NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **313103** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 12 Q 1/02

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19903494	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1989.02.09, PCT/US89/00462
(22) Inng. dag	1990.08.08	(85) Videreføringsdag	1990.08.08
(24) Løpedag	1989.02.09	(30) Prioritet	1988.02.10, US, 154206
(41) Alm. tilgj.	1990.10.01		
(45) Meddelt dato	2002.08.12		

(71) Patenthaver Housey Pharmaceuticals Inc,
16800 West Twelve Mile Road, Suite 201, Southfield, MI 48076, US

(72) Oppfinner Gerard M Housey, New York, NY 10032, US

(74) Fullmektig Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for screening for proteininhibitorer og aktiveringsmidler, samt testceller og testkit**

(56) Anførte publikasjoner US 4532204, US 4480038

(57) Sammendrag

Inhibitorer og aktiveringsmidler til et protein hvor ekspresjonen påvirket et fenotypisk karaktertrekk til cellen, spesielt et dyrkningskaraktertrekk eller morfologisk karaktertrekk, blir identifisert ved deres mer uttalte virkning på celler som produserer høyere, vanligvis ikke-naturlig forekommende, nivåer av proteinet, enn på celler som produserer lite eller ikke noe av proteinet. I en foretrukket analyse er virkningen observarbar med det blotte øye.

Ved hjelp av denne fremgangsmåten er tamoksifen identifisert som en inhibitor til proteinkinase-C-aktiviteten i cellekultur.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en generell screenings-metode for oppdagelse og identifikasjon av både inhibitorer og aktiveringsmidler til enzymer, reseptorer og andre proteiner. Den vedrører spesielt en fremgangsmåte for screening for forbindelser som spesifikt inhiberer eller aktiverer et spesielt protein som påvirker kulturelle eller morfologiske kjennetegn til cellen som uttrykker proteinet, spesielt på en måte som er innlysende sett med det blotte øye.

Et antall analysesystemer er for tiden i bruk for oppdagelse av nye modulatorer av cellevekst, og spesielt ved granskning for nye anti-cancer-medikamenter som er spesifikt toksiske overfor cancerceller, men ikke normale celler. Forskjellige forandringer kan trekkes frem, men de vanligste er reversering av transformert fenotype, signifikante forandringer i cellemorfologi eller cytotoksisitet. Analysene omfatter: (1) in vitro cytotoksiske analyser; (2) soft agar-kolonidannelsesanalyser; (3) in vitro anti-mikrobielle analyser; og (4) analyser som påviser forandringer i cellulær morfologi.

In vitro cytotoksiske analyser omfatter måling av cellulære parametre som viser inhibisjon av cellulær vekst eller cytotoksisitet. Disse omfatter for eksempel måling av inhibisjon av visse cellulære metabolske reaksjonsveier i respons til behandling med cytotoksiske midler. Artiklene til Von Hoff, et al. (1985) og Catino, et al. (1985) beskriver typiske fremgangsmåter som anvender denne teknikken. Disse fremgangsmåtene er noe omfattende rent teknisk, og krever anvendelse av radioaktive markører i noen av tilfellene. Resultatene er videre uspesifikke på grunn av at et hvilket som helst middel som endrer vekstegenskapene til cellene vil skåre positivt i disse analysesystemene.

Midler er også blitt undersøkt for deres evne til å inhibere transformerte (cancerholdige) celler fra å vokse i soft agar. Denne fremgangsmåten er basert på funnet til Freedman og Shin

(1974) angående funnet av cellekolonier i soft agar er in vitro-testen som viser høyest korrelasjon når det gjelder å forutse om cellene vil være tumorigene i et eksperimentelt dyr. Denne fremgangsmåten er relativt enkel å utføre på grunn av at koloniveksten vil, etter to eller flere uker, generelt være stor nok til å bli sett med det blotte øye. Bestemmelse av de endelige resultatene kan derfor bli utført enten av en tekniker uten omfattende opplæring i vevskultur, eller som beskrevet i foreliggende søknad, av et automatisert absorbans-detekterende system. I foreliggende form er foreliggende fremgangsmåte også uspesifikk av grunner som beskrevet ovenfor. Med andre ord, vil et hvilket som helst middel som inhiberer cellulær vekst på en hvilken som helst måte bli registrert positivt i dette analysesystemet slik det blir anvendt nå, uansett om det hemmer proteinet av interesse.

In vitro anti-mikrobielle analyser omfatter anvendelse av bakterielle- eller gjærstammer som blir anvendt som testorganismer for screening etter midler med generalisert vekstinhibitoriske egenskaper (også beskrevet i Catino, et al., 1985). I denne fremgangsmåten blir den bakterielle- eller gjærstammen dyrket på standard mediumskåler og potensielle midler blir anvendt på forskjellige flekker på skålene. Dersom et middel har vekstinhibitoriske egenskaper, fremkommer en klar sone hvor det ble applisert på skålen, som et resultat av teststammens manglende evne til å vokse i området. Denne fremgangsmåten er hurtig og kan bli utført av en tekniker uten omfattende opplæring i vevskulturteknikker, men resultatene er generelt uspesifikke på grunn av midler som er effektive overfor bakterielle- eller gjærstammer ofte er mindre effektive (eller fullstendig ueffektive) i modulering av veksten til pattedyrceller, som vist i artikkelen til Catino et al., (1985).

Ytterligere andre screeningssystemer avhenger av en morfologisk endring av testcellene ved utsetting for potensielle midler for å bestemme effektiviteten til et gitt middel.

Denne fremgangsmåten er for tiden den mest effektive for utvikling av spesifikke midler som reagerer med et gitt protein eller endrer en spesifikk cellulær egenskap, som vist ved den representative artikkelen til Uehara, et al. (1985). Disse screeningssystemene er derimot de mest vanskelige å anvende i praksis, på grunn av at den morfologiske effekten av hvert individuelt middel på testcellene må bli studert under mikroskopet. Denne fremgangsmåten krever derfor omfattende observasjoner av cellene av en trenet vitenskaps-person.

Fremgangsmåten presentert i detalj i foreliggende beskrivelse kombinerer hurtighet og lett utførelse av soft agar-analysen med en spesifisitet for påvisning av et aktivt middel som overskrider den til den morfologiske analysen. Fremgangsmåten beskrevet heri omfatter dannelsen av en cellelinje med hensikt omkonstruert for å påvise både stimulerende og inhibitoriske midler som er absolutt spesifikke for et gitt protein som påvirker kulturelle eller morfologiske karakter-trekk til cellen.

Grunnlaget for foreliggende oppfinnelse er observasjonen om at dersom et protein ("protein av interesse", eller POI) som er involvert på en eller annen måte i cellulær vekstkontroll, blir overprodusert i cellene kan farmakologiske midler som aktiverer eller inhiberer POI resultere i endrede vekstegen-skaper til cellene.

Sensitiviteten til cellene er avhengig av deres produksjon av POI, et fenomen betegnet heri som "gradert cellulær respons" overfor det farmakologisk aktive middelet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et hurtig, men kraftfullt screeningssystem for oppdagelse og identifikasjon av både inhibitorer og aktiveringsmidler til proteinene. Fremgangsmåten kan bli anvendt til omtrent en hvilken som helst proteintype, inkludert enzymer, reseptorer, DNA- eller

RNA-bindende proteiner, eller andre som er direkte eller indirekte involvert i regulering av cellulær vekst.

Fremgangsmåten omfatter innskudd av en DNA (eller cDNA)-sekvens kodende for proteinet av interesse (POI) inn i en hensiktsmessig vektor og dannelse av cellelinjer som inneholder enten (1) bare ekspresjonsvektoren ("kontroll"-cellelinjer) eller (2) ekspresjonsvektoren inneholdende den inskutte DNA (eller cDNA)-sekvensen kodende for POI ("test"-cellelinjer). Ved anvendelse av hensiktsmessig vektorsystem, mottakercellelinjer og vekstbetingelser, kan testcellelinjer som stabilt overproduserer det tilsvarende POI bli dannet. Under hensiktsmessige vekstbetingelser har disse cellelinjene en "gradert cellulær respons" overfor aktiveringsmidler eller inhibitorer til POI. Et screeningssystem kan dermed bli satt opp hvor kontroll og testcellelinjene blir dyrket i definerte vekstbetingelser i vevskulturskåler (eller til og med i eksperimentelle dyr) og et stort antall forbindelser (eller råforbindelser som kan inneholde aktive forbindelser) kan bli screenet for deres virkninger på POI.

Forbindelser som inhiberer eller aktiverer POI kan påvirke karaktertrekk så som veksthastighet, tumorigent potensiale, anti-tumorigent potensiale, anti-metastatisk potensiale, cellemorfologi, antigenekspresjon og/eller forankringsuavhengig vekstevne. Forbindelser som spesifikt hemmer eller inaktiverer POI kan skjelnes fra forbindelser som påvirker cellemorfologi eller vekst ved andre mekanismer på grunn av at de vil ha en større innvirkning på testlinjene enn på kontroll-linjene.

Systemet er blitt testet ved anvendelse av flere cDNA-sekvenser og flere mottakercellelinjer, og kan lett bli automatisert.

Vedlagte krav er inkorporert som referanse for oppstilling av foretrukne utførelsesformer.

Figur 1A viser full-lengde cDNA-sekvensen, og avledet aminosyresekvens, av en av flere former av PKC som tidligere er blitt isolert (cDNA klon RP58), og hvor delsekvensen er blitt rapportert (Housey, et al., 1987). Den er i samsvar med PKCbeta1 ifølge nomenklaturen til Ono, et al. (1987). Den avledede aminosyresekvensen begynner med det første leseramme metioninkodonet ved nukleotidposisjon 91 og koder for et 671 aminosyreprotein med en antatt molekylvekt på 76,8 kd. Et konsensus polyadenyleringssignal er understreket.

Figur 1B viser retrovirus-avledet cDNA ekspresjonsvektor, utviklet i dette laboratoriet, som ble anvendt for foreliggende studier. Full-lengde RP58 cDNA kodende for PKCbeta1 (vist i 1A) ble klonet inn i Eco RI-setet til plasmid pMV7. Den skraverte regionen representerer kodende sekvens. "E" og "P" betegner Eco RI og Pst I restriksjonsseter, respektivt. Angitte størrelser mellom restriksjonssetene i RP58 cDNA er gitt i kilobaser. "LTR" betegner 5' (venstre) og 3' (høyre) lange terminale gjentakelser til Moloney murin leukemi-virus, og "TK-neo" betegner promoterregionen til HSV tymidin kinase-genet koblet til 5' enden av det bakterielle neomycin fosfotransferase (neo)-genet.

Figur 1C viser i skjematisk form strategien anvendt for å danne cellelinjer som stabilt overproduserer PKC.

Figur 2. Rensing og autofosforylering av PKC. PKC-aktiviteten fra hver cellelinje ble renset og utsatt for reaksjonsbetingelser som fremmer autofosforylering av PKC. Etter autofosforyleringsreaksjonen ble proteinprøver separert ved diskontinuerlig polyakrylamid-gelelektroforese. I kolonner med oddetall inneholdt reaksjonsblandingene 1 mM Ca^{2+} og fosfatidylserin for å aktivere PKC, og i kolonnene med partall inneholdt reaksjonsblandingene 1 mM EGTA, 100 ng/ml TPA og fosfatidylserin. Tallene i venstre kolonne angir størrelsene til molekylvektsmarkørene i kd. Piler angir posisjonen til 75 kd autofosforylert PKC.

Figur 3. Northern Blot-hybridiseringsanalyse. Poly A+ RNA ble isolert fra angitte cellelinjer og separert ved elektroforese på 6% formaldehyd/1% agarosegeler, blottet på nylonmembran og hybridisert med 32P-merket full-lengde RP58 cDNA-probe, som tidligere beskrevet (Housey, et al., 1987). Tallene til høyre angir størrelsene i kb til RNA-markører. R6-PKC4-prøven utviser et meget svakt 4,8 kb bånd på original autoradiograf.

Figur 4. Morfologiske responser til cellelinjer overfor forbolester-behandling. Nesten sammenløpende kulturer av de tre angitte cellelinjene ble utsatt for 100 ng/ml TPA i 0,1% dimetylsulfoksid (DMSO) oppløsningsmiddel ("+TPA") eller 0,1% DMSO alene ("-TPA"), i DMEM pluss 10% CS. Bilder ble tatt 24 timer senere (panelene A og D) og 48 timer senere (panelene B og E). Friskt medium pluss eller minus TPA ble deretter tilsatt og bilder deretter tatt ytterligere 24 timer senere (panelene C og F). (Forstørrelse: 100X).

Figur 5. Vekstkurver for kontroll og PKC-overproduserende cellelinjer. Angitte cellelinjer ble sådd ut i 1 x 10^4 pr. 6 cm skål i DMEM pluss 10% CS, i nærvær ("+TPA") og fravær ("-TPA") av 100 ng/ml TPA. Celleantallet ble bestemt i replikatskåler i løpet av den påfølgende 11 dager lange vekstperioden. Angitte verdier angir gjennomsnittet til triplikatbestemmelser, som varierte med mindre enn 10%.

Figur 6. Post-konfluens Foci-dannelse. Kontroll R6-C2-celler (panel A) og R6-PKC3-celler (panelene B og C) ble dyrket til sammenløp og deretter opprettholdt for ytterligere 28 dager i DMEM pluss 10% CS (uten TPA), med tilsetning av friskt medium hver 3. dag. Bilder ble tatt på slutten av perioden på 28 dager. Forstørrelse: 40X.

Figur 7. Vekst i soft agar. Cellelinjene R6-C1, R6-PKC3 og R6-PKC5 ble sådd ut på 60 mm petri-skåler i 0,3% agar inneholdende DMEM plus 20% FBS og 50 lg/ml G418, pluss eller minus 100 ng/ml TPA. Bilder ble tatt etter 21 dagers vekst.

A) R6-C1 + TPA (felt med lav kraft) B) R6-C1 + TPA (felt med middels krav) C) R6-PKC3 D) R6-PKC3 + TPA E) R6-PKC5 F) R6-PKC5 + TPA. For ytterligere detaljer se eksperimentelle prosedyrer. (Forstørrelse: 100 X i panel B; 40 X i alle andre paneler).

Foreliggende fremgangsmåte skal anvendes for identifisering av potensielle kjemiske inhibitorer eller aktiveringsmidler til enzymer, reseptorer eller hvilke som helst proteiner som virker inn på cellefenotypen. Denne fremgangsmåten krever to cellelinjer, fortrinnsvis like med unntakelse av deres ekspresjon (produksjon) av proteinet av interesse i forskjellige nivåer (og eventuelle ytterligere forskjeller som er nødvendige ved forskjellen i ekspresjon). Inhibitorer eller aktiveringsmidler er identifisert ved deres større virkning på fenotypen til høyere produserende cellelinje.

Et hvilket som helst fenotypisk kjennetegn til cellen som blir påvirket av ekspresjon av protein av interesse, annet enn selvfølgelig nivået av selve proteinet, kan bli analysert. Det fenotypiske karaktertrekket er fortrinnsvis et "dyrknings" eller "morfologisk" karaktertrekk til cellen. På grunn av vedlagte krav er betegnelsene definert som følger:

Dyrkningskjennetegn omfatter, men er ikke begrenset til, næringsmidler som er nødvendig for vekst, næringsmidler som, selv om de ikke er nødvendige for vekst, markert fremmer veksten, fysiske betingelser (temperatur, pH, gassholdig miljø, osmotisk tilstand og forankringsavhengighet eller -uavhengighet) til kulturen som påvirker veksten, og forbindelser som hemmer veksten eller til og med dreper cellene.

Morfologiske kjennetegn, men er ikke begrenset til å omfatte størrelse og form av cellene, deres arrangementer, celledifferensiering og subcellulære strukturer.

Når proteinet av interesse er implisert i tumorigenese eller relaterte fenomener er det observerte karaktertrekket fortrinnsvis et vedrørende cellulær vekstkontroll, differensiering, de-differensiering, karsinogen transformasjon, metastase, tumorigenese eller angiogenese.

Fenotypiske forandringer som kan observeres med det blotte øye er av spesiell interesse. Forandringer i evnen som cellene har til å vokse på en forankrings-uavhengig måte, vokse i soft agar, danne foci i cellekultur og å ta opp valgte stammer er spesielt hensiktsmessige fenomen for observasjon og sammenligning.

Den høyere produserende cellelinjen blir fortrinnsvis oppnådd ved innføring av et gen kodende for proteinet av interesse (POI) inn i en vertscelle. Genet kan være et som er isolert fra genomet til en organisme, et cDNA preparert fra et mRNA-transkript isolert fra en organisme, eller et syntetisk duplikat av et naturlig forekommende gen. Det kan også ha en sekvens som ikke oppstår nøyaktig i naturen, men korresponderer med en mutasjon (enkel eller multippel) av en naturlig forekommende sekvens. Ingen begrensning er antatt på måten hvorpå denne muterte sekvensen er oppnådd. Genet er operabelt bundet til en promoter med genekspresjon som er funksjonell i verten, slik at det korresponderende protein av interesse (POI) blir stabilt "overprodusert" i mottakercellene i varierende grad. Promoteren kan være konstitutiv eller induserbar. Med "overprodusert" menes at POI blir uttrykt i høyere nivåer i den genetisk manipulerte cellelinjen enn i den opprinnelige cellelinjen. Dette muliggjør dannelsen av cellelinjer som inneholder (eller utskiller) fra så lite som noen få ganger til mer enn 100-ganger forhøyede nivåer av POI relativt til kontrollcellene.

En hvilken som helst fremgangsmåte kan bli anvendt for å innføre genet inn i vertscellen, inkludert transfeksjon med en retroviral vektor, direkte transfeksjon (f.eks. mediert av

kalsiumfosfat eller DEAE-dekstran) og elektroporasjon. En retroviral vektor blir fortrinnsvis anvendt.

Vertscellene bør utvise en lett observerbar fenotypisk forandring som et resultat av forsterket produksjon av POI. Denne responsen bør fortrinnsvis være proporsjonal med produksjonsnivået til POI. Cellene bør ikke spontant manifistere ønsket fenotypisk forandring. For eksempel danner 3T3-celler spontant foci. Blant foretrukne cellelinjer er Rotte-6 fibroblaster, C3H10T 1/2 fibroblaster og HL60. (HL60 er en human cellelinje som differensieres i respons til PKC-aktivering). 3T3-celler kan bli anvendt, men med reservasjonen angitt ovenfor.

Generelt er det foretrukket å maksimalisere forholdet mellom produksjon til "overproduserende" cellelinje og produksjon til "nativ" linje. Dette blir lettet ved valg av en vertscellelinje som produserer lite eller ikke noe POI, og innføring av multiple genkopier og/eller anvendelse av promotere med høy signalstyrke.

Rotte 6 embryo-fibroblastcellelinje er en variant av rotte-embryo-fibroblastcellelinjen etablert av Freeman et al., (1972) og isolert av Hsiao et al., 1986. Denne cellelinjen har en unaturlig flat morfologi, selv når den blir opprettholdt i kultur ved post-konfluens i lengre tidsperioder, utviser forankringsavhengig vekst og har ikke gjennomgått spontan transformasjon. Den var også ideell for disse studiene på grunn av at den har et meget lavt nivå av endogen PKC-aktivitet og et lavt nivå reseptorer med høy affinitet for forbolestere.

Den mest foretrukne vertscellelinjen er Rotte-6 fibroblastcellelinjen, men foreliggende fremgangsmåte er også blitt undersøkt med andre celletyper, inkludert muse NIH-3T3-cellelinjen samt C3H 10T1/2-cellelinjen. Tabellene 1(a) og (b) nedenfor viser de representative spesifikke aktivitetene

til syv NIH-3T3 og seks C3H-10T1/2 cellelinjene som stabilt overproduserer PKC. Det er også i den senere tid blitt utført samme eksperimenter med den humane HeLa-cellelinjen. I hvert tilfelle utviste de resulterende cellelinjene alle vekstegenskaper kvalitativt identiske med de som er beskrevet for PKC-uttrykkende Rotte-6-fibroblastcellelinjene. Disse resultatene viser derfor klart at mange forskjellige celletyper kan bli anvendt i foreliggende fremgangsmåte. Eksperimentelle prosedyrer anvendt for å danne disse cellelinjene var også identiske med de som ble anvendt sammen med Rotte-6 cellelinjen.

Dersom en cellelinje som ellers er egnet for anvendelse som en kontrollcellelinje produserer omfattende POI, er det mulig å inhibere denne produksjonen ved inkorporering av en kjent inhibitor inn i kulturmediet for både kontroll og testcellelinjene, for dermed å oppnå et mer ønskelig produksjonsforhold. Dersom derimot nivået av POI-produksjon til testcellelinjen er for lav, kan et kjent aktiveringsmiddel bli inkorporert inn i kulturmediet.

Det er ønskelig, men ikke nødvendig, at en antatt inhibitor eller aktiveringsmiddel blir undersøkt på både en kontrolllinje og en overproduserende linje parallelt.

Det som blir søkt er en <u>økning</u> i fenotypisk forandring som blir utvist av cellen som blir høyere med økende ekspresjon av POI. Dette blir betegnet en "gradert cellulær respons", og det er ved denne spesialiserte responsen som skjelner inhibitorer eller aktiveringsmidler til POI fra midler som virker på andre cellemetabolitter for å oppnå en fenotypisk forandring.

I en foretrukket utførelsesform blir cellelinjene derfor analysert for deres relative nivåer av POI, og deres evne til å vokse i forankrings-uavhengige systemer (f.eks. matriser så som soft agar eller metocel), for å danne små "foci" (områder

med tette grupper av celler som er sammenhopet og vokser oppå hverandre) i vevskulturskåler, for å ta opp valgte stammer, eller å binde et hensiktsmessig merket antistoff eller annen reseptor for en celleoverflateepitope. I tillegg til å utvise disse vekstkontroll-abnormalitetene, vil slike cellelinjer også være sensitive i deres vekstegenskaper overfor kjemiske midler som kan bindes til, eller modifisere biologiske virkninger av, POI.

Fremgangsmåten er spesielt unik på grunn av at den kan bli anvendt for å hurtig lete etter enten aktiveringsmidler eller inhibitorer for et gitt POI, avhengig av hva som er nødvendig. Betegnelsen "aktiveringsmidler" som anvendt heri, omfatter både forbindelser som er nødvendige for at POI blir aktiv, og forbindelse som aksentuerer dets aktivitet. Betegnelsen "inhibitorer" omfatter både forbindelse som reduserer aktiviteten til POI og de som avbryter den fullstendig. Når et POI har mer enn en mulig aktivitet, kan inhibitoren eller aktiveringsmiddelet modulere en hvilken som helst eller alle dets aktiviteter.

Anvendelse av denne screeningsmetoden for å identifisere inhibitorer eller aktiveringsmidler til enzymer er av spesiell interesse. Det er av spesiell interesse å anvende den for å identifisere inhibitorer eller aktiveringsmidler av enzymer involvert i tumorigenese og beslektede fenomener, for eksempel proteinkinase C, ornitin-dekarboksylase, cyklisk AMP-avhengig proteinkinase, proteinkinase-domener til insulin og EGF-reseptorer, og enzymproduktene til forskjellige cellulære onc-gener så som c-src ($PP60^{src}$) eller c-ras ($P20^{ras}$) gener.

Proteinkinase C (PKC) er en Ca^{2+}- og fosfolipid-avhengig serin/treonin-proteinkinase av fundamental viktighet i cellulær vekstkontroll. PKC blir aktivert endogent av forskjellige vekstfaktorer, hormoner og neurotransmittere, og er blitt vist å være en reseptor med høy affinitet for

forbolester-tumorpromotere samt andre midler som har tumorfremmende aktivitet (for oversikt se Nishizuka 1986; 1984; Ashendel, 1984). PKC er blitt vist å fosforylere flere intracellulære proteinsubstrater, inkludert epidermal vekstfaktor (EGF) reseptor (Hunter et al., 1984), pp60src (Gould et al., 1985), insulinreseptor (Bollag et al., 1986), p21 ras (Jeng et al., 1987) og mange andre (Nishizuka, 1986). Flere laboratorier har nylig isolert cDNA-kloner som koder for bestemte former av PKC, som dermed demonstrerer at PKC blir kodet av en multigen-familie (Ono et al., 1986, Knopf et al., 1986, Parker et al., 1986; Coussens et al., 1986; Makowske et al., 1986; Ohno et al., 1987; Housey et al., 1987). De multiple formene av PKC utviser betraktelig spesifisitet (Knopf, et al., 1986; Brandt et al., 1987; Ohno et al., 1987; Housey, et al., 1987) som foreslår at det kan være subtile forskjeller i funksjon(er) til hver av de distinkte formene. Alle cDNA-klonene som er blitt isolert inntil nå, som koder for distinkte former av PKC deler minst 65% total utledet homologi på aminosyrenivået, og transiente ekspresjonseksperimenter med noen av disse cDNA-klonene har vist at de koder for serin/treonin-proteinkinase-aktiviteter som bindes til, eller bli aktivert av, forbolester-tumorpromotere (Knopf et al., 1986, Ono et al., 1987).

Vi anvendte PKCbeta1 cDNA-klonen i foreliggende studier av følgende grunner. Med unntakelse av hjernen, hvor ekspresjon er meget høy, blir PKCbeta1 uttrykt ved meget lave nivåer i de fleste vev, og ekspresjonen er vesentlig udetekterbar i Rotte 6-fibroblaster (se nedenfor). Ved anvendelse av denne formen vil fenotypiske forskjeller observert mellom kontrollceller og celler som overuttrykker den introduserte formen av PKC være maksimalisert. PKCbeta1-formen er også av spesiell interesse på grunn av at innenfor PKC-genfamilien utviser den deduserte karboksyterminale domenen høyest total homologi til den katalytiske subenheten til cyklisk AMP-avhengig proteinkinase (PKAc) og cyklisk GMP-avhengig proteinkinase (PKG) (Housey et al., 1987). Sistnevnte observasjon foreslår at

PKAc, PKG og beta1-formen til PKC kan dele en felles forfedre-serin/treonin-proteinkinase-forløper, og ytterligere PKC-gener kan ha blitt avledet gjennom evolusjonær divergens fra beta1-formen.

Midler som reagerer med visse strukturelle proteiner, så som aktin og myosin, er også av interesse. Mutasjoner i gener som uttrykker disse proteinene kan være innbefattet i tumorigenesen og metastaseringen. Slike interaksjoner kan føre til forandringer i cellefenotype som kan bli analysert ved hjelp av denne fremgangsmåten.

Som angitt nedenfor er det i foreliggende oppfinnelse blitt produsert cellelinjer som overproduserer proteinkinase C (PKC). Disse cellelinjene, ulike kontrollcellene, vokser i soft agar selv i fravær av tumorfremmende forbolester 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat (TPA). TPA er blitt vist å være et potent aktiveringsmiddel til PKC. Når TPA blir tilsatt til vekstmediet vokser PKC-overproduserende cellelinjer enda bedre og danner betraktelig større kolonier i soft agar. Kjente inhibitorer av PKC-aktivitet som, som antatt, forårsaket at PKC-overproduserende celler vokste mindre bra (eller ikke i det hele tatt) i soft agar er også blitt undersøkt. Direkte anvendelse av foreliggende fremgangsmåte for identifisering av både aktiveringsmidler og inhibitorer av et genprodukt, i dette tilfelle PKC, er klart blitt demonstrert.

I ytterligere studier med andre gener, fortrinnsvis c-H-ras-onkogenet, den katalytiske subenheten til cyklisk AMP-avhengig proteinkinase, c-myc-onkogenet og visse cDNA-kloner kodende for forbolester-induserbare proteiner, er lignende resultater blitt oppnådd. Det er derfor klart at fremgangsmåten kan bli generalisert til en mengde forskjellige gener som koder for proteiner som er involvert i cellulær vekstkontroll i mange celletyper.

Først ble evnen til pMV7-baserte ekspresjonsvektorer (pMV7 er foretrukket overføringsvektor) til å produsere flere forskjellige typer av proteiner i forskjellige cellelinjer undersøkt. cDNA-sekvenser kodende for følgende proteiner ble anvendt: hypoksantin/guanin-fosforibosyltransferase (HGPRT), humant T4-lymfocytt-celleoverflateantigen, humant T8 lymfocytt-celleoverflateantigen og ornitin-dekarboksylase (ODC). I hvert tilfelle kunne pMV7-vektoren produsere høye ekspresjonsnivåer av det relevante genet som dermed resulterte i overproduksjon av det korresponderende proteinproduktet.

Når det ble verifisert at pMV7-avledet ekspresjonsvektor på en reproduserbar måte kunne danne cellelinjer som stabilt overproduserte proteinene, ble ytterligere gener som koder for proteiner, forskjellige fra PKC, som er involvert i cellulær vekstkontroll undersøkt.

I det første tilfellet ble en cDNA-klon valgt som tidligere var blitt isolert og karakterisert. Denne cDNA-klonen, betegnet TPA-S1, koder for et protein med opptil nå ukjent funksjon. Denne klonen ble valgt for å teste fremgangsmåten under betingelser hvor et gen blir anvendt som koder for et protein med ukjent funksjon. Siden vi tidligere hadde demonstrert at transkripsjonen av TPA-S1-genet er hurtig og blir sterkt indusert etter behandling av cellene med tumorpromotere så som TPA (Johnson, et al., 1987), fremkom det at TPA-S1-genproduktet spilte en viss rolle i cellulær vekstkontroll, men vi hadde ingen ytterligere data med hensyn på dets funksjon. For derfor å teste fremgangsmåten ytterligere ble TPA-S1 cDNA klonet inn i pMV7-ekspresjonsvektor, resulterende i en plasmidkonstruksjon betegnet pMV7-TPA-S1, og cellelinjer ble dannet som stabilt overuttrykte TPA-S1 cDNA-klonen. Disse cellelinjene ble dannet nøyaktig som beskrevet for R6-PKCx seriecellelinjene beskrevet nedenfor.

I dette tilfelle var resultatene også kvalitativt identiske på grunn av at NIH/3T3-tpa-s1-cellelinjene som ble dannet og

som stabilt overproduserte tpa-s1 kodet protein ble også funnet å utvise forankringsuavhengig vekst i soft agar. Denne veksten var videre avhengig av nivået av TPA-S1 mRNA og TPA-S1 protein som var blitt syntetisert i hver cellelinje. Disse cellelinjene kunne dermed bli anvendt, på nøyaktig samme måte som R6-PKCx seriecellelinjene, for utvikling av enten en inhibitor eller et aktiveringsmiddel til TPA-S1 proteinet ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Det er i tillegg å bemerke at i disse eksperimentene ble det oppnådd cellelinjer som overproduserer TPA-S1 som utviser utplatningseffektiviteter i soft agar i overskudd av 80%, til tross for at TPA-S1-genet ikke ser ut til å være et onkogen ifølge standarddefinisjonen til sistnevnte betegnelse.

I ytterligere eksperimenter er fremgangsmåten blitt testet ved anvendelse av et aktivert c-H-ras-onkogen (T24), igjen på analog måte som teknikkene beskrevet heri, og igjen med analoge resultater som de som er beskrevet heri for både PKC cDNA-klonen og TPA-S1 cDNA-klonen. Fremgangsmåten kan dermed også bli anvendt for hurtig utvikling av en p21-rasinhibitor. Resultatene beskrevet heri demonstrerer direkte at fremgangsmåten heri klart kan generaliseres til et hvilket som helst gen som er innbefattet i cellulær vekstkontroll.

Den foretrukne protein-inhibitor/aktiveringsmiddel-medikamentscreeningsfremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter følgende trinn:

1. Konstruksjon av en ekspresjonsvektor som kan uttrykke proteinet av interesse i den valgte verten ved innskudd av et gen kodende for det proteinet inn i en transfer-vektor. Genet kan bli skutt inn 3' for en promoter som allerede er i transfer-vektoren, eller et gen og en promoter kan bli innskutt sekvensielt eller samtidig.

2. Introduksjon av ekspresjonsvektoren (a) inn i celler som produserer rekombinante retroviruspartikler, eller (b)

direkte inn i vertsceller som vil bli anvendt for påfølgende medikamentscreeningstester (de resulterende cellene er heri betegnet "test"-celler).

Parallelt blir overføringsvektoren (dvs. vektoren som mangler genet av interesse og muligens en bundet promoter, men ellers identisk med ekspresjonsvektoren) fortrinnsvis også introdusert i vertscellene. Cellelinjer avledet fra dette sistnevnte tilfelle vil bli anvendt som negative kontroller i påfølgende medikamentscreeningstester. Alternativt kan umodifiserte vertsceller bli anvendt som kontroller.

Dersom 2a ble anvendt, etter en hensiktsmessig tidsperiode (vanligvis 48 timer), blir medium inneholdende rekombinante viruspartikler overført til vertsceller for å oppnå test eller kontrollceller.

3. Test- og kontrollcellene blir overført til selektivt vekstmedium inneholdende det hensiktsmessige medikamentet som bare vil tillate cellene som inneholder ekspresjonvektoren med det selekterbare markørgenet (samt genet eller cDNA av eksperimentell interesse) å vokse. Etter en hensiktsmessig seleksjonstid (vanligvis 7-10 dager), blir individuelle kloner av celler (avledede cellelinjer) isolert og propagert separat.

4. Hver uavhengig cellelinje blir testet for produksjonsnivået av POI. Ved hjelp av denne fremgangsmåten blir en mengde cellelinjer dannet som overproduserer fra noen få ganger til mer enn 100-ganger nivåene til POI. Parallelt blir kontrollcellelinjene som bare inneholder overføringsvektoren (med det selekterbare markørgenet) også analysert for endogene nivåer av POI.

5. Hver uavhengige cellelinje blir deretter testet for vekstevne i soft agar (eller metocel, eller en hvilken som helst annen lignende matrise) med forskjellige prosentandeler

og inneholdende forskjellige typer vekstmedium helt til cellelinjer blir identifiserte som inneholder de ønskede vekstkaraktertrekkene sammenlignet med kontrollcellelinjer.

6. Hver cellelinje blir også testet for evne til å danne "foci", eller områder med tett cellulær vekst, i vevskulturskåler ved anvendelse av medium inneholdende forskjellige prosentandeler og serumtyper (20%, 10%, 5% serum, føtalt kalveserum, kalveserum, hesteserum osv.) og under forskjellige vekstbetingelser (f.eks. tilsetning av andre hormoner, vekstfaktorer eller andre vekstsupplementer til mediet, temperatur og fuktighetsvariasjoner osv.). I disse testene blir cellene opprettholdt ved post-konfluens i lengre tidsperioder (fra to til åtte uker) med bytting av medium hver tredje dag eller etter behov. Slike vekstparametere blir variert helt til cellelinjene blir identifiserte inneholdende ønsket focidannelses-kapasitet relativt til kontrollcellelinjene under identiske betingelser.

7. Etter at en cellelinje inneholdende nødvendige vekstkjennetegn er identifisert blir cellene dyrket under betingelser bestemt (5) ovenfor med vekstmedium supplementert med enten råforbindelser eller rensede forbindelser som kan inneholde biologisk aktive midler spesifikke for POI. Råforbindelse eller rensede forbindelser med sistnevnte egenskaper kan hurtig bli identifisert ved deres evne til forskjellig endring av vekstbetingelser til eksperimentelle celler (som overproduserer POI) relativt til kontrollcellene (som ikke gjør dette). Dette kan bli utført hurtig selv ved enkel observasjon med det blotte øye, på grunn av at kolonier som vokser i soft agar lett kan sees etter 2 uker selv uten farging, til tross for at de kan bli farget for lettere deteksjon.

Dersom post-konfluens focidannelses-analysen blir valgt kan foci som resulterer etter omtrent to uker lett sees med det blotte øye, eller disse foci kan også bli farget. For

screening av meget store antall forbindelser (ti tusener eller mer), kan hele prosedyren bli utført på 96 brønnvevskulturskåler. Dette gjelder like godt for enten soft agar vekstanalysen eller vevskultur focidannelses-analysen. Resultatene av analysene kan lett bli bestemt ved måling av relativ absorbans til testcellene sammenlignet med kontrollcellene (ved 500 nm, eller en annen hensiktsmessig bølgelengde). Absorbans-avlesninger kan hurtig bli utførte i en 96-brønnplate-absorbansavleser så som "Titer-tek"-plateavleser, eller en hvilken som helst av flere analoge apparaturer som for tiden er tilgjengelige. På denne måten kan tusener av forbindelser bli screenet pr. måned for deres biologiske aktivitet med meget lave arbeids- og materialomkostninger.

Dersom antigen-ekspresjonen varierer av testcellene som uttrykker høye nivåer av POI relativt til kontrollcellene, kan en enkel enzymbundet immunoadsorpsjons-analyse (ELISA) bli utført og et antistoff spesifikt for antigenet.

Analysen kan bli utført med en kontrollcellelinje og en testcellelinje, men det er også mulig å anvende ytterligere linjer, testlinjer med forskjellige POI-nivåer. I tillegg kan ytterligere sett av kontroll/testlinjer, med opprinnelse fra andre verter, bli testet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, kjennetegnet ved at man:

a) tilveiebringer en første cellelinje som produserer nevnte protein og utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet;
b) tilveiebringer en annen cellelinje som produserer proteinet i et lavere nivå enn den første cellelinjen,

eller ikke produserer proteinet, og som utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet i en mindre grad eller ikke i det hele tatt;

c) inkuberer forbindelsen med de første og andre cellelinjene; og

d) sammenligner den fenotypiske responsen til den første cellelinjen overfor forbindelsen med den fenotypiske responsen til den andre cellelinjen overfor forbindelsen.

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også en fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, kjennetegnet ved at man:

a) tilveiebringer en celle som er blitt genetisk endret til å overprodusere et valgt protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det overproduserte valgte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlede cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypisk karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre er fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, kjennetegnet ved at man:

a) tilveiebringer en celle som er blitt genetisk endret til å overprodusere et valgt protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det overproduserte valgte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlete cellen for å bestemme om den utviser nevnte gradert cellulær respons til nevnte forbindelse.

Omfattet av oppfinnelsen er også en fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvori tilstedeværelsen av nevnte protein i nevnte celle vekker en responsiv forandring i et fenotypisk karaktertrekk, forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle, per se, kjennetegnet ved at man:

a) tilveiebringer en celle inneholdende et selektert protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det selekterte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlede cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypiske karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse, samt

en fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, kjennetegnet ved at man:

a) tilveiebringer en celle hvori nevnte protein er blitt innført,

b) behandler nevnte celle inneholdende nevnte innførte protein med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlete cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypisk karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse.

Oppfinnelsen vedrører også testkit for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav vekker en responsiv forandring i et fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået til nevnte protein i nevnte celle per se, kjennetegnet ved at det omfatter:

a) en første cellelinje som produserer proteinet og utviser nevnte fenotypiske respons dertil; og

b) en andre cellelinje som produserer proteinet i et lavere nivå enn den første cellelinjen, eller produserer ikke

proteinet, og som utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet i en mindre grad eller ikke i det hele tatt.

Omfattet av oppfinnelsen er også en testcelle, kjennetegnet ved at det tilstede i cellen er et målprotein, hvori tilstedeværelsen av målproteinet induserer en forandring i et selektert fenotypisk karaktertrekk til testcellen, forskjellig fra nivået av målproteinet i testcellen, per se, hvori forandringen i det selekterte fenotypiske karaktertrekket er sammenlignbart høyere i testcellen enn i en kontrollcelle, og hvori forandringen i det selekterte fenotypiske karaktertrekket er blitt funnet å være responsiv for behandling med en testforbindelse som har evne til å inhibere eller aktivere en biokjemisk funksjon til et målprotein, med en fremgangsmåte omfattende følgende trinn:

a) tilveiebringing av en testcelle hvori et målprotein er tilstede i et høyere nivå i forhold til en kontrollcelle som produserer proteinet i lavere nivå eller som i vesentlig grad ikke produserer proteiner;
b) behandling av testcellen ifølge trinn a) inneholdende målprotein ifølge trinn a) med en testforbindelse; og
c) undersøke den behandlede testcellen ifølge trinn b) for å bestemme om et selektert fenotypisk karaktertrekk som er responsiv overfor inhibisjon eller aktivering av målproteinet ifølge trinn a) er blitt endret ved behandling med testforbindelsen ifølge trinn b).

Spesifikke eksempler som viser serier av trinn beskrevet ovenfor er vist i eksemplene som følger under.

Eksempel 1

Hvis man var interessert i screening for en proteinkinase C (PKC)-inhibitor ville cellelinjer bli dannet og de som vokser godt i soft agar valgt (som et resultat av deres overproduksjon av en hvilken som helst form av PKC), og enda vise en forsterkning av veksten når forbindelser som er kjente for å stimulere PKC blir satt til vekstmediet. Hensiktsmessige

kontrollceller vil selvfølgelig ikke utvise noen av disse kjennetegnene. Screening for en potent PKC-inhibitor kan deretter bli utført ved å lete etter de forbindelsene som selektivt vil inhibere soft agar (forankrings-uavhengig) veksten av PKC-overproduserende cellelinjer. Alternativt, på grunn av at PKC-overproduserende celler også danner små, men tette foci i vevskultur, er det også mulig å screene for forbindelser som inhiberer denne foci-dannelsen.

Nedenfor er detaljerte aspekter av relevante teknikker og fremgangsmåter anvendt for å anvende prinsippene ifølge oppfinnelsen overfor problemet med dannelse av et system som er nyttig for screening for potente inhibitorer til proteinkinase C (PKC), en høyaffinitets-intracellulær reseptor for tumorfremmende midler beskrevet. Cellelinjene som fremkom fra anvendelsen av foreliggende fremgangsmåte er meget sensitive og reagerer både overfor midler som aktiverer PKC samt de som inhiberer PKC.

Konstruksjon av plasmid pMV7

Konstruksjon av pMV7 ble begynt med plasmid pPyori som inneholder replikasjonsorigo til polyoma-virus klonet inn i det unike BamHI-setet til pML-1 (Lusky og Botchan, 1981). Dette plasmidet replikerer i murine celler som inneholder polyoma T-antigen (Dailey og Basilico, 1985). Plasmid pMV (Perkins et al., 1983) ble deretter spaltet med HincII og BglI. 2,29 kb fragmentet som inneholder Moloney leukemi-virus lange termiale gjentakelser (LTR), pakkingssetet, spleise-donorsetet og prolin tRNA-bindingssetet ble isolert.

I løpet av den opprinnelige konstruksjonen av pMV (Perkins et al., 1983) ble 3,95 kb fjernet fra MSV-genomet ved spalting med PstI. Dette gav et PstI-sete beliggende 380 bp 3' fra tRNA-bindingssetet og 308 bp fra 5' enden av 3' LTR (Reddy et al., 1981). Xho I-linkere ble tilsatt til HincII-BglI-fragmentet, og til pPyori etter at det er blitt spaltet med EcoRI og HindIII. De to fragmentene ble ligert, etter

aktivering av linkerne, og et plasmid, betegnet pMV-3, som inneholder Moloney-viruskontrollelementer ble isolert.

Det unike EcoRI-setet ble fjernet fra denne vektoren ved spalting av plasmidet med EcoRI og behandling av de lineære molekylene med T4-polymerase. Disse molekylene ble resirkularisert og et plasmid, pMV-4, som mangler EcoRI-setet, ble isolert. En EcoRI-linker ble satt inn i dette plasmidet ved PstI-setet mellom Moloney-LTR; resulterende plasmid ble betegnet pMV-5.

Den dominante selekterbare markøren (neo) ble satt til pMV-5. Det første trinnet var isolering av et 1,9 kb BamHI-SalI-fragment fra pIPB1. Dette fragmentet inneholder Herpes Simplex-virus tymidinkinase (tk) promoterregionen og den kodende sekvensen for bakterielt neogen (neomycin-fosfotransferase). Dette fragmentet ble påført butte ender med T4-polymerase, ClaI-linkere ble tilsatt og fragmentet ble klonet inn i Cla I-setet 165 bp 3' til EcoRI-setet i pMV-5, mellom LTR. Dette plasmidet ble betegnet pMV5-tk neo. tk-promoteren har et EcoRI-sete 70 bp 5' for transkripsjonsstart. Dette EcoRI-setet ble fjernet ved delvis spalting av pMV5-tkneo med EcoRI, isolering av de lineære kuttede artene med full lengde, ifylling av endene med T4-polymerase og resikularisering av molekylet. Et plasmid ble valgt hvori EcoRI-setet tidligere tilstede i tk-promotersekvensen var fjernet, men hvor EcoRI-setet 537 bp 3' for transkripsjonsstart til 5' LTR var beholdt. Dette plasmidet ble betegnet pMV7 og et kart av dette plasmidet er vist i Figur 1B.

Denne vektoren består av 5' og 3' Moloney murin leukemivirus (MoMuLV) LTR, MoMuLV RNA pakkingssetet 3' for 5' LTR, et Eco RI-kloningssete, en modifisert Herpes Simplex virus tymidinkinase (tk) promoter (som mangler et Eco RI-sete ved −79 bp) og det selekterbare markørgenet neo. cDNA-kloner skutt inn i EcoRI-kloningssetet er under transkripsjonell kontroll av 5' LTR, mens neogenet blir uavhengig transkribert av tk-

promoteren. Denne strukturen favoriserer opprettholdelse av den funksjonelle integriteten til den selekterbare markøren uten innvirkning av ekspresjonen av 5' (uselektert) cDNA-sekvens. Det er kjent (Maddon et al., 1986; Daley et al., 1987) at når forskjellige cDNA-sekvenser blir skutt inn i EcoR1-setet til pMV7 kan de lett bli overført til mottaker-celler ved virus-mediert passasje, eller stabilt uttrykt, og tilveiebringe produksjon i høyt nivå av det korresponderende proteinet.

Nukleotidsekvensering og ekspresjonsvektor-konstruksjon

Nukleotidsekvensering av PKC cDNA-klon RP58, en klon i full lengde isolert fra et rottehjerne cDNA-bibliotek, som korresponderer med tidligere rapportert klon RP41, ble utført som tidligere beskrevet (Housey et al., 1987). Full-lengde cDNA-sekvensen til RP58, som koder for PKCbeta1 (Figur 1A), ble subklonet inn i EcoRI-setet til plasmid pMV7 ved anvendelse av standard metodologi (Maniatis et al., 1983). Den generelle strukturen til pMV7 er vist i Figur 1B. Konstruksjonen som resulterer fra inskudd av PKCbeta1-genet er betegnet pMV7-PKCbeta1.

Isolering av cellelinjer som stabilt overuttrykker PKC

20 µg CsCl med bånd av pMV7 eller pMV7-PKCbeta1 plasmid DNA ble transfektert (Graham og van der Eb, 1973; som modifisert av Wigler et al., 1977) inn i subkonfluente "Psi-2"-celler (Mann et al., 1985). Etter 48 timer ble kulturmediet samlet, filtrert gjennom et 0,45 µm filter og lagret ved -70°C. Mottaker subkonfluent Rotte-6 fibroblaster (5×10^5 pr. 10 cm plate) ble infisert med virus-inneholdende medium i 2 µg/ml polybren i 48 timer. Cellene, dyrket til konfluens, ble deretter trypsinert og på ny platet om i Dulbecco's modifiserte Eagle's medium (DMEM) supplementert med 10% bovint kalveserum (CS) (Flow Laboratories) med 200 µg/ml neomycin-derivat G418 (geneticin). Resistente kolonier ble klonet ved ringisolasjon etter 1 ukes G418-seleksjon.

Etter omtrent ti dagers vekst i selektivt medium ble ti individuelle G418-resistente kloner isolert og oppprettholdt uavhengig i G418-inneholdende medium. Disse cellelinjene ble betegnet R6-PKCbeta11 til og med R6-PKCbeta110 (forkortet til R6-PKC1 til og med R6-PKC10). Parallelt ble et sett kontroll Rotte 6-linjer dannet ved transfeksjon av plasmid pMV7 (som mangler PKC cDNA-innskuddet) til W-2-celler, infeksjon av mottaker Rotte-6-celler og seleksjon for G418-resistens som beskrevet ovenfor for plasmid pMV7-PKCbeta1. På lignende måte, etter ti dagers vekst i G418-inneholdende medium, ble fem individuelle, vel-isolerte G418-resistente kloner isolert og opprettholdt uavhengig. Disse kontroll-linjene ble betegnet R6-C1 til og med R6-C5.

RNA-isolasjon og blott-hydridiseringsanalyser

Poly A+ RNA-isolasjoner, gelelektroforese og blot-hybridiseringsanalyser ble utført som tidligere beskrevet (Housey et al., 1985). RNA molekylvektsmarkører ble tilveiebragt fra Bethesda Research Laboratories. 2,7 kb cDNA-innskuddet til RP58 (se ovenfor) ble subklonet inn i plasmid pKS(+) (Stratagene Cloning Systems) for å tilveiebringe et plasmid betegnet pS2-RP58. En ^{32}P-merket probe ble preparert fra pS2-RP58 og anvendt under hybridiseringsbetingelser med høy stringenthet som tidligere beskrevet (Housey et al., 1987).

Rensing og analyse av PKC-aktivitet fra vevskulturceller

Total PKC-aktivitet (membran-assosiert pluss cytosolisk) tilstede i dyrkede celler ble bestemt etter delvis rensing av cellulære ekstrakter som vist nedenfor.

Tre 10 cm skåler med konfluente celler ble vasket to ganger med 10 ml iskaldt fosfat-bufferet saltvann (PBS) og deretter ble 10 ml homogeniseringsbuffer (20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 15 mM 2-merkaptoetanol, 10 µg/ml soyabønne-trypsininhibitor, 10 µg/ml leupeptin, 40 µg/ml fenylmetylsulfonylfluorid), inneholdende 0,1% Triton X-100 tilsatt. Cellene ble deretter skrapet fra hver av skålene slått sammen

og ødelagt med 25 støt i en Dounce-homogenisator. Homogenatet ble overført til et 15 ml engangs-polystyrenrør, sentrifugert ved 2.000 x g i 5 minutter ved 4°C, og supernatanten ble applisert på en 1 ml DEAE Sephacel-kolonne på forhånd ekvilibrert med 10 ml homogeniseringsbuffer, ved 4°C. Kolonnen ble vasket med 10 ml homogeniseringsbuffer og deretter ble bundet enzym eluert med 3 ml homogeniseringsbuffer inneholdende 0,5 M NaCl. Totale proteinkonsentrasjoner ble bestemt ved metoden til Bradford (1976).

PKC-aktiviteten tilstede i overnevnte delvis rensede celleekstrakter ble øyeblikkelig analysert etter isolasjonen. Det syntetiske peptidet R-K-R-T-L-R-R-L, tilsvarende aminosyrene 651-658 av epidermal vekstfaktor-reseptor (Ullrich et al., 1984), ble syntetisert på en Applied Biosystems modell 430A peptidsynthesizer, renset ved høy-ytelses væskekromatografi, lyofilisert og lagret ved -20°C. Treonin i posisjon 654 er et in vivo substrat for PKC (Hunter et al., 1984; Davis og Czech, 1985). Dette syntetiske peptidet er et meget spesifikt substrat for PKC-aktivitet in vitro. (Watson et al., 1987; Woodgett, et al., 1986).

Det rensede materialet ble deretter på nytt løst opp i sterilt vann i en final konsentrasjon på 100 µM og anvendt som fosfoakseptor-substrat i PKC-analysene. Den generelle analysefremgangsmåten er blitt publisert i detalj andre steder (O'Brian et al., 1985). I de fleste tilfellene ble 100 µM syntetisk peptid erstattet med 2 mg/ml histon III-S som fosfoakseptor-substrat.

Celleekstrakter ble preparert 48 timer etter at cellene hadde oppnådd konfluens. Som vist i Tabell 1(a) inneholdt åtte av ti cellelinjer dannet ved infeksjon med pMV7-PKCbeta1-konstruksjon (linjene R6-PKC1, R6-PKC3 og R6-PKC5 til og med R6-PKC10) markerte økninger i PKC-aktivitet sammenlignet med kontroll-linjene (R6-C1, -C2 og -C3). Det var uventet at cellelinje R6-PKC3 inneholdt et 53 ganger høyere nivå av PKC-

aktivitet enn det som var tilstede i kontrollcellene. To av linjene (R6-PKC2 og R6-PKC4) viste derimot ikke en signifikant økning i PKC-aktivitet, men de hadde antakeligvis integrert pMV7-PKC-konstruksjonen som vist ved deres fortsatte G418-resistens. Påfølgende studier verifiserte at disse to cellelinjene inneholdt delesjoner i cDNA-klon kodende PKCbeta1.

I ytterligere studier ble det funnet at den meget høye PKC-aktiviteten i ekstraktene til R6-PKC3 som sees i nærvær av 1 mM Ca^{2+} og fosfatidylserin var også synlig i nærvær av 1 mM EGTA, 100 ng/ml TPA og fosfatidylserin. Denne meget høye aktiviteten ble også oppdaget når histon III-S ble anvendt, istedet for det overnevnte syntetiske peptidet, som substrat for fosforylering. Selv etter 24 uker med kontinuerlig vekst og passasje i serie utviste cellelinjene R6-PKC1 til og med R6-PKC6 vesentlig samme nivåer av PKC-aktivitet som vist i Tabell 1.

Autofosforylering og gelelektroforese av PKC

Celleekstrakter renset som beskrevet ovenfor ble inkubert under betingelser som favoriserer autofosforylering av PKC, som følger. 100 µg av delvis renset proteinekstrakt ble inkubert i en reaksjonsblanding inneholdende 80 µg/ml fosfatidylserin, 1 mM CaCl2 (eller 1 mM EGTA og 100 ng/ml TPA), 5 mM MgCl2 og 30 µM ATP inneholdende 100 µCi [gamma-^{32}P]ATP (New England Nuclear, NEG035). Renheten til radioaktivt ATP er kritisk for oppnåelse av reproduserbar autofosforylering av PKC.

Under disse betingelsene er det tidligere vist at PKC gjennomgår en autofosforyleringsreaksjon som resulterer i fosforylering av flere seter på det intakte enzymet (Walton et al., 1987; Huang et al., 1986, Woodgett og Hunter, 1986; Kikkawa, 1982).

Reaksjonene ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter og deretter stoppet ved tilsetning av SDS-PAGE appliseringsbuffer inneholdende 2-merkaptoetanol. Dette materialet ble deretter utsatt for diskontinuerlig SDS-PAGE ved modifikasjon av fremgangsmåten til Laemmli (1970). 20 µg av totalprotein ble applisert i hver kolonne. Etter elektroforese ble gelene fiksert i 50% eddiksyre, 10% etanol, tørket og autoradiografert på Kodak XAR-5 film.

Autoradiografer av disse gelene (Figur 2) viste at ekstraktene preparert fra fire cellelinjer som hadde høy PKC-aktivitet (R6-PKC1, -PKC3, -PKC5 og -PKC6, se Tabell 1(a)) viste et prominent fosforylert proteinbånd på omtrent 75 kd i størrelse, tilsvarende størrelsen til et autofosforylert preparat av PKC tilveiebragt fra rottehjerne (Huang et al., 1986; Housey et al., 1987). Ved undersøkelse i en immunoblotanalyse reagerte dette 75 kd båndet også med et antistoff til beta1-formen av PKC (Jaken og Kiley, 1987). Kontrollcellelinjene R6-C1, -C2 og -C3, og cellelinjene R6-PKC2 og R6-PKC4, som ikke hadde økte nivåer av PKC (se Tabell 1(a)) hadde ikke dette 75 kd fosforylerte båndet (Figur 2), og de inneholdt heller ikke bånd som reagerte med antistoffet til beta1-formen av PKC. Det er av interesse at prøvene oppnådd fra de fire cellelinjene som produserte høye nivåer av PKC også utviste svakere, men distinkt fosforylerte proteinbånd med størrelse på omtrent 73, 60 og 49 kd, som ikke ble sett (eller bare så vidt detektert) i ekstrakter fra celler som ikke hadde økte nivåer av PKC (Figur 2). Disse båndene kan representere degraderingsfragmenter av 75 kd PKC-molekylene, eller spesifikke cellulære proteiner som er fosforylerte med PKC.

Ovenfor beskrevne fosforylerte proteinbånd ble sett når enten 1 mM Ca^{2+} pluss fosfatidylserin eller 100 ng/ml TPA pluss fosfatidylserin ble anvendt som kofaktorer for PKC-aktivering (sammenlign par- og oddetallkolonnene i Figur 2). Når ekstrakter fra cellelinjer som produserer høye nivåer av PKC

ble inkubert i en autofosforyleringsreaksjon i fravær av slike kofaktorer, ble 75 kd båndet og de ytterligere mindre båndene beskrevet ovenfor, ikke detektert. Disse resultatene, sammen med de negative resultatene oppnådd med ekstrakter fra kontrollcellene (Figur 2), viser tydelig at de fosforylerte båndene reflekterer PKC-aktivitet.

Forbolester (^{3}H-PDBU) bindingsanalyser

På grunn av at det er blitt vist at PKC er en intracellulær reseptor med høy affinitet for forbolester-tumorpromotere (for en oversikt, se Nishizuka, 1986), ble det også analysert en undergruppe av cellelinjene for 3H-PDBu-binding ved anvendelse av en tidligere beskrevet intakt celleanalyse (Horowitz et al., 1981).

Celler ble sådd ut ved 1 x 10^5 pr. 4 cm brønn på dag 1, medium ble forandret på dag 2 og cellene ble deretter analysert på dag 3. Monolaget ble vasket med 4 ml DMEM (uten serum), deretter ble 2 ml DMEM inneholdende 50 nm ^{3}H-PDBU (New England Nuclear; 8,3 Ci/mmol) tilsatt og platene ble inkubert i 1 time ved 37°C for å bestemme total binding. Fraksjonen av total binding som representerte spesifikk binding ble bestemt ved tilsetning av 1.000-ganger overskudd av umerket PDBU (LC Services) til 3H-PDBU-oppløsningen (Horowitz et al., 1981). Platene ble vasket 3x med 4 ml iskald PBS. Cellene ble oppløst i 1 ml 1% SDS/10 mM DTT i 2 timer ved 37°C. Lysatet ble overført til en scintillasjons-beholder og talt. Replikaplater ble anvendt for å bestemme antall celler pr. plate og spesifikke bindingsdata uttrykt som nanomol 3H-PDBu bundet/10^6 celler. Standard-analyser ble utført som tidligere beskrevet (Horowitz et al., 1981).

Det ble oppdaget at R6-PKC-cellelinjene 1, 3, 5 og 6, som alle hadde høy PKC-enzymaktivitet, også hadde en markert økning i 3H-PDBu-binding, mens cellelinjen R6-PKC4, som ikke utviste en signifikant økning i PKC-aktivitet, ikke utviste en økning i 3H-PDBu-binding sammenlignet med de to kontroll-

cellelinjene R6-C1 og R6-C2 (Tabell 1(a)). Standardanalysene til kontrollcellelinje R6-C1 og R6-PKC3-cellelinjene, utført som tidligere beskrevet (Horowitz et al., 1981), viste at antallet høyaffinitetsreseptorer i de to cellelinjene var 1,6 X 10^5 og 1,4 X 10^6, respektivt. Affinitetskonstantene var omtrent like i begge cellelinjene (Kd = 16 nM). Under analysebetingelsene som ble anvendt inneholdt derfor R6-PKC3-cellene omtrent to ganger nivået til forbolester-bindingssetene med høy affinitet som kontrollcellene. Det er tydelig at cellelinjene som uttrykker meget høye nivåer PKC også har en betaktelig økning i forbolester-bindingsseter.

Analyser for PKC-relaterte RNA-transkripter

I lys av overnevnte resulter var det interessant å analysere poly A+ RNA-fraksjonen til flere cellelinjer beskrevet i Tabell 1(a) for størrelse og hyppighet av RNA-transkripter inneholdende sekvenser homologe med PKCbeta1.

Poly A+ RNA ble separert på 1% agarose, 6%-formaldehyd-geler, blottet på nylonmembraner, hybridisert til en 32P-merket DNA-probe preparert fra full-lengde PKCbeta1 cDNA og autoradiografert, som tidligere beskrevet (Housey, et al., 1986). Som vist i Figur 3 inneholdt linjene som bestod av forhøyede nivåer PKC-aktivitet (R6-PKC1, -PKC3, -PKC5 og -PKC6), se Tabell 1(a)) en betydelig 6,6 kb RNA-form som korresponderer med den antatte størrelsen for et mRNA-transkript som initierer 5' LTR og terminerer i 3' LTR til pMV7-PKCbeta1-konstruksjonen. Dette transkriptet var det mest av i R6-PKC3-cellelinjen (Figur 3) som også uttrykker høyest nivå av PKC-aktivitet (Tabell 1).

Linjene R6-PKC2 og R6-PKC4, som ikke viste noen betraktelig forhøyning av PKC-aktivitet (Tabell 1(a)), produserte derimot forkortede mRNA på omtrent 5 kb og 4,8 kb, respektivt. Hyppigheten av sistnevnte transkripter var mye lavere enn den til 6,6 kb transkriptene tilstede i cellelinjene som uttrykte høye nivåer av PKC. Neo+ fenotypen og mangel på PKC-aktivitet

i cellelinjene R6-PKC2 og R6-PKC4 tydet på at de forkortede mRNA reflekterer delesjoner i PKC-kondende sekvenser i integrerte konstruksjoner innbefattet i disse cellelinjene. Genomisk DNA blot hybridiseringer av klonene R6-PKC2 og R6-PKC4 tydet på at de inneholdt delesjoner i PKCbeta1 cDNA-sekvensen. Hverken i parentale Rotte-6 cellelinje, eller i noen av de eksperimentelle cellelinjene avledet fra disse cellene, var det mulig å oppdage spor av et endogent transkript homologt med PKCbeta1-proben (Figur 3). I disse cellene er det derfor en neglisjerbar ekspresjon av endogent gen kodende for PKCbeta1.

Analyser av vekst i monolags-kultur og i soft agar

Celler ble sådd ut i en tetthet på 10^4/skål i en serie 60 mm skåler, i 5 ml DMEM pluss 10% CS. 24 timer senere ble celler i triplikatskåler trypsinert og talt. Dette punktet ble betegnet "dag 0". Gjenværende kulturer ble deretter dyrket i respektive medium (dvs. pluss eller minus 100 ng/ml TPA) med forandring av friskt medium to ganger pr. uke. Celletellinger pr. plate ble deretter bestemt på triplikatskåler i løpet av resten av vekstkurven (Figur 3). De oppnådde resultatene ble analysert for eksponentiell doblingstid og metningstetthet (Tabell 2). For å vurdere vekst i soft agar (forankringsuavhengighet), ble 2 X 10^4-celler suspendert i 2 ml 0,3% Bacto-agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) i DMEM inneholdende 20% føtalt kalveserum (FCS) og lagt over et lag 5 ml 0,5% agar i samme medium, på 60 mm petri-skåler. Cellene ble deretter belagt med DMEM pluss 20% FCS hver 4. dag. Etter 30 dager ble kolonier farget med fargen 2-(p-iodofenyl)-3-(p-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolinium-kloridhydrat (INT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i 48 timer ved 37°C, i en inkubator med 5% CO2 (Schaeffer og Friend, 1976), og antall kolonier ble talt under lav styrke i et omvendt fasemikroskop. Dataene er uttrykt som "kloningseffektivitet", dvs. antall kolonier over 0,05 mm pr. skål X 100 delt på antall celler som opprinnelig ble sådd ut pr. skål.

Screening av kjent aktivator til PKC

Det ble oppdaget at cellelinjer som overproduserte PKC utviser en overdrevet morfologisk respons overfor 12-O-tetradekanoyl-forbol-13-acetat (TPA) og endret vekstkontroll.

Morfologiske forandringer

For å ytterligere karakterisere de fenotypiske forandringene som oppstod i cellelinjer som overproduserte PKCbeta1, ble linjene R6-PKC3 og R6-PKC5, som inneholder 53- og 20-ganger forhøyelser av PKC-aktivitet, respektivt, først undersøkt i detalj med hensyn til deres morfologi, sammenlignet med kontrollcellelinje R6-C1. Som vist i Figur 4, Panel A, viste alle tre cellelinjene i fravør av TPA-behandling den karakteristiske fusiform-morfologien til monolagskulturene til normal parental Rotte 6-fibroblastcellelinjen. 24 timer etter behandling med 100 ng/ml TPA (Figur 4, R6-C1: panel D), utviste kontrollcellelinjen mer elongerte og dendrittiske celler og et criss-cross-mønster, forandringer som tidligere er blitt sett etter at fibroblaster fra gnagere blir behandlet med TPA (Boreiko et al., 1980). Disse forandringene var derimot mye mer dramatiske når R6-PKC3 og R6-PKC5-celler ble behandlet med TPA (R6-PKC3 og R6-PKC5, Panel D). Dette var spesielt tydelig med R6-PKC3-celler (som uttrykker det høyeste nivået av PKC) på grunn av at de utviste meget lange cytoplasmiske prosesser og mange refraktile cellelegemer.

48 timer etter utsetting for TPA hadde morfologien til kontrollcellelinje R6-C1 gått tilbake til normalt utseende (Figur 4, Panel E). Derimot så R6-PKC3-cellene, og i mindre grad R6-PKC5-cellene, ut til å utvise endret morfologi. Alle cellelinjene ble deretter utsatt for en annen, frisk dose TPA (100 ng/ml) og undersøkt 24 timer senere (Figur 4, Panel F), dvs. 72 timer etter første TPA-dose. Kontrollcellene reagerte ikke, med hensyn på morfologisk forandring, overfor andre dose av TPA, mens R6-PKC3-cellene fortsatte å utvise deres endrede morfologi, samt en økning i celletetthet. R6-PKC5-

cellene utviste bare små forandringer i morfologi som reaksjon på andre dose TPA.

Det meget høye nivået av konstitutiv produksjon av PKC i R6-PKC3-cellelinjen er sannsynligvis ansvarlig for denne overdrevne morfologiske responsen overfor TPA samt manglende evne som disse cellene har til å utvise vanlig motstandsdyktig respons overfor TPA etter første eksponering. I normale celler ser sistnevnte respons ut til å være forårsaket av "ned-regulering" av endogen PKC-aktivitet. På grunn av at R6-PKC5-celler har et intermediært nivå av PKC, er det ikke overraskende at deres morfologiske respons overfor TPA er intermediært mellom de til kontrollcellene og R6-PKC3-cellene.

Vekstkurver

Det var også av interesse å bestemme veksthastighetene til disse cellene i monolagskultur. Detaljerte vekstkurver ble utført på R6-C1, R6-PKC3 og R6-PKC5 cellene i 10% kalveserum og DMEM-medium, i nærvær og fravær av 100 ng/ml TPA. Oppnådde data ble oppsummert kvantitativt i Tabell 2.

I fravær av TPA utviste R6-C1-kontrollcellelinjen lengst doblingstid (26,4 timer) og laveste metningstetthet (3,4 x 10^6 celler/plate); R6-5-cellelinjen hadde en kortere doblingstid (24,9 timer) og en høyere metningstetthet (4,8 x 10^6 celler/plate); og R6-PKC3-cellelinjen hadde kortest doblingstid (24,2 timer) og høyest metningstetthet (5,7 x 10^6 celler/skål). Tilstedeværelse av TPA reduserte doblingstidene, samt økte metningstetthetene til alle tre cellelinjene, men forsterkning ved TPA var spesielt fremtredende når det gjelder R6-PKC3 (Tabell 2).

Når cellelinjene ble opprettholdt i nærvær av TPA i en lengre tidsperiode viste R6-PKC3-cellene, men ikke R6PKC5 eller R6-C1-cellene, en reduksjon i celletetthet. Sistnevnte virkning var forårsaket av det faktum at når R6-PKC3-cellene ble

opprettholdt ved høy celletetthet i nærvær av TPA, ble de mindre adhesive og hadde en tendens til å løsne fra skålen.

Selv i fravær av TPA utviste R6-PKC3-cellene (som har høyeste nivå av PKC), og i mindre grad R6-PKC5-cellene (som har et midlere nivå av PKC), en forsterkning av vekstegenskapene som til og med er større enn det som sees når R6-C1-kontroll-cellene dyrkes i nærvær av TPA. I nærvær av TPA er disse forskjellene i vekstegenskapene mellom kontroll og R6-PKC3-cellene enda tydeligere.

Foci-dannelse

I andre studier ble monolagskulturer opprettholdt ved post-konfluens i lengre tid (28 dager), med forandring av medium hver 3. dag, i fravær av TPA. Kontroll R6-C2-cellelinjen forble et nokså jevnt monolag, mens etter omtrent 21 dager utviklet R6-PKC3-cellelinjen mange tette foci med diameter på omtrent 0,1-0,3 mm (Figur 5). Videre utviste R6-PKC3-kulturene mange celler med et meget vakuol-inneholdende cytoplasma som var fordelt i monolaget, men som ikke kunne sees i R6-C2-kontrollkulturen. Når det tette foci i R6-PKC3-kulturen ble plukket og ytterligere fordelt vokste disse som de parentale R6-PKC3-cellene og utviste ikke en morfologi som er vanlig for malignt transformerte celler. Det er antatt at disse tette foci, og vakuol-inneholdende celler, tyder på fysiologiske og ikke genetiske forandringer indusert ved høye nivåer av PKC-aktivitet.

Vekst på soft agar

Disse cellelinjene ble også analysert for deres evne til å danne kolonier i soft agar, på grunn av at celler fra gnagere med forankrings-uavhengig vekst ofte korrelerer med tumorigenisitet (Freedman og Shin, 1974). Som vist i Figur 6, når 2 x 10^4 celler ble sådd ut i 0,3% soft agar, dannet både R6-PKC3 og R6-PKC5 cellene mange små kolonier, mens kontroll-R6-C1-cellene (og den parentale Rotte 6-cellelinjen) ikke vokste og forble enkeltceller. Når TPA (100 ng/ml) ble satt

til agarmediet, ble kolonistørrelsene og kloningseffektivitetene til R6-PKC3 og RC-PKC5 cellene forsterket (Figur 6 og Tabell 2), men R6-C1-cellene vokste ikke i agar.

Effektiviteten til kloningen og kolonistørrelsene til R6-PKC3-kulturene var alltid større enn de til R6-PKC5-kulturene, både i fravær og nærvær av TPA (Tabell 2), som sannsynligvis reflekterer det høyere nivået av PKC-aktivitet i førstnevnte cellelinje. Det er derfor klart at overproduksjonen av PKC er knyttet til antakelsen om forankringsuavhengig vekst i Rotte 6-celler. Størrelsen på koloniene dannet i agar av PKC-cellelinjene er mindre enn de som blir dannet av Rotte 6-celler transformert med et aktivert c-H-ras onkogen, som har en diameter på omtrent 0,5 - 1,0 mm.

Ytterligere screening av aktiveringsmidler og inhibitorer til PKC

Ytterligere forbindelser som ble undersøkt omfatter tumorpromoterne teleocidin, aplysiatoksin og mezerein, alle er kjente aktiveringsmidler til PKC (O'Brian et al., CSH, 1985). En kjent inhibitor til PKC, H-7 (Kawamoto og Hidaka, 1984), modulerer også veksten av cellene på ventet måte.

Denne fremgangsmåten er blitt anvendt for å bekrefte at antiøstrogen tamoksifen (O'Brian et al., Cancer Res., 1985), som inhiberer PKC-enzymaktivitet i en celle-fri analyse, fullstendig kan inhibere veksten i agar til alle cellelinjene som overproduserer PKC. Inhibering av veksten av R6-PKC3-cellene i agar i nærvær av tamoksifen tilveiebragte viktige bevis for at tamoksifen kan inhibere PKC-mediert stimulering av celleveksten.

Konsentrasjonen av inhibitoren som var nødvendig for fullstendig inhibering av veksten av hver cellelinje var omtrent proporsjonal med mengden av PKC som blir overprodusert i den bestemte cellelinjen. Det er med andre ord et direkte forhold mellom den molare mengden av inhibitoren som er nødvendig for

å forhindre cellevekst og molar mengde av PKC tilstede i hver cellelinje.

I tillegg er det analoge forholdet mellom molare mengder PKC-aktiveringsmidler og molare mengder PKC tilstede i cellene demonstrert. Det er dermed et direkte forhold mellom den molare mengden av aktiveringsmiddel som er nødvendig for å stimulere cellevekst og den molare mengden PKC tilstede i cellene. Dette arbeidet beviser derfor for første gang det faktum at stabil overproduksjon av et protein i pattedyr-celler kan resultere i en ny cellulær fenotype(r) (i dette tilfelle forankrings-uavhengighet) som kan bli direkte modulert av kjemiske midler som reagerer med proteinet.

Eksempel 2

Dersom man var interessert i screening for en potent inhibitor til c-H-ras onkogenproduktet (p21-proteinet) ville man danne celler som vokser bra i soft agar med hensiktsmessige mediumsbetingelser når p21 blir stabilt overprodusert i et visst nivå, men ikke når p21 er tilstede i villtype-nivåer. Screening for en potent p21-inhibitor kan deretter bli utført som beskrevet i Eksempel 1 ovenfor.

Eksempel 3

De samme hovedteknikkene kan også anvendes på gener (eller cDNA-sekvenser) som er blitt mutert enten konstruert i laboratorie (dvs. sete-rettet mutagenese) eller som et resultat av naturlig forekommende hendelser. Hvilke som helst av de kjente punktmutasjonene i ras-onkogenet som resulterer i større mulighet for det muterte genet til å transformere normale celler til kreftholdige, kan bli anvendt i samme hovedprosedyrer som beskrevet ovenfor.

Ytterligere modifikasjoner

Anvendelse av en hvilken som helst ekspresjonsvektor som stabilt kan overuttrykke et gitt gen i en mottakercelle kan bli anvendt i prosedyrene beskrevet heri. Retroviralvektoren

som ble anvendt heri var spesielt godt egnet for dette på grunn av at den var konstruert spesielt for dette. Andre lignende vektorsystemer kan imidlertid anvendes. Det kan også bli utført ko-transfeksjon av et eksperimentelt gen skutt inn i en plasmidvektor sammen med et annet plasmid inneholdende det selekterbare markørgenet (istedet for å ha både det eksperimentelle genet og det selekterbare markørgenet på samme plasmidvektor). Dette er vanskeligere og mindre effektivt enn å anvende pMV7-vektoren, men vil i en viss grad gå.

Et hvilket som helst vekstmedium, i tillegg til soft agar eller metocel, som ser ut til å hemme veksten til normale, ikke-tranformerte celler, kan også bli anvendt.

En kultur av E. coli DH1 inneholdende plasimet betegnet pMV7-RP58 (pMV7-PKC beta1), ble deponert under Budapest-avtalen til the American Type Culture Collection, 11. februar 1988, og redeponert 17. mars 1988 med ervervelse av ATCC nr. 67654. Deponeringen av dette plasmidet skal ikke bli konstruert som en tillatelse for at deponeringen er nødvendig for muliggjøring eller at beskrivelsen er begrenset til den deponerte vektoren eller genet.

Tabell 1(a)

PKC-aktivitet og forbolester-binding i Rotte 6-celler infisert med pMV7 eller pMV7-PKCbeta1-konstruksjoner

Cellelinje	PKC-aktivitet: Spesifikk aktivitet (pmol/min/mg prot)	PKC-aktivitet: Ganger økning relativt til kontroll	3H-PDBU binding ($pmol/10^6$ celler)
R6-C1	100	—	1,6
R6-C2	85	—	1,3
R6-C3	150	—	1,5
gj.sn. + s.d.	100 + 34	1	
R6-PKC1	2480	23	12,7
R6-PKC2	85	1	ND
R6-PKC3	5840	53	9,9
R6-PKC4	190	2	0,7
R6-PKC5	2200	20	5,8
R6-PKC6	4600	42	7,1
R6-PKC7	2150	20	ND
R6-PKC8	3280	30	ND
R6-PKC9	4990	45	ND
R6-PKC10	5050	46	ND

Tabell 1(b)

PKC-aktivitet i NIH-3T3-cellelinjer infisert med pMV7 eller pMV7-PKCbeta1-konstruksjoner

NIH-3T3 cellelinjer (kontroller)	PKC spesifikk aktivitet (pmol/min/mg prot)	Ganger Økning Relativt til Kontroll
3T3-C1	110	----
3T3-C2	150	----
3T3-C3	90	----
gjennomsnitt +/- s.d. (kontroll-linjer)	115 +/- 30	
NIH-3T3 PKC-overproduserende cellelinjer		
3T3-PKC1	2570	22
3T3-PKC2	3640	32
3T3-PKC3	1960	17
3T3-PKC4	1240	11
3T3-PKC5	4190	36
3T3-PKC6	2110	18
3T3-PKC7	5050	44

Tabell 1(c)

PKC-aktivitet i C3H-10T1/2-cellelinjer infisert med pMV7 eller pMV7-PKCbeta1-konstruksjoner

C3H-10T1-2 cellelinjer (kontroller)	PKC spesifikk aktivitet (pmol/min/mg prot)	Ganger Økning Relativt til Kontroll
C3H-C1	115	----
C3H-C2	155	----
C3H-C3	130	----
C3H-C4	185	----
gjennomsnitt +/- s.d.	145 +/- 30	
C3H-10T1/2 PKC-overproduserende cellelinjer		
C3H-PKC1	2340	16
C3H-PKC2	5010	35
C3H-PKC3	950	7
C3H-PKC4	1360	9
C3H-PKC5	4340	30
C3H-PKC6	7460	51

Tekst til Tabell 1

Kontrollcellelinjene ble tilveiebragt ved infisering av Rotte 6-fibroblast, NIH-3T3 og C3H-10T1/2 celler med selve pMV7-vektoren (som mangler PKC cDNA-innskuddet) mens PKC-overproduserende cellelinjer ble tilveiebragt fra Rotte 6-fibroblast, NIH-3T3 og C3H-10T1/2 celler infisert med pMV7-PKCbeta-konstruksjon, som beskrevet ovenfor. Total PKC-aktivitet ble delvis renset fra hver av cellelinjene og analysert i nærvær av 1 mM Ca2+ og 80 µg/ml fosfatidylserin, ved anvendelse av det syntetiske peptidet R-K-R-T-L-R-R-L som substrat. Spesifikk aktivitet er rapportert som mengden av inkorporering av 32P inn i det syntetiske peptidsubstratet pr. milligram protein pr. minutt. Alle analysene ble utført i duplikat og varierte med mindre enn 10%.

Tabell 2

Vekstegenskaper til Rotte 6-cellelinjer som overproduserer PKC og deres respons overfor TPA-behandling

		Vekst i kultur			
		Monolag		Agar	
Cellelinje	TPA tilsetn.	Doblingstid (t)	Metningstetthet ($x10^6$)	Effekt. (%)	Kolonistørr. (mm)
R6C1	-	26,4	3,4	0	---
(kontroll)	+	24,6	4,2	0	---
R6-PKC3	-	24,2	5,7	25,1	0,10-0,15
(test)	+	21,5	10,0	29,7	0,15-0,35
R6-PKC5	-	24,9	4,8	17,3	0,05-0,10
(test)	+	22,9	7,0	34,7	0,10-0,15

Tabell 2. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. "Doblingstidene" relaterer til opprinnelig eksponensiell fase av celleveksten og "metningstetthet" representerer antall celler pr. 6 cm skål på dag 11. Dataene er fra eksperimentet vist i Figur 3.

Tabell 3

Inhibisjon av veksten i agar av PKC-overproduserende cellelinjer ved anvendelse av forskjellige inbitorer

Inhibitor	Cellelinje	Kons. inhibitor (µm)	Effekt. av vekst i agar (%)
H-7	R6-PKC3	0	27
H-7	R6-PKC3	2	25
H-7	R6-PKC3	5	22
H-7	R6-PKC3	10	17
H-7	R6-PKC3	50	4
H-7	R6-PKC3	100	0
H-7	R6-PKC5	0	20
H-7	R6-PKC5	2	21
H-7	R6-PKC5	5	16
H-7	R6-PKC5	10	4
H-7	R6-PKC5	50	1
H-7	R6-PKC5	100	0
Tamoksifen	R6-PKC3	0	25
Tamoksifen	R6-PKC3	5	27
Tamoksifen	R6-PKC3	20	22
Tamoksifen	R6-PKC3	50	15
Tamoksifen	R6-PKC3	100	6
Tamoksifen	R6-PKC3	200	0
Tamoksifen	R6-PKC5	0	19
Tamoksifen	R6-PKC5	5	19
Tamoksifen	R6-PKC5	20	17
Tamoksifen	R6-PKC5	50	8
Tamoksifen	R6-PKC5	100	0
Tamoksifen	R6-PKC5	200	0
Staurosporin	R6-PKC3	0	29
Staurosporin	R6-PKC3	0,001	29
Staurosporin	R6-PKC3	0,005	26
Staurosporin	R6-PKC3	0,010	15
Staurosporin	R6-PKC3	0,050	7
Staurosporin	R6-PKC3	0,250	0
Staurosporin	R6-PKC5	0	22
Staurosporin	R6-PKC5	0,001	21
Staurosporin	R6-PKC5	0,005	17
Staurosporin	R6-PKC5	0,010	10
Staurosporin	R6-PKC5	0,050	2
Staurosporin	R6-PKC5	0,250	0

Referanser

Ashendel, C. "The Phorbol Ester Receptor: a phospholipid-regulated protein kinase". (1984) Biochim. Biophys. Acta 822, 219-242.

Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., Koshland, D.E. Jr. (1986) "Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, sidene 5822-4.

Boreiko, C., Mondal S., Narayan, S., og Heidelberger, C. (1980) "Effect of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate on the Morphology and Growth of C3H/10T1/2 Mouse Embryo Cells". Cancer Res. 40, 4709-4716.

Bradford, M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brandt, S.J., Niedel, J.E., Bell, R.M., Young, W.S. (1987) "Distinct patterns of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues". Cell 49, sidene 57-63.

Catino, J.J., Francher, D.M., Edinger, K.J., og Stringfellow, D.A. (1985) "A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents". Cancer Chemother. Pharmacol. 15, 240-243.

Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., & Ullrich, A. (1986) "Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways". Science 233, 859-866.

Dailey, L. og Basilico, C. (1985) "Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression". J. Virol. 54, 739-749.

Daley, G.Q., McLaughlin, J., Witte, O.N., Baltimore, D. "The CML-Spesific P210 bcr/abl Protein, Unlike v-abl, Does Not Transform NIH/3T3 Fibroblasts Science". 237, sidene 532-535.

Davis, R.J. og Czech, M.P. (1985) "Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine". 654. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 4080-4084.

Freeman, A.E., Price, P.J., Igel, H.J., Young, J.C., Maryak, J.M. Huebner, R.J. (1970) "Morphological transformation of rat embryo cells induced by diethylnitrosamine and murine leukemia viruses". J. Natl. Cancer Inst. 44, sidene 65-78.

Freedman, V.H. og Shin, S. (1974) "Cellular Tumorigenicity in nude Mice: Correlation with Cell Growth in Semi-Solid Medium". Cell 3, 355-359.

Graham, F.L. og van der Eb, A.J. (1973) "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA". Virology 52, 456-467.

Gould, K.L., Woodgett, J.R., Cooper, J.A., Buss, J.E., Shalloway, D., Hunter, T. (1985) "Protein Kinase C Phosphorylates pp60src at a novel site". Cell 42, sidene 849-857.

Horowitz, A.D., Greenebaum, E. og Weinstein, I.B. (1981) "Identification of receptors for phorbol ester tumor promoters in intact mammalian cells and of an inhibitor of receptor binding in biologic fluids". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, sidene 2315-2319.

Housey, G.M., O'Brian, C.A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P. og Weinstein, I.B. (1987) "Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: Evidence for a protein kinase C-related gene family". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, sidene 1065-1069.

Housey, G.M., Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W. & Weinstein, I.B. (1985) "Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas". Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 391-398.

Hsiao, W.-L.W., T. Wu, Weinstein I.B. (1986) "Oncogene-Induced Transformation of a Rat Embryo Fibroblast Cell Line is Enhanced by Tumor Promoters". Mol. Cell. Biol. 6, sidene 1943-1950.

Hunter, T., Ling, N., Cooper, J.A. (1984) "Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane". Nature 311, 480-3.

Huang, K.P., Nakabayashi, H., Huang, F.L. (1986) "Isozymic forms of rat brain Ca2+-activated, phospholipid-dependent protein kinase". Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8535-8539.

Jaken, S. og Kiley, S. (1987) Purification and characterization of three types of protein kinase C from rabbit brain cytosol". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, sidene 4418-4422.

Jeng, A.Y., Srivastava, S.K., Lacal, J.C., Blumberg, P.M. (1987) "Phosphorylation of ras oncogene product by protein kinase C". Biochem. Biophys. Res. Commun. 145, sidene 782-8.

Johnson, M.D., Housey, G.M., Kirschmeier, P. og Weinstein, I.B. (1987) "Molecular Cloning of Gene Sequences Regulated by

Tumor Promoters Through Protein Kinase C". Mol. Cell Biol. 7, 2821-2829.

Kajikawa, N., Kishimoto, A., Shiota, M. & Nishizuka, Y. (1983) "Ca2+-dependent neutral protease and proteolytic activation of Ca2+-activated, phospholipid-dependent protein kinase". Methods. Enzymol. 102, 279-290.

Kawamoto, S. og Hidaka, H. (1984) "1-(5-isoquinolinesulfonyl) -2-methyl-piperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets". Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 258.

Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. og Nishizuka, Y. (1982) "Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties". J. Biol. Chem. 257, 13341-13348.

Kirschmeier, P.T., Housey, G.M., Johnson, M.D., Perkins, A.S. og Weinstein, I.B. (1988) "Construction and Characterization of a Retroviral Vector Demonstrating Efficient Expression of Cloned cDNA Sequences". DNA, under trykking.

Knopf, J.L., Lee, M-H, Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. % Bell, R. (1986) "Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs". Cell 46, 491-502.

Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227, 680-685.

Leach, K.L., James, M.L. & Blumberg, P.M. (1983) "Characterization of a spesific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4208-4212.

Lusky, M. og Botchan, M. (1981). "Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences". Nature 293, 74-81.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., Axel, R. (1986) "The T4 Gene Encodes the AIDS Virus Receptor and Is Expressed in the Immune System and the Brain". Cell 47, sidene 333-348.

Makowske, M., Birnbaum, M.J., Ballester, R., Rosen, O.M. (1986) "A cDNA encoding PKC identifies two species of mRNA in brain and GH3 cells". J. Biol. Chem. 261, sidene 13389-13392.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. red. (1983) "in Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Mann, R., Mulligan, R.C. og Baltimore, D. (1983) "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus". Cell 33, 153-159.

Nishizuka, Y. (1986) "Studies and Perspectives of Protein Kinase C". Science 233, 305-312. Nishizuka, Y. (1984) "The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Transduction and Tumour Promotion". Nature (London) 308, 693-698.

O'Brian, C.A., Lawrence, D.S., Kaiser, E.T. & Weinstein, I.B. (1984) "Protein kinase C phosphorylates the synthetic peptide Arg-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val in the presence of phospholipid plus either Ca2+ or a phorbol ester tumor promoter". Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 296-302.

O'Brian, C., Arcoleo, J., Housey, G.M. & Weinstein, I.B. (1985) i "Cancer Cells 3", red. Feramisco, J., Ozanne, B. & Stiles, C. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 359-363.

O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon D.H. og Weinstein, I.B. (1985) "Inhibition of Protein Kinase C by Tamoxifen". Cancer Res. 45, 2462-2465.

Ono, Y., Kurokawa, T., Fujii, T., Kawahara, K., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K., Nishizuka, Y. (1986) "Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C". FEBS 206, 347-52.

Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Tomoko, F., Kurokawa, T., Asaoka, Y, Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., Nishizuka, Y. (1987) "Expression and Properties of Two Types of Protein Kinase C: Alternative Splicing from a Single Gene". Science 236, sidene 1116-1120.

Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokohura, H., Sakoh, T., Hidaka, H. (1987) "Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C". Nature (London) 325. sidene 161-6.

Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., & Ullrich, A. (1986) "The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor". Science 233, 853-858.

Perkins, A.S., Kirschmeier, P.T., Gattoni-Celli, S. og Weinstein I.B. (1983). "Design of a retrovirus-derived vector for expression and transduction of exogenous genes in mammalian cells". Mol. Cell Biol. 3, 1123-1132.

Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., Sacco, O. og Horecker, B.L. (1987) "Phosphorylation and proteolytic modification of specific cytoskeletal proteins in human neutrophils stimulated by phorbol-12-myristate 13-acetate". Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 3604-3608.

Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) "Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation". Cell 48, 913-922.

Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1985) "Screening of Agents Which Convert 'Transformed Morphology' of Rous Sarcoma Virus-Infected Rat Kidney Cells to 'Normal Morphology': Identification of an Active Agent as Herbimycin and its Inhibition of Intracellular src Kinase". Jpn. J. Cancer Res. 76, 672-675.

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

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

Weinstein, I.B., (1987) "Growth Factors, Oncogenes, and Multistage Carcinogenesis". J. Cell. Biochem. 33, sidene 213-224.

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

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

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

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

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at man:

a) tilveiebringer en første cellelinje som produserer nevnte protein og utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet;

b) tilveiebringer en annen cellelinje som produserer proteinet i et lavere nivå enn den første cellelinjen, eller ikke produserer proteinet, og som utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet i en mindre grad eller ikke i det hele tatt;

c) inkuberer forbindelsen med de første og andre cellelinjene; og

d) sammenligner den fenotypiske responsen til den første cellelinjen overfor forbindelsen med den fenotypiske responsen til den andre cellelinjen overfor forbindelsen.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen kan observeres med det blotte øye.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i et dyrknings- eller morfologisk karaktertrekk til cellen.

4.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i evnen som cellelinjen har til å vokse på en forankrings-uavhengig måte.

5.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i evnen som cellelinjen har til å vokse på soft agar.

6.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i foci-dannelse i cellekulturen.

7.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i evnen som cellene har til å ta opp en selektert stamme.

8.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er et enzym.

9.
Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at den økte aktiviteten til enzymet er korrelert med øket tumorigenese.

10.
Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at enzymet er et proteinkinase C-enzym eller et fragment, et domene eller en subenhet til en reseptor som har proteinkinase C-aktivitet.

11.
Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at enzymet er ornitindekarboksylase.

12.
Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er ekspresjonsproduktet til et onkogen.

13.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen er en antatt inhibitor av den biologiske aktiviteten til proteinet.

14.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen er en antatt aktivator til den biologiske aktiviteten til proteinet.

15.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte første cellelinje oppnås ved å innføre et gen kodende for proteinet av interesse inn i en vertscelle, idet genet er under kontroll av en promoter som er funksjonell i vertscellen, idet nevnte gen blir uttrykt.

16.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at genet føres inn i vertscellen ved hjelp av en første genetisk vektor hvor genet er blitt satt inn, og nevnte andre cellelinje oppnås ved å føre inn i en lignende vertscelle en annen genetisk vektor hovedsakelig identisk med den første genetiske vektoren med unntak av at den ikke inneholder genet av interesse.

17.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at genet føres inn i vertscellen ved hjelp av en retroviral vektor.

18.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellelinjen ikke produserer proteinet.

19.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellelinjen er en Rotte-6-fibroblastcellelinje.

20.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i differensieringstilstanden til cellen.

21.
Testkit for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav vekker en responsiv forandring i et fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået til nevnte protein i nevnte celle per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:

a) en første cellelinje som produserer proteinet og utviser nevnte fenotypiske respons dertil; og

b) en andre cellelinje som produserer proteinet i et lavere nivå enn den første cellelinjen, eller produserer ikke proteinet, og som utviser nevnte fenotypiske respons til proteinet i en mindre grad eller ikke i det hele tatt.

22.
Testkit ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at produksjonsnivået til proteinet i den første cellelinjen er minst fem ganger høyere enn produksjonsnivået av proteinet i den andre linjen.

23.
Testkit ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fenotypiske responsen til ekspresjon av proteinet blir valgt fra gruppen bestående av forandringer i veksthastighet, metningstetthet, utsåingseffektivitet i soft agar, kolonistørrelse i soft agar og kombinasjoner derav.

24.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at responsen er en forandring i et antigenisk karaktertrekk til cellen.

25.
Fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i et fenotypisk karaktertrekk forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at man:

a) tilveiebringer en celle som er blitt genetisk endret til å overprodusere et valgt protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det overproduserte valgte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlede cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypisk karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse.

26.
Fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen derav i en celle vekker en reagerende forandring i

et fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at man:

a) tilveiebringer en celle som er blitt genetisk endret til å overprodusere et valgt protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det overproduserte valgte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlete cellen for å bestemme om den utviser nevnte gradert cellulær respons til nevnte forbindelse.

27.

Fremgangsmåte ifølge krav 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at den graderte cellulære responsen reflekterer en forandring i et fenotypisk karaktertrekk som er avhengig av produksjonen av det valgte proteinet.

28.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at undersøkingen for en forandring i fenotypisk karaktertrekk innbefatter sammenligning av responsen til den behandlete cellen med responsen til en sammenlignbar ubehandlet celle.

29.

Fremgangsmåte ifølge krav 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at undersøkingen for en gradert cellulær respons innbefatter sammenligning av den fenotypiske responsen til den behandlete cellen med den til en sammenlignbart behandlet celle som ikke er blitt endret til å genetisk uttrykke det valgte proteinet.

30.

Fremgangsmåte ifølge kravene 25 eller 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at den genetisk endrete cellen blir valgt fra gruppen bestående av celler som er blitt genetisk omkonstruert ved innskudd av en nukleinsyresekvens og celler

som er blitt mutert for å øke ekspresjonen av det valgte proteinet.

31.

Fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvori tilstedeværelsen av nevnte protein i nevnte celle vekker en responsiv forandring i et fenotypisk karaktertrekk, forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle, per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at man:

a) tilveiebringer en celle inneholdende et selektert protein,

b) behandler nevnte celle inneholdende det selekterte proteinet med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlede cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypiske karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse.

32.

Fremgangsmåte ifølge kravene 25 eller 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten innbefatter at den fenotypiske responsen til cellen i nærvær av forbindelsen sammenlignes med den fenotypiske responsen i en celle i nærvær av en kjent inhibitor eller aktivator av proteinet.

33.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at forandringen i et fenotypisk karaktertrekk kan observeres med det bare øye.

34.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at en forandring i et fenotypisk karaktertrekk blir observert, og nevnte karaktertrekk blir valgt fra gruppen bestående av en kultur eller morfologisk karaktertrekk, evnen til å vokse på en forankringsuavhengig måte, evnen til å vokse på bløt agar, foci-dannelse i cellekulturen, evnen som

cellen har til å ta opp en selektert stamme, differensieringsstadiet til cellen og et antigent karaktertrekk.

35.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet blir valgt fra gruppen bestående av et enzym eller et ekspresjonsprodukt av et onkogen.

36.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte celle blir oppnådd ved å innføre et gen kodende for protein av interesse inn i en vertscelle, idet nevnte gen står under kontroll av en promoter som er funksjonell i vertscellen, hvori nevnte gen blir uttrykt.

37.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at genet blir ført inn i vertscellen ved hjelp av en genetisk vektor hvori genet er blitt skutt inn.

38.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at genet blir ført inn i vertscellen ved hjelp av en retroviral vektor.

39.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellen ikke produserer proteinet.

40.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellen er rotte-6-fibroblastcelle.

41.

Fremgangsmåte for å bestemme om en forbindelse er en inhibitor eller en aktivator av et protein hvor tilstedeværelsen i en celle vekker en reagerende forandring i et

fenotypisk karaktertrekk som er forskjellig fra nivået av nevnte protein i nevnte celle per se, k a r a k t e r i s e r t v e d at man:

a) tilveiebringer en celle hvori nevnte protein er blitt innført,

b) behandler nevnte celle inneholdende nevnte innførte protein med nevnte forbindelse, og

c) undersøker den behandlete cellen for å bestemme om den utviser en forandring i nevnte fenotypisk karaktertrekk i respons til nevnte forbindelse.

42.

Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at den reagerende forandringen i et fenotypisk karaktertrekk blir bestemt på en subcellulær fraksjon av cellen.

43.

Testcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er tilstede i cellen et målprotein, hvori tilstedeværelsen av målproteinet induserer en forandring i et selektert fenotypisk karaktertrekk til testcellen, forskjellig fra nivået av målproteinet i testcellen, per se, hvori forandringen i det selekterte fenotypiske karaktertrekket er sammenlignbart høyere i testcellen enn i en kontrollcelle, og hvori forandringen i det selekterte fenotypiske karaktertrekket er blitt funnet å være responsiv for behandling med en testforbindelse som har evne til å inhibere eller aktivere en biokjemisk funksjon til et målprotein, med en fremgangsmåte omfattende følgende trinn:

a) tilveiebringing av en testcelle hvori et målprotein er tilstede i et høyere nivå i forhold til en kontrollcelle som produserer proteinet i lavere nivå eller som i vesentlig grad ikke produserer proteiner;

b) behandling av testcellen ifølge trinn a) inneholdende målprotein ifølge trinn a) med en testforbindelse; og

c) undersøke den behandlede testcellen ifølge trinn b) for å bestemme om et selektert fenotypisk karaktertrekk som er responsiv overfor inhibisjon eller aktivering av mål-proteinet ifølge trinn a) er blitt endret ved behandling med testforbindelsen ifølge trinn b).

FIG. 1.

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

FIG. 1. FORTS. :

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

FIG. 1. FCRTS.:

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

FIG. 1. FORTS.:

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

          2230        2240        2250        2260        2270        2280
                *           *           *           *           *           *
GCT TGT CTT AGA GGG CTT TTC TTT GTA TGT ATA GCT TGC TAG TTT GTT TTC TAC ATT TCA

          2290        2300        2310        2320        2330        2340
                *           *           *           *           *           *
AAA TGT TTA GTT TAG AAT AAG TGC ATT GCC CAC TGA TAG AGG TAC AAT TTT CCA GAC TTC
```

FIG. 1. FORTS.:

```
          2350          2360          2370          2380          2390          2400
            *             *             *             *             *             *
CAG AAA CTC ATC CAA TGA ACC AAC AGT GTC AAA ACT TAA CTG TGT CCG ATA CCA AAA TGC

          2410          2420          2430          2440          2450          2460
            *             *             *             *             *             *
TTC AGT ATT TGT AAT TTT TAA AGT CAG ATG CTG ATG TTC CTG GTC AAA GTT TTT ACA GTT

          2470          2480          2490          2500          2510          2520
            *             *             *             *             *             *
ACT CTC GAA TAT CTC CTT TGA ATG CTA CCT AAG CAT GAC CGG TAT TTT TAA AAG TTG TGA

          2530          2540          2550          2560          2570          2580
            *             *             *             *             *             *
GTA AGC TTT GCA GTT ACT GTG AAC TCT TGT CTC TTG GAG GAA CTT TTT GTT TAA GAA TTG

          2590          2600
            *             *
GTA TGA TTA AAC TGA ATT CT
```

FIG. 1.
B.

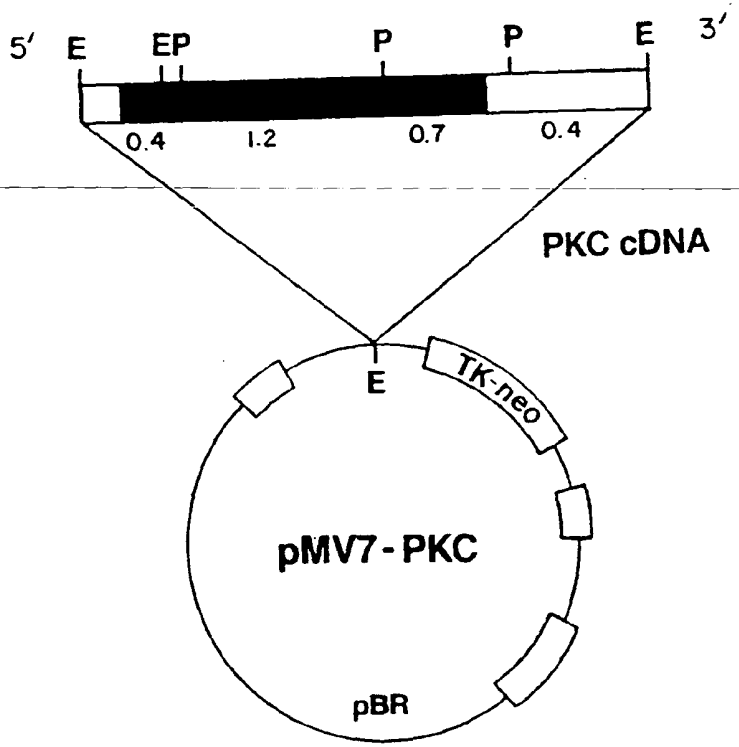
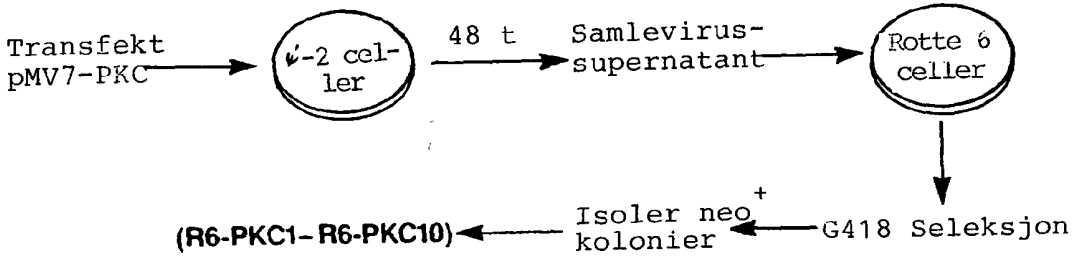


FIG. 1.
C.



313103

FIG. 2.

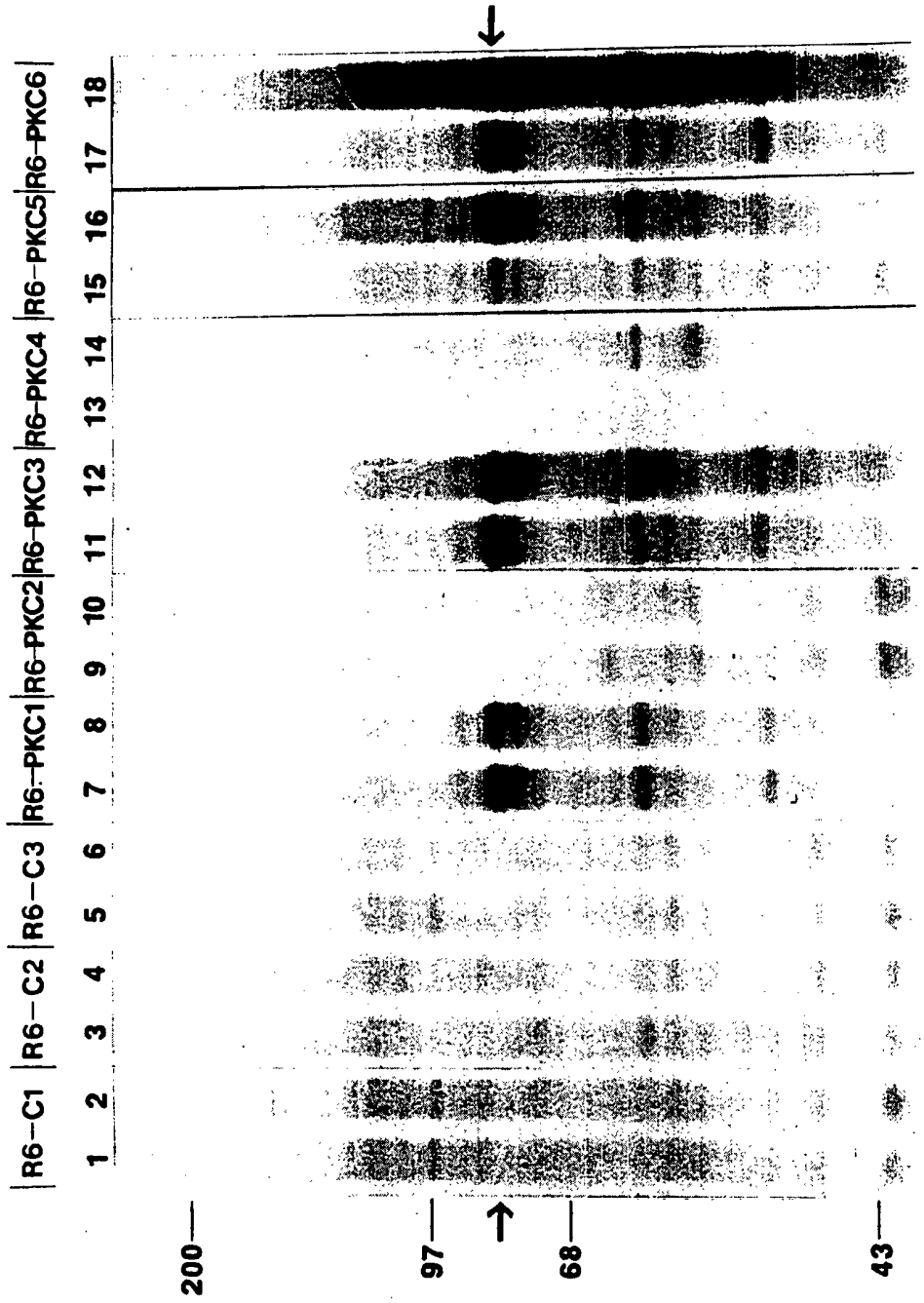

R6-C1
R6-C2
R6-C3
R6-PKC1
R6-PKC2
R6-PKC3
R6-PKC4
R6-PKC5
R6-PKC6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
200
97
68
43

FIG. 3

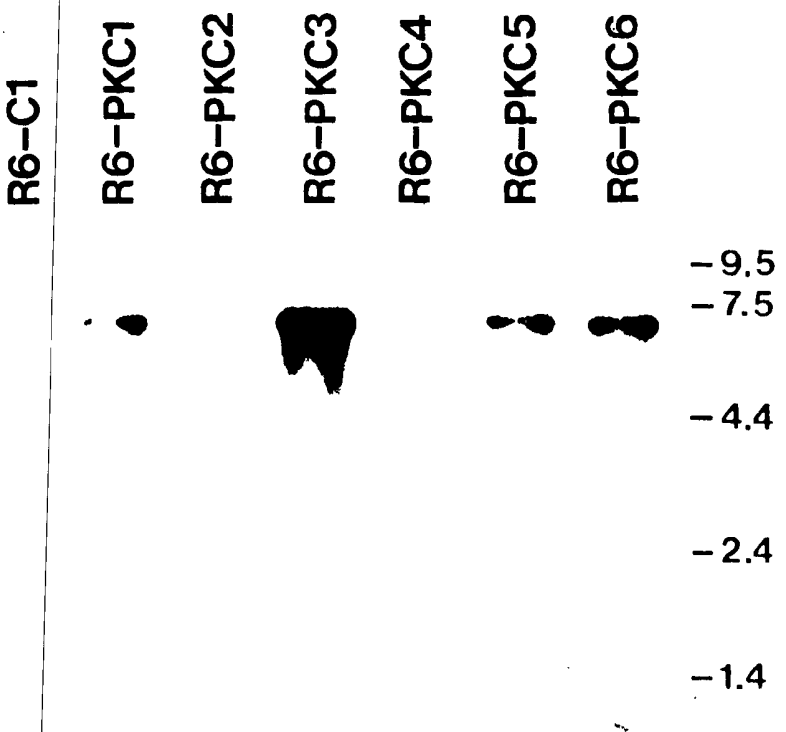

R6-C1
R6-PKC1
R6-PKC2
R6-PKC3
R6-PKC4
R6-PKC5
R6-PKC6
-9.5
-7.5
-4.4
-2.4
-1.4

FIG. 4.

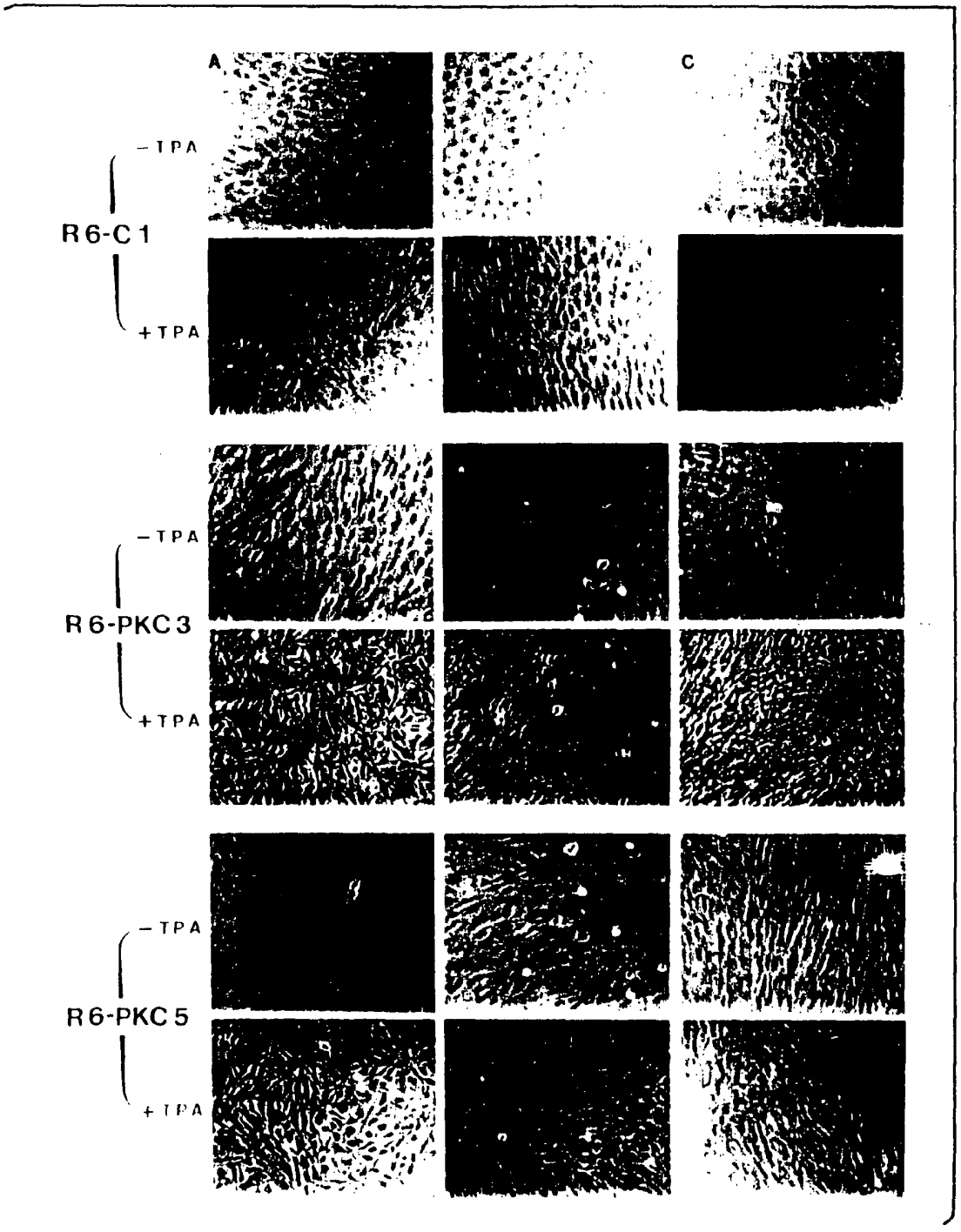


FIG. 5.

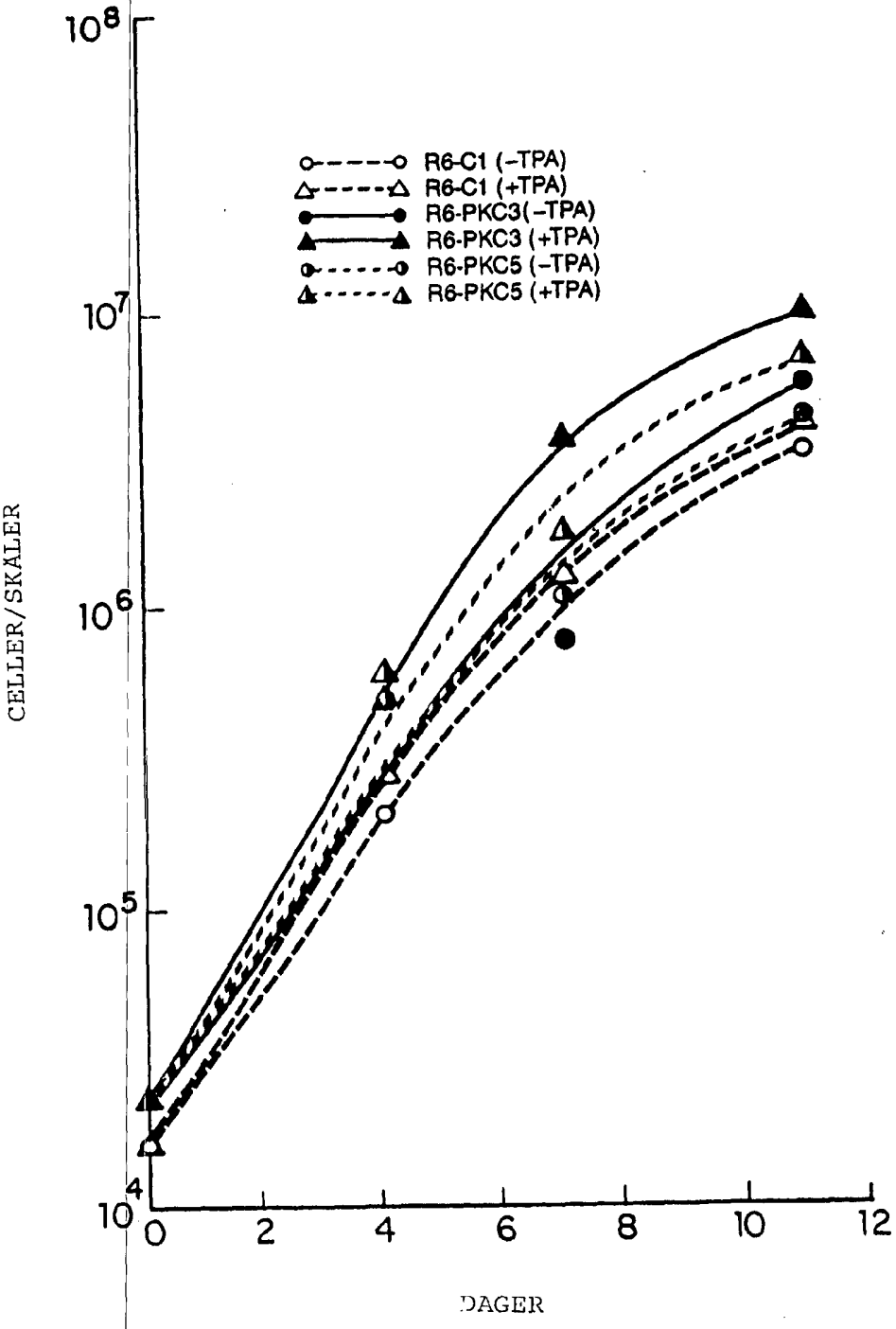

R6-C1 (-TPA)
R6-C1 (+TPA)
R6-PKC3(-TPA)
R6-PKC3 (+TPA)
R6-PKC5 (-TPA)
R6-PKC5 (+TPA)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
CELLER/SKALER
0
2
4
6
8
10
12
DAGER

FIG. 6.

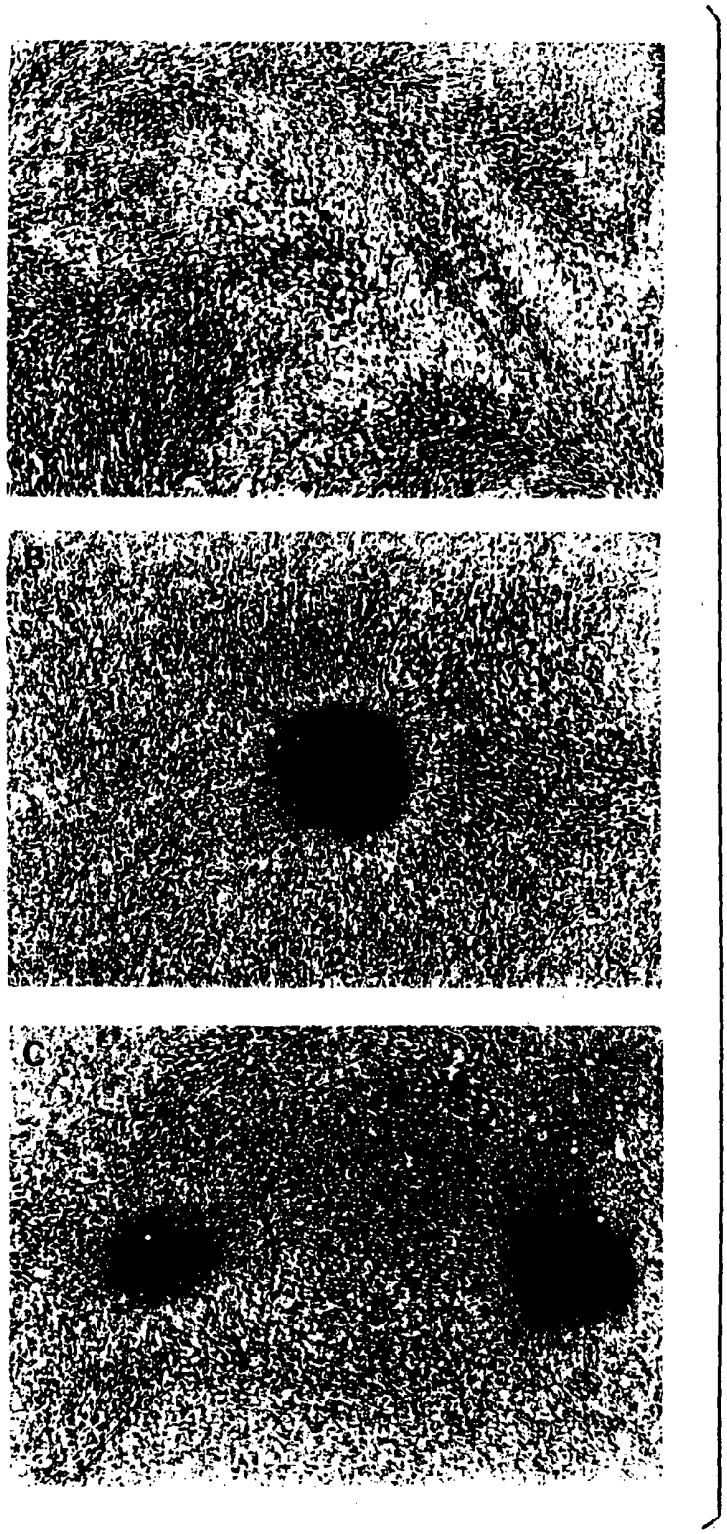
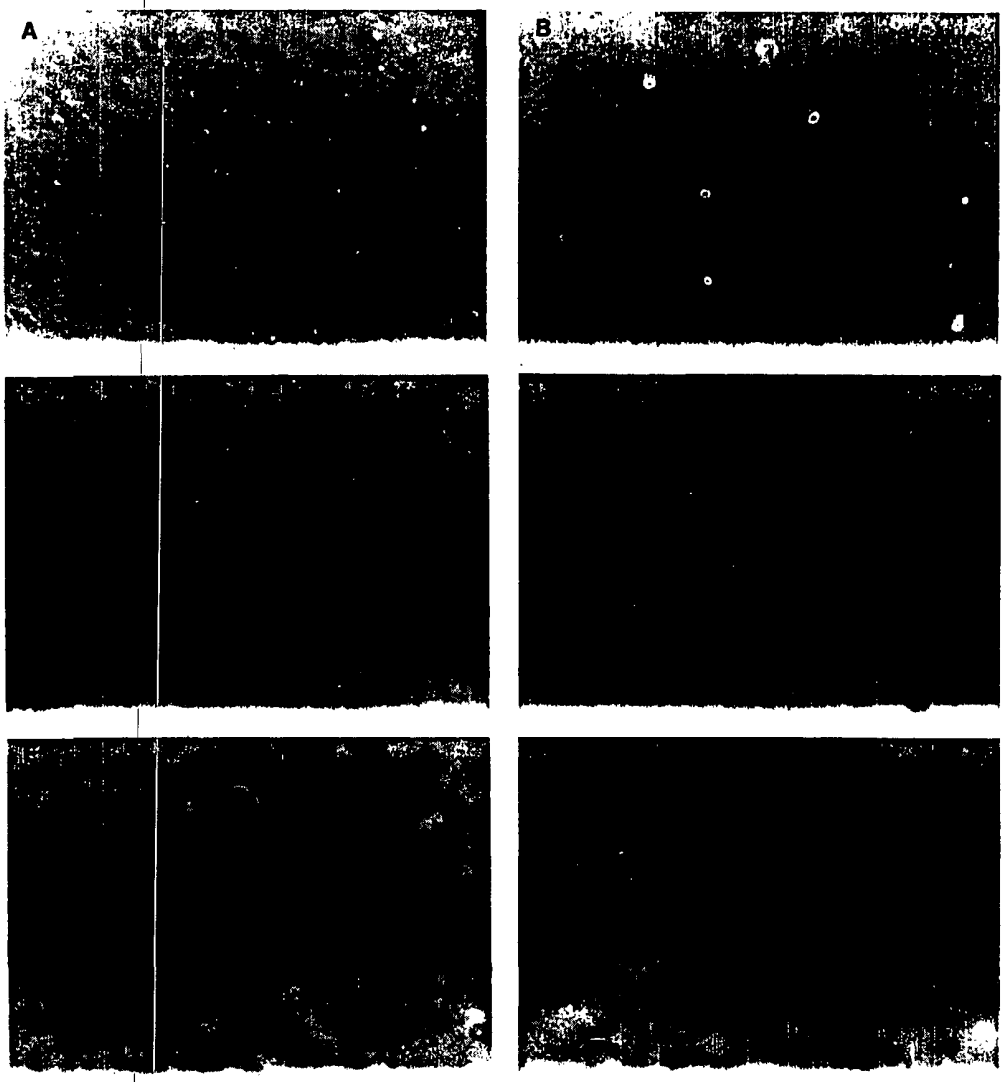



FIG. 7.