S/T)X<sub>7</sub>IL(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFAX<sub>3</sub>SKSAXY

ve kterých

n je celé číslo od 1 do 5 a X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny.

3. PARP homolog podle jednoho z předcházejících nároků, který obsahuje alespoň jeden z následujících motivů části sekvence:

LX<sub>9</sub>NX<sub>2</sub>YX<sub>2</sub>QLLX(D/E)X<sub>10/11</sub>WGRVG,  
AX<sub>3</sub>FXXKX<sub>4</sub>KTXNXWX<sub>5</sub>FX<sub>3</sub>PXK,  
QXL(I/L)X<sub>2</sub>IX<sub>9</sub>MX<sub>10</sub>PLGKLX<sub>3</sub>QIX<sub>6</sub>L,  
FYTXIPHXFGX<sub>3</sub>PP; a  
KX<sub>3</sub>LX<sub>2</sub>LXDIEXAX<sub>2</sub>L,

ve kterém X jsou zbytky, kterými jsou, nezávisle jeden na druhém, jakékoli aminokyseliny.

4. Homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vybraný z lidských homologů poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP), které mají aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 (lidský PARP2) nebo SEQ ID NO: 4 nebo 6 (lidský PARP3 typ 1 nebo typ 2); nebo myších homologů poly(ADP-ribóza) polymeráz (PARP), které mají aminokyselinovou sekvence SEQ ID NO:8 (myší PARP dlouhá forma) nebo SEQ ID NO:10 (myší PARP krátká forma).

5. Vazebný partner specifický pro homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vybraný ze souboru zahrnujícího

- a) protilátky a fragmenty protilátek,
- b) proteinům podobné sloučeniny, které interagují s částečnou sekvencí proteinu, a
- c) nízkomolekulární efektoary, které modulují katalytickou aktivitu PARP nebo jiné biologické funkce PARP molekuly.

6. Nukleová kyselina, zahrnující

- a) nukleotidovou sekvenci kódující alespoň jeden homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle jednoho z nároků 1 až 4 nebo komplementární nukleotidovou sekvenci

nukleotidové sekvence kódující alespoň jeden homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP);

b) nukleotidovou sekvenci, která hybridizuje se sekvencí podle bodu a) za stringentních podmínek; nebo

c) nukleotidovou sekvenci, která je odvozena z nukleotidových sekvencí definovaných v bodě a) a v bodě b) degenerací genetického kódu.

7. Nukleová kyselina podle nároku 6 obsahující

a) nukleotidy v poloze +3 až +1715 ukázané v SEQ ID NO:1;

b) nukleotidy v poloze +242 až +1843 ukázané v SEQ ID NO:3;

c) nukleotidy v poloze +221 až +1843 ukázané v SEQ ID NO:5;

d) nukleotidy v poloze +112 až +1710 ukázané v SEQ ID NO:7;  
nebo

e) nukleotidy v poloze +1 až +1584 ukázané v SEQ ID NO:9.

8. Kazetu exprese, která obsahuje pod genetickou kontrolou alespoň jedné regulační nukleotidové sekvence, alespoň jednu nukleotidovou sekvenci podle jednoho z nároků 6 a 7.

9. Rekombinantní vektor obsahující alespoň jednu kazetu exprese podle nároku 8.

10. Rekombinantní mikroorganismus, obsahující alespoň jeden rekombinantní vektor podle nároku 9.

11. Transgenní savec, obsahující vektor podle nároku 9.

12. PARP-deficitního savec nebo PARP-deficitní eukaryotická buňka, ve kterých je inhibovaná funkční exprese alespoň

jednoho genu, který kóduje PARP homolog podle jednoho z nároků 1 až 4.

13. Způsob *in vitro* detekce PARP inhibitorů, vyznačující se tím, že sestává z

- a) inkubace polyADP-ribozylovatelného cíle na nosiči nebo bez nosiče s reakční směsí, která obsahuje
  - a1) PARP homolog podle jednoho z nároků 1 až 4,
  - a2) PARP aktivátor; a
  - a3) PARP inhibitor nebo analyt, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho PARP inhibitoru;
- b) provedení polyADP ribozylační reakce; a
- c) kvalitativní nebo kvantitativní určení polyADP ribozylace cíle.

14. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) je preinkubován s PARP aktivátorem a PARP inhibitorem nebo analytem, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho PARP inhibitoru, před provedením polyADP ribozylační reakce.

15. Způsob podle jednoho z nároků 13 a 14, vyznačující se tím, že polyADP-ribozylovatelný cíl je protein histonu.

16. Způsob podle kteréhokoli z nároků 13 až 15, vyznačující se tím, že PARP aktivátor je aktivovaná DNA.

17. Způsob podle kteréhokoli z nároků 13 až 16, vyznačující se tím, že polyADP ribozylační reakce je spuštěna přidáním

NAD<sup>+</sup>.

18. Způsob podle kteréhokoli z nároků 13 až 17, vyznačující se tím, že polyADP ribozylace cíle na nosiči je určena za použití anti-poly(ADP-ribóza) protilátek.

19. Způsob podle kteréhokoli z nároků 13 až 17, vyznačující se tím, že cíl, který není na nosiči, je označen akceptorem fluoroforu.

20. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že polyADP ribozylace cíle, který není na nosiči, je určena za použití anti-poly(ADP-ribóza) protilátky, která je označená donorem fluoroforu, který je schopný přenosu energie na akceptor fluoroforu.

21. Způsob podle jednoho z nároků 19 a 20, vyznačující se tím, že cíl je histon s navázaným biotinem a akceptor fluoroforu se k němu kopuluje prostřednictvím avidinu nebo streptavidinu.

22. Způsob podle jednoho z nároků 20 a 21, vyznačující se tím, že anti-poly(ADP-ribóza) protilátka nese europium kryptát jako donor fluoroforu.

23. *In vitro* screeningový způsob pro vazebné partnery PARP molekuly, vyznačující se tím, že sestává z

- a1) imobilizace na nosiči alespoň jednoho homologu poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle jednoho z nároků 1 až 4;
- b1) uvedení v kontakt imobilizovaného homologu poly(ADP-

ribóza) polymerázy (PARP) s analytem, ve kterém se předpokládá přítomnost alespoň jednoho vazebného partnera; a

- c1) určení, tam, kde je to vhodné po inkubační periodě, složek analytu navázaných k imobilizovanému homologu poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP);

nebo

- a2) imobilizace na nosič analytu, který obsahuje alespoň jednoho možného vazebného partnera PARP molekuly;
- b2) uvedení v kontakt imobilizovaného analytu s alespoň jedním PARP homologem podle jednoho z nároků 1 až 4, pro který je hledán vazebný partner; a
- c2) prohlédnutí imobilizovaného analytu, jestli navázal homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP), tam, kde je to vhodné po inkubační periodě.

24. Způsob pro kvalitativní nebo kvantitativní určení nukleových kyselin kódujících homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle jednoho z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že sestává z

- a) inkubace biologického vzorku s definovaným množstvím exogenní nukleové kyseliny podle jednoho z nároků 6 a 7, hybridizace za stringentních podmínek, určení hybridizace nukleových kyselin a tam, kde je to vhodné, porovnání se standartem; nebo
- b) inkubace biologického vzorku s párem oligonukleotidových primerů se specificitou pro nukleovou kyselinu kódující

homolog poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP), amplifikace nukleové kyseliny, určení amplifikačního produktu a tam, kde je to vhodné, porovnání se standartem.

25. Způsob pro kvalitativní nebo kvantitativní určení homologu poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle jednoho z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že sestává z

- a) inkubace biologického vzorku s vazebným partnerem specifickým pro PARP homolog,
- b) detekce komplexu vazebného partnera/PARP a tam, kde je to vhodné,
- c) srovnání výsledku se standartem.

26. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že vazebným partnerem je protilátka nebo vazebný fragment protilátky, na kterou je navázaná detekovatelná značka, tam kde je to vhodné.

27. Způsob podle kteréhokoli z nároků 24 to 26 pro diagnózu chorob mediovaných nedostatkem energie.

28. Způsob pro určení účinnosti PARP efektorů, vyznačující se tím, že sestává z

- a) inkubace homologu poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP) podle jednoho z nároků 1 až 4 s analytem, který obsahuje efektor fyziologické nebo patologické PARP aktivity; opětovného odstranění efektoru, tam kde je to vhodné; a
- b) určení aktivity PARP homologu, tam, kde je to vhodné po přidání substrátů a kosubstrátů.

29. Kompozice genové terapie, vyznačující se tím, že obsahuje ve vehikulu přijatelným pro genovou terapii konstrukt nukleové kyseliny, který

- a) obsahuje nukleovou kyselinu opačné polaritě vzhledem ke kódující nukleové kyselině podle jednoho z nároků 6 a 7; nebo
- b) ribozym proti nukleové kyselině podle jednoho z nároků 6 a 7; nebo
- c) kóduje specifický PARP inhibitor.

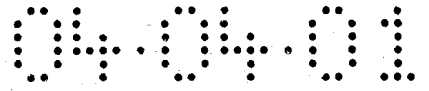
30. Farmaceutická kompozice vyznačující se tím, že obsahuje ve farmaceuticky přijatelném vehikulu, alespoň jeden PARP protein podle jednoho z nároků 1 až 4, alespoň jeden PARP vazebný partner podle nároku 5 nebo alespoň jednu kódující nukleotidovou sekvenci podle nároku 6 nebo 7.

31. Použití nízkomolekulárních PARP vazebných partnerů podle nároku 5 pro přípravu farmaceutických prostředků pro diagnózu nebo terapii patologických stavů ve vývinu a/nebo postupu, při nichž se účastní alespoň jeden PARP protein nebo od něj odvozený polypeptid.

32. Použití nízkomolekulárních PARP vazebných partnerů podle nároku 5 pro přípravu farmaceutických prostředků pro diagnózu nebo terapii patologických stavů, které mají původ v nedostatku energie.

Zastupuje:

dr. O. Švorčík



PV2000-4536

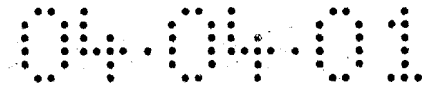
26142

	10	20	30	40	50	60	Majorita
1	H A E S D K L Y R V E Y A K S E R A S C K K C S E S I P K D S L R H A I M V Q S P H F D G K V P H W Y H P S C F W K V						lidská PARP1 lidská PARP2 lidská PARP3 myší PARP
1	H A J A R						
1	H S						
1	H						
	70	80	90	100	110	120	Majorita
61	G H S I R H P D V E V D G F S E L R W D D Q Q K V K K T A E A G U V T G K G Q D G I G S K A E K T L O D F A A E Y A K S						lidská PARP1 lidská PARP2 lidská PARP3 myší PARP
5							
3							
2							
	130	140	150	160	170	180	Majorita
121	N R S T C K G C H E K I E K G Q V R L S K K H V D P P K P Q L G H I D R H Y H P G C P V K N R E E L G P R P E Y S A S Q						lidská PARP1 lidská PARP2 lidská PARP3 myší PARP
20							
3							
2							
	190	200	210	220	230	240	Majorita
181	L K G F S L L A T E D K E A L K K Q L P O V K S E G X H K G D K V D G V D E V A K K X S K K E K D K D S K L E K A L K A						lidská PARP1 lidská PARP2 lidská PARP3 myší PARP
43							
3							
2							
	250	260	270	280	290	300	Majorita
241	Q N D L I W N I K D E L K K V C S T H D L K E L L I F N K Q O V P S G E S A I L D R V A D G H V F G A L L P C E E C S Q						lidská PARP1 lidská PARP2 lidská PARP3 myší PARP
68							
3							
2							

Obr. 1(1)

	Y C G	310	320	330	340	350	360	Majorita
301	Q L V P K S D A Y Y C T G D V T A H T K C M V K T Q T P N R K K E M V T P K E F R E I S Y L K K L K V K K Q D R I F P P E							lidská PARP1
88	K V G - K A H V Y C E G N							lidská PARP2
9				A P K P K P H V				lidská PARP3
2				A P K R K A 9 V				myši PARP
	T E G 5							Majorita
361	T S A S V A A T P P S T A S A P A A V H S S A S A D K P L S N H K I L T L G K L S R N K D E V K A H I E K L G G K L T	370	380	390	400	410	420	lidská PARP1
100								lidská PARP2
18	T E G P							lidská PARP3
11	T E G 5							myši PARP
				E K K K X R Q X X X E E D X P R S T A E A L				Majorita
421	G T A N K A S L C I S T K K E V E K M N K K M E E V K B A N I R V V S E D F L Q D V S A S T K S L Q E L F L A H I L S P	430	440	450	460	470	480	lidská PARP1
100								lidská PARP2
22				E K K K G R Q A O R E E D P P R S T A E A L				lidská PARP3
15				K K O R O T E E E D S F R S T A E A L				myši PARP
				K A X P A E X R X I R V D P X C P L S X N P O X Q V X E D				Majorita
481	H G A E V K A E P V E V A P R G K S G A A L S K K S K G Q V R E E G I H K S E K R M X K L T L K G G A A V D P D S G L E	490	500	510	520	530	540	lidská PARP1
100								lidská PARP2
44				K A I P A E K R I I R V D P T C P L S S N P G T O V Y E D				lidská PARP3
35				R A A P A D H R V I R V D P S C P F S R R N P G I Q V H E D				myši PARP
				V Y D C T L N Q T N I X H H N N K F Y I I Q L L E D D X - R F F X C W N R R W G R V G E - V G O S K				Majorita
541	H S A I I V L E K G G K V F S A T L G L V D I V K G T N S Y Y K L Q L L E D D K E N R Y M I F R S W O R V G T V I G S N K	550	560	570	580	590	600	lidská PARP1
100				D V Y D V M L N Q T H L Q P F N N M K Y Y L I Q L L E D D A Q R N F S V M H R W O R V G K X H - G Q H S				lidská PARP2
73				Y N C T L N O T H T I E H N N M K F Y I I Q L L Q D S N - R P F T C W N R R W G R V G E - V G Q S K				lidská PARP3
64				Y D C T L N O T H I J G N N N H K F Y I I Q L L E E G S - R P F - C W N R R W G R V G E - V G Q S K				myši PARP

Obr. 1(2)



L N H F T X - L E D A K E O F X K K F X E K T I K N H N E R D X F V K X P G K Y T T L L E V D Y - K X X E D E E A V V X - Majorita

610 620 630 640 650 660  
 601 L E O H P S K - E D A I E H F H K L Y E Z K T G N A W H S X M - F T Y X P K E R Y P L E I O V G - - - Q D E A A V K X - I d s k á P A R P 1  
 149 L V A C S G H L N X A K A K E I O K F L L O K T Y M H M F K B X K F L O X Y D R I U H U J A T N T Q D E E L E T K X E - I d s k á P A R P 2  
 119 I N H F T R - L E D A X X D E K K F E K T K N N H A Z E R O M F V S H P Q K Y T L I B V O - - A B D E A Q E A A V V K - I d s k á P A R P 3  
 103 H N H F T C - L E D A K K D K K K F N E K R K R E E R D R L V A Q E N K Y T L I E V O - - G E A E S Q E A A V V K A - m y š i P A R P

- S L X V D X G P Y S T V X K R V Q P C S L D P A T O X L I T N I F S V E H P K N A H L X L D V X K K P L G K L S K Majorita

670 680 690 700 710 720  
 655 - - L T V N P G I K S K L P K P V O - - - - - D L I X X I P D V E S N K K A H V E Y E I D L O X K H P L G K L S K I d s k á P A R P 1  
 209 E S L K S P L K P E L S O L D L R V O - - - - - E L I K L C R U O A M F E H M E H K K Y N T K A P L G K L T V I d s k á P A R P 2  
 125 - - - - - D H G P P V H T V T R V O P C S L D P A T O K L I T N I F S R E M T H A H D L O V K K N P L G K L S K I d s k á P A R P 3  
 166 L S P O V D S G P P V R T V V N - - - P C S L D P A T O K L I T N I F S R E M T H A H D L O V K K N P L G K L S K m y š i P A R P

Q Q I A A G F E A L E A L E E A X X X G T X C C O S L E E L S S X P Y T T V I P U D F G X S X P P L I N S P D X K L Q A K X Majorita

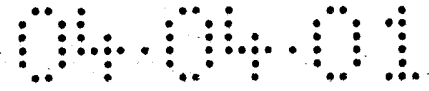
730 740 750 760 770 780  
 704 R O I Q A A Y S I L S E V Q Q A V S O S S D S Q I L D - L S N R F Y T L I P H D F G H K K P P L L N N A D S V Q A K V I d s k á P A R P 1  
 260 A Q J R A G O V S L K K I E D C I R A G O H O F A L H E - A C W E P Y T R I P H D F G L R T P P L I R T O K E L S E M I I d s k á P A R P 2  
 231 Q O J A R G F E A L E A L E E A L K G P T D G O S E E L S S H P Y T V I P H N F O H S O P P I N S P E L L O A K X I d s k á P A R P 3  
 223 Q O J A R G F E A L E A L E E A M K N P T G G O S E E L S S C E Y T V I P H N F O H S R E P P I N S P D V L O A K X m y š i P A R P

D H L L V L A D I E L A Q X L Q A X X X E X S X K V E R P H P L D R D Y Q L L K C O L O L L D S G S X E Y K V I O T Y Majorita

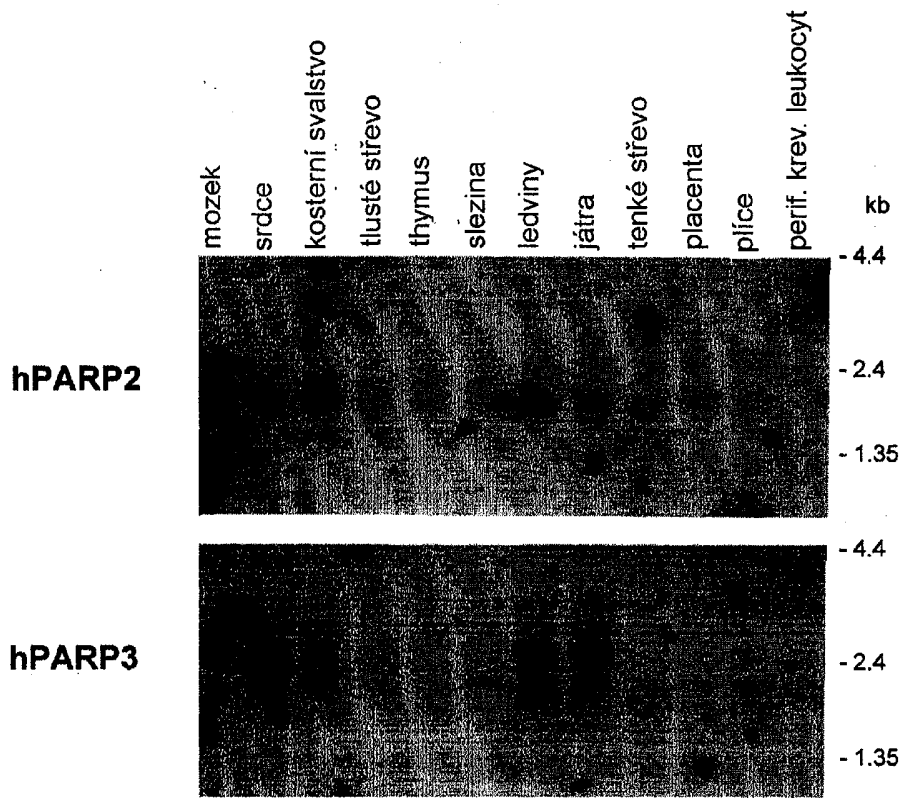
790 800 810 820 830 840  
 763 E H L U N L D I E V A Y E L L R G O S D B G S K - - - - - D R I D V N V E K X T D I K V V D A D S E A E L J R K Y I d s k á P A R P 1  
 319 Q L L E A L G O J E T A I K L V R T S G - G I P E - - - - - M D O M V R M M C A G R P L D H E S T F I F K V I S O Y I d s k á P A R P 2  
 291 D M L L V L A D I E L A Q A L O A V S - E Q E K T V E P H H D H D V O D L X C O L Q L L D S O A P E Y K V I O T Y I d s k á P A R P 3  
 283 D H L L V L A D I E L A Q T L Q A A P O E E E E K X V E S V P H L D R D Y O L L R C O L Q L L D S O E S E Y K A L Q O T Y m y š i P A R P

L K Q T G A X T H C P Y - - - T L X D I P K V R E G E Z D R F O A U S K L O N R L L L H O S N H A V V A G I L S S G L Majorita

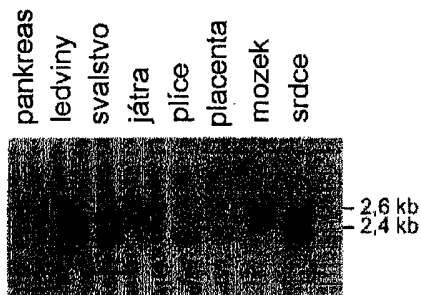
850 860 870 880 890 900  
 818 V X N T H A T T H N A Y D L E V I D I F K I E R E G E C O A X K P F K Q C H N R R L L W H O S R T T H F A O I L S O O I d s k á P A R P 1  
 373 K Q S T H A P T H S O V T T H T L L D L E V L E K D G E K E A F R - - E D L H N R R L L W H G S H S H M V O I L S T H G L I d s k á P A R P 2  
 350 L E O T G S N H R C P - - - T L Q H I M R V N O E O E E D R P O A H S K L U O M A K L L L H H G T N H A V V A I U T S G L I d s k á P A R P 3  
 343 L K O T G N S Y R C P - - - N L R H V H K V N S E G E O D R P O A H S K L U O M A K L L L H H G T N H A V V A I U T S G L m y š i P A R P



RIAPHEAP - S C R V G K O I Y P A S E N S K S A G Y V X T S X C O G H X V O L H L D O E V A L G X E H E L X X A Majonita  
 910 920 930 940 950 960  
 878 RIAPPEAPVTGYMFGKGIYFADNYSKSAHYCMTSD - GDEFLLLEVALGMBYELKVA ikaska P ARP1  
 431 RIAPPEAPITTOYHFGKGIYFADNYSKSAHYCMTSD - LKHTO L L L E V A L G O C N R E L E A ikaska P ARP2  
 407 RIHPH - - - S C R V G K O I Y P A S E N S K S A G Y V X T S X C O G H X V O L H L D O E V A L G X E H E L X X A ikaska P ARP3  
 400 RIHPH - - - S C R V G K O I Y P A S E N S K S A G Y V X T S X C O G H X V O L H L D O E V A L G X E H E L X X A mysi P ARP  
 N P S L K S L P P O K D S V I G L G K T E P D P A O D I E L E L D G G V V P L O P P V X C O K F X S S X F S L - Y S Majonita  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 936 SHLSK - L P K G K H S V K G L G K T P D E S A N I S L D - - - G V D V P L O T G I S S O V - - - N D T S L L Y M ikaska P ARP1  
 489 NPKAEG L L O G A H S T K G L O K H A P I S S A H F V T L N - - - G S T V P L G P A S D T G I L N P D G Y T L H Y M ikaska P ARP2  
 463 N P S L K S P P P G F D S V I A R G H T E P D P T O D T E L E L D O O V V P G G P P V P C P E F S S T F S O - - - S ikaska P ARP3  
 456 D P S L K S P P P G F D S V I A R G H T E P D P T O D T E L E L D O O P V V P G G P P V P C P S F K S S P S O - - - S mysi P ARP  
 E Y L V Y X E S Q V R L R Y L L E V H F N F - X X L W -  
 1030  
 988 E Y I V Y D I A Q V N L L Y L L K L K F N F X T S L M ikaska P ARP1  
 545 E Y I V Y N F N O V R H R T L L D V O E N F - L O L W ikaska P ARP2  
 521 E Y L I Y O E S O C A C R Y L L E V N G - - - - - - - L ikaska P ARP3  
 514 E Y L I Y K E S O C R L R Y L L E T H - - - - - - - L mysi P ARP

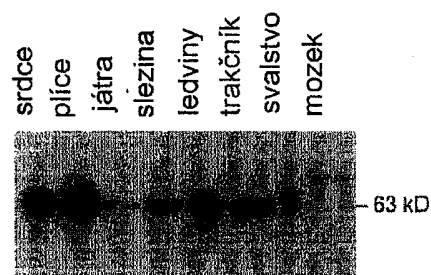


Obr. 2



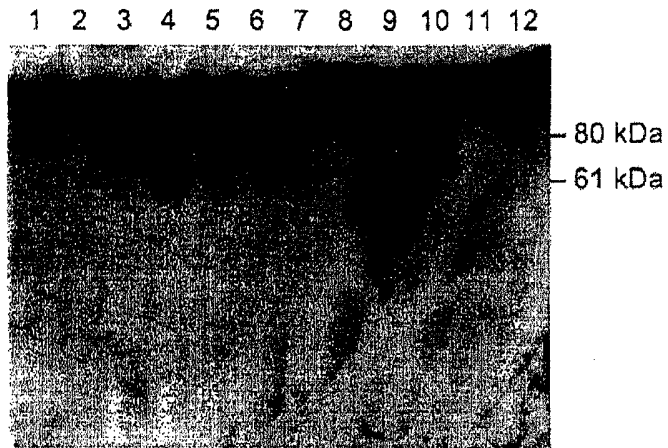
Analýza Northern blot  
Tkáňová distribuce lidské PARP3

Obr. 3

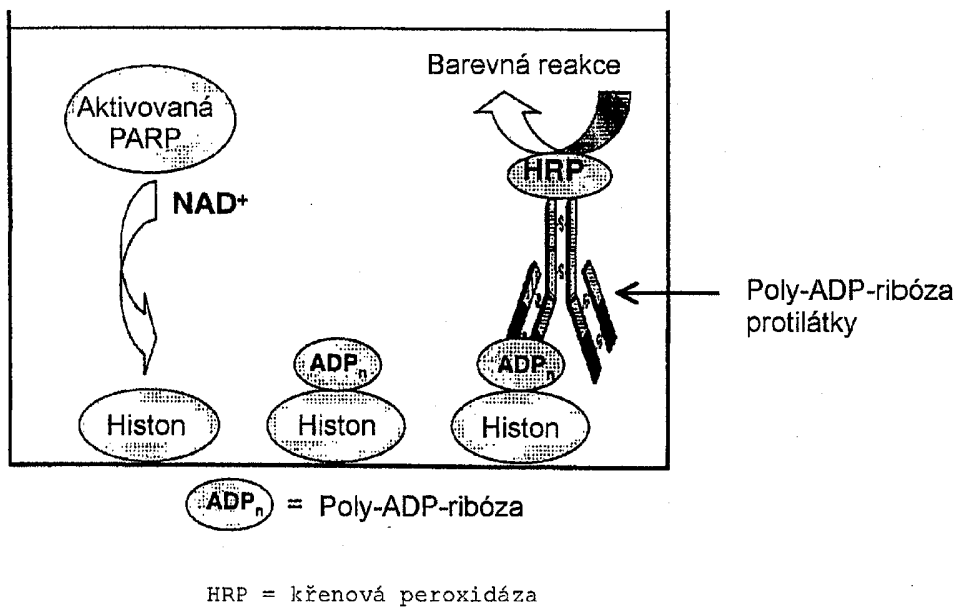


Analýza Western blot  
Tkáňová distribuce PARP3

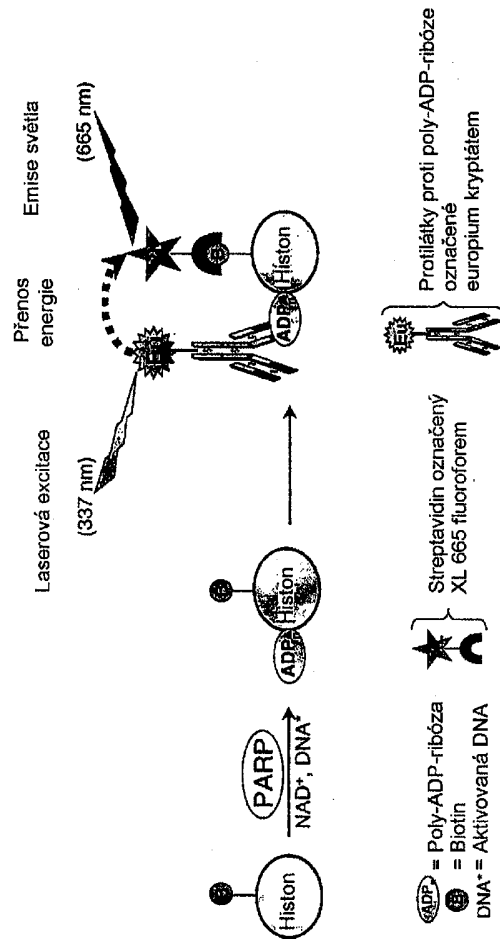
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7