

HUMÁN DEZADENILEZŐ NUKLEÁZ, ENNEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

KIVONAT

A találmány humán dezadenilező nukleázt (DAN), amelynek aminosav szekvenciája a SEQ ID NO:11-nek felel meg, vagy ennek valamely funkcionális változatát kódoló nukleinsavakkal foglalkozik, illetve ezek részeivel, amelyek legalább 8 nukleotidot tartalmaznak.

. SEQ ID NO: 11

MEIIRS NFKS	NLHKVYQAIE	EADFFAIDGE	FSGISDGPSV	SALTNGFDTF	EERYQKLKKH	60
SMDFLLFQFG	LCTFRYDYTD	SKYITKSFNF	YVFPKPFNRS	SPDVKFVCQS	SSIDFLASQG	120
FDFNKVFRNG	IPYLNQEEER	QLREQYDEKR	SQANGAGALS	YVSPNTSKCP	VTIPEDQKKF	180
IDQVVEKIED	LLQSEENKNL	DLEPCTGFQR	KLIYQTLNWK	YPKGIHVETL	ETEEKERYIV	240
ISKVDEEERK	RREQQKHAK	QEELNDVGF	SRVIAHANS	GKLVIGHNML	LDVMHTVHQF	300
YCPLPADLSE	FKEMTTCVFP	RLLDTKLMS	TQPFKDIINN	TSLAELEKRL	KETPFNPPKV	360
ESAEGFPSYD	TASEQLHEAG	YDAYITGLCF	ISMANYLGSE	LSPPKIHVSA	RSKLIEPFFN	420
KLFLMRVMDI	PYLNLEGPDL	QPKRDHVLHV	TFPKEWKTSD	LYQLFSAFGN	IQISWIDDTN	480
AFVSLSQPEQ	VKIAVNTSKY	AESYRIQTYA	EYMGRKQEEK	QIKRKWTEDS	WKEADSKRLN	540
PQCIPYTLQN	HYIRNNSFTA	PSTVGKRNLN	PSQEEAGLED	GVSGEISDTE	LEQTDSCAEP	600
LSGRKKAKK	LKRMKKELSP	AGSISKNSPA	TLFEVPDTW			639

HUMÁN DEZADENILEZŐ NUKLEÁZ, ENNEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

A találmány humán dezadenilező nukleázra (DAN), az ezt kódoló nukleinsavra, valamint ezek előállítására és alkalmazására vonatkozik.

Az mRNS intracelluláris koncentrációját, úgy tűnik, nem csak a termelési, hanem a lebomlási sebességgel is lehet szabályozni. Itt úgy tűnik, hogy az mRNS-t nemcsak egy véletlenszerű nukleolitikus esemény, hanem speciális mechanizmusok és lebomlási arányok, amelyek a mindenkor RNS-re fajlagosak, is segítenek lebontani. Eddig két különböző lebomlási út ismeretes, amelyekben a poli(A)-farkak különleges szerepet játszanak. E. coli-ban poli(A)-farkak vannak ráfüggesztve mRNS-ekre vagy mRNS fragmentumokra, amelyek RN-áz E révén alakulnak ki. A poli(A)-farkok, úgy tűnik, viszonylag strukturálatlan egységként működik és ez egy komplex befogásáért felelős, amely komplex más fehérjék mellett egy polinukleotid-foszforilázt alakító processzív 3' exonukleázt és egy RNS-függő ATP-ázt tartalmaz; ezek segítenek az exonukleáznak a gátlandó szekunder szerkezetet az mRNS-ben megbecsülni. Úgy tűnik, hasonló mechanizmus működik a kloroplasztokban is.

Eukariótákban a poli(A)-farkak exonukleolitikus megrövidítése szintén beindítja sok, de nem minden mRNS leépítését. A baktériumokban végbemenő folyamattal ellentétben úgy tűnik, hogy a poli(A)-leépítendő exonukleáz lebontása nem a 3'-UTR-ben és a kódolandó szekvenciában megy tovább. E helyett úgy tűnik, hogy az eukarióta exonukleáz a poli(A)-farkak leépítése után áll meg. A S. cerevisiae-nál az mRNS leépítés második lépése az 5'-CAP szerkezet eltávolítását tartalmazza egy fajlagos pirofoszfátáz révén. A CAP



eltávolítása először kétségtelenül a poli(A)-farkak megrövidítése után megy végbe mintegy 10-15 nukleotidra. A CAP szerkezet eltávolítása az mRNS-t hozzáférhetővé teszi az 5' exonukleázok számára, amelyek fontosabb képviselőit az XRN1 gén kódolja.

A kiindulási dezadenilezési folyamat megfigyelése emlős állatokban viszonylag egyszerű, míg a további lépések vizsgálata az ez után következő leépülési folyamatok gyorsasága és az elemezhető köztes termékek hiánya miatt megnehezedik. Közvetett bizonyítékok léteznek, de csak a CAP-szerkezet eltávolításához a második lépésben. Egy homológot már leírtak egérből az XRN1 génhez. Általában a stabil mRNS-ek lassan, míg az instabil mRNS-ek gyorsan dezadenileződnek. A gyors leépülés függ a meghatározott destabilizáló szekvenciák előfordulásától a 3'-UTR-ben vagy a kódolandó szekvenciában. Mutációk ezekben a szekvenciákban ezen túl nemcsak az mRNS stabilizálásához vezetnek, hanem ugyanígy lassított dezadenilezéshez is. Ezzel ellentétben az α -globulin mRNS stabilizáló elemeinek inaktiválása instabilitáshoz és meggyorsított dezadenilezéshez vezet. Ezek az adatok egyértelműen jelzik az mRNS leépülés szabályozási lehetőségét a dezadenilezési sebesség révén.

Meghatározott mRNS-ek dezadenilezése ugyanúgy a transzláció inaktiválásához vezethet. Ez a poli(A)-farkak jelentőségével magyarázható a transzláció beindításához. A dezadenilezés, mint transzlációt szabályozó mechanizmus az oociták érésénél és a korai embriogenezisnél sok állatfajban döntő szerepet játszik. Így például a *Drosophiláknál* az embriók polaritása az úgynevezett „púpos” (hunchback) mRNS dezadenilezése révén szabályozódik.

Emlősökben alapvetően három dezadenilezési reakciót különböztetünk meg az oociták érésénél és a korai embriogenezisnél:



1. Éretlen oocitákban a legtöbb mRNS transláció szempontjából inaktív formában rövid poli(A)-farkakkal tárolódik. Példa erre az mRNS a tPA-hoz (szöveti plazminogén aktivátor) egerekben. Először ez az mRNS hosszú poli(A) farkakat kap a normális poliadenilezési reakcióban, amelyek azután dezadenilezés révén oligo(A)-farkakká rövidülnek. Ezt a rövidülést a 3'-UTR-ben levő szekvenciák irányítják.

2. Az oociták érésénél a dezadenilezés meghatározott mRNS-ek inaktiválására szolgál, amelyek eredetileg hosszú poli(A)-farkakkal bírnak és a korai petefejlődésben aktívak. A dezadenilezés nem függ fajlagos szekvenciáktól az mRNS-ben. Minden mRNS dezadenileződik azokon kívül, amelyek egy aktív adenilezési folyamat révén megőrződnek.

3. A korai embriogenezis folyamán meghatározott mRNS-ek egy fajlagos reakcióban dezadenileződnék, amelyhez ugyanígy fajlagos szekvenciák szükségesek a 3'-UTR-ben.

Mindhárom dezadenilezési reakció a citoplazmában megy végbe. A szomatikus sejtekkel ellentétben az oligoadenilezett vagy dezadenilezett mRNS-ek az oocitákban stabilak maradnak és újból adenileződnék vagy csak későbbi fejlődési stádiumokban épülnek le.

Eddig az ezekért a reakciókért felelős enzimeket egyértelműen nem azonosították. Élesztőben kimutatható volt, hogy a poli(A) leépülése közvetlenül vagy közvetve a poli(A)-kötő fehérjétől (PAB) függ. Bár egy PAB-függő poli(A)-nukleázt (PAN) megtisztítottak [Sachs A. B. és Deardorff (Cell 70, 961 (1992); Lowell J. E. és munkatársai: Genes Dev. 6, 2088 (1992), csak csekély hiányosságot lehetett megállapítani a szóban forgó gének mutánsainál (PAN2 és PAN3) a dezadenilezésben [Boeck R. és munkatársai: 271(1) (1996); Brown C. és munkatársai: 16(10) 5744 (1996).



Körner Ch. G. és Wahle E. [J. Biol. Chem. 272, 10448 (1997), No.16] leírnak egy Mg^{2+} -függő, poli(A)-fajlagos 3' exoribonukleázt borjú tímuszból 74 kDa molekulatömeggel, amely szintén a dezadenilező nukleázok (DAN) közé van besorolva. A borjú tímuszból való leírt DAN a citoplazmás poli(A)-kötő I. fehérje (PAB I) révén meghatározott reakciókörülmények között stimulálódik [Körner, Chr. és Wahle E., (fentebb idézett munka(1997))], előnyösen poli(A) szubsztrátumként.

A jelen találmány feladata egy humán poli(A)-fajlagos 3'-exoribonukleázt rendelkezésre bocsátani.

Egy génbankban most meglepő módon találtunk egy korábban nem jellemzett és csak szekvenciájában elemzett klónt, amely a találmány szerint egy humán dezadenilező nukleázt (humán DAN) kódol.

A találmány tárgya tehát egy a SEQ ID NO:11 szerinti aminosav szekvenciával bíró humán DAN-t kódoló nukleinsav, vagy ennek működőképes változata, vagy ennek valamely része legalább 8 nukleotiddal, előnyösen legalább 15 vagy 20 nukleotiddal, különösen előnyösen legalább 100 nukleotiddal, mindenekelőtt legalább 300 nukleotiddal (a továbbiakban ezeket „találmány szerinti nukleinsavak”-nak nevezzük).

A teljes nukleinsav egy 639 aminosavas, 73,5 kDa molekulatömegű fehérjét kódol. A nukleinsav expressziója E. coliban egy olyan fehérjéhez vezet, amely hasonló enzimikus aktivitást mutat, mint az a DAN, amelyet Körner Ch. G. és Wahle E. leírtak [korábban idézett munka (1997)]. A további kísérletek a találmány szerint igazolják, hogy ennél a nukleinsavnál olyan nukleinsavról van szó, amely egy humán DAN-t kódol. A találmány szerinti nukleinsavat letétbe helyeztük 1998. március 25-én DSM 12075 számon (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig).

Egy előnyös kiviteli formában a találmány szerinti nukleinsav egy DNS vagy RNS, előnyös egy kettős szálú DNS, és különösen előnyösen egy SEQ ID NO:12 szerinti nukleinsav szekvencia 58. helyétől 1977. helyéig terjedő DNS. A két említett hely a találmány szerint meghatározza a kódoló tartomány rajtját és végét.

A „működőképes változat” kifejezésen a találmány szerint olyan nukleinsavat értünk, amely a humán DAN-t kódoló nukleinsavnak megfelelően működőképesen alkalmazható és elsősorban humán eredetű. Az alkalmazható nukleinsavakra példák lehetnek a nukleinsavak eltérő humán sejtekből illetve szövetekből, vagy az allél variánsok. A találmány magában foglalja nukleinsavak minden változatát, amelyek különböző emberi egyedekből eredhetnek.

A találmány szerint továbbá a „változat” kifejezés olyan nukleinsavakat jelent, amelyek homológiája, elsősorban szekvencia-azonossága mintegy 60%-ot, előnyösen mintegy 75%-ot, különösen előnyösen 90%-ot és mindenekelőtt 95%-ot tesz ki.

A találmány szerinti nukleinsavak részeit például alkalmazni lehet egyedi epitópok előállításához, mint szondákat (vizsgáló mintákat) további működőképes változatok azonosítására, vagy mint antiszensz nukleinsavakat. Alkalmasak például legalább mintegy 8 nukleotidból álló nukleinsavak antiszensz nukleinsavakként, legalább mintegy 15 nukleotidból álló nukleinsavak primerként PCR-eljáráshoz, legalább mintegy 20 nukleotidból álló nukleinsavak további változatok azonosításához, és legalább mintegy 100 nukleotidból álló nukleinsavak szondaként.

Egy további előnyös kiviteli formában a találmány szerinti nukleinsav tartalmaz egy vagy több nem kódoló szekvenciát és/vagy egy poli(A)-szekvenciát. A nem kódoló szekvenciák például intron szekvenciák vagy



szabályozó szekvenciák, mint promóter- vagy fokozó szekvenciák a humán DAN-t kódoló gén szabályozott expressziójához.

Egy további kiviteli formában a találmány szerinti nukleinsavak vektorokban, előnyösen expressziós vektorokban vagy génterápiához hatásos vektorokban találhatók.

Az expressziós vektorok lehetnek például prokarióta vagy eukarióta expressziós vektorok. A prokarióta expressziós vektorokra *E. coliban* való expressziónál példák lehetnek a pGM10 T7 expressziós vektora (Martin, 1996), amely egy N-terminális Met-Ala-His6-toldatot (Tag-ot) kódol, és amely lehetővé teszi az exprimált fehérje tisztítását Ni^{2+} -NTA oszlopon. Eukarióta expressziós vektorként *Saccharomyces cerevisiae*-ben való expressziónál alkalmasak például a p426Met25 vagy p426GAL1 vektorok [Mumberg és munkatársai: Nucl. Acids Res. 22, 5767 (1994)], a rovarsejtekben való expressziónál alkalmasak például a Baculovirus vektorok, például azok, amelyek az EP-B1-0127839 vagy EP-B1-0549721 számú szabadalmi iratokban kerültek nyilvánosságra, és az emlős sejtekben való expressziónál alkalmasak például az SV40-vektorok, amelyek általánosan hozzáférhetők.

Az expressziós vektorok általában tartalmazznak a gazdasejtekhez alkalmas szabályozó szekvenciákat is, amilyen például a *trp* promóter az *E. coliban* való expresszióhoz (lásd például az EP-B1-0154133 számú európai szabadalmi iratot), az ADH-2 promóter az élesztőkben való expresszióhoz [Russel és munkatársai: J. Biol. Chem. 258, 2674 (1983)], a Baculovirus polihedrin promóter a rovarsejtekben való expresszióhoz (lásd pl. az EP-B1-0127839 számú európai szabadalmi iratot), vagy például a korai SV40 promóter vagy az MMTV egér emlőtumor vírus (Mouse Mammary Tumour Virus) LTR-promóterei [Lee és munkatársai: Nature 214, 228 (1981)].



A génterápiásan hatásos vektorokra példák lehetnek a vírus vektorok, előnyösen az adenovírus vektorok, elsősorban a replikációhiányos adenovírus vektorok vagy adeno-asszociált vírus vektorok, például egy olyan adeno-asszociált vírus vektor, amely kizárólag két beiktatott terminális ismétlődő szekvenciából (ITR) áll.

Alkalmas vírus vektorokat írnak le például az alábbi szakirodalmi helyeken: McGrory W. J. és munkatársai: *Virol.* 163, 164 (1988); Gluzman Y. és munkatársai: „Eukaryotic Viral Vectors” (Eukarióta vírus vektorok), szerkesztő: Gluzman Y., kiadó: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1982), 187. oldal; Chroboczek J. és munkatársai: *Virol.* 186, 280 (1992); Karlsson S. és munkatársai: *EMBO J.* 5, 2377 (1986); vagy a WO 95/00655 számú PCT közzétételi irat.

Alkalmas adeno-asszociált vírus vektorok például azok, amelyeket az alábbi irodalmi helyeken írnak le: Muzyczka N.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 97 (1992); WO 95/23867 számú PCT közzétételi irat; Samulski R. J.: *J. Virol.* 63, 3822 (1989); WO 95/23867 számú PCT közzétételi irat; Chiorini J. A. és munkatársai: *Human Gene Therapy* 6, 1531 (1995); és Kotin R. M.: *Human Gene Therapy* 5, 793 (1994).

Génterápiásan ható vektorokat úgy is nyerhetünk, hogy találmány szerinti nukleinsavakat liposzómákkal komplexbe viszünk. Ehhez alkalmasak az olyan lipid keverékek, amelyeket az alábbi irodalmi helyeken írnak le: Felgner P. L. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413 (1987); Behr J. P. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982 (1989); Felgner J. H. és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 269, 2550 (1994); és Gao X. és Huang L.: *Biochem. Biophys. Acta* 1189, 195 (1991). A liposzómák előállításánál a DNS-t ionosan a liposzómák felületére kötjük, mégpedig olyan arányban, hogy nettó pozitív töltés maradjon és a DNS teljesen komplexbe menjen a liposzómákkal.



A találmány szerinti nukleinsavakat például kémiai úton a SEQ ID NO:12-ben megadott szekvencia segítségével vagy a SEQ ID NO:11-ben megadott peptid szekvencia segítségével a genetikai kódot igénybe véve például a foszfortriészteres eljárással szintetizálhatjuk [lásd például Uhlmán E. és Peyman A.: Chemical Reviews 90(4), 543 (1990)]. További lehetőség a találmány szerinti nukleinsavakhoz való hozzáférésre az izolálás valamely alkalmas génbankból, például egy humán génbankból, egy megfelelő szonda (vizsgáló minta) segítségével [lásd például Sambrook J. és munkatársai: Molecular Cloning. A Laboratory Manual; 2. kiadás; Cold Spring Harbor, New York (1989)]. Szondaként alkalmasak például az egyedi szálú DNS fragmentumok mintegy 100 és 1000 nukleotid közötti hosszúsággal, előnyösen mintegy 200 és 500 nukleotid közötti hosszúsággal, különösen előnyösen mintegy 300 és 400 nukleotid közti hosszúsággal, amelyek szekvenciája a SEQ ID NO:12 szerinti nukleinsav szekvenciából levezethető.

A találmány további tárgya maga a polipeptid SEQ ID NO:11 szerinti szekvenciával, vagy ennek valamely működőképes változata legalább 6 aminosavval, előnyösen legalább 12 aminosavval, különösen előnyösen legalább 65 aminosavval és mindenekelőtt 638 aminosavval (ezt ezután „találmány szerinti polipeptid”-nek nevezzük). Egy 6-12, előnyösen 8 aminosav hosszúságú polipeptid tartalmazhat például egy epitopot, amely egy hordozóra való kapcsolás után fajlagos poli- vagy monoklonális antitestek előállítására szolgál (ezzel kapcsolatban lásd például az 5,656,435 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat). A legalább mintegy 65 aminosav hosszúságú polipeptidek közvetlenül, hordozó nélkül szolgálhatnak poli- vagy monoklonális antitestek előállítására.

A „működőképes változat” kifejezésen a találmány értelmében olyan polipeptideket értünk, amelyek a találmány szerinti polipeptidekhez

hasonlóan működőképesen alkalmazhatók, vagyis egy poli(A)-fajlagos 3'-exoribonukleáz aktivitással bírnak és előnyösen két különböző reakciókörülménynél aktívak. Az első reakciókörülménynél, só távollétében az aktivitás teljes mértékben spermidin jelenlététől függ. Ezzel ellentétben spermidin jelenlétében az enzim aktivitása a sókoncentrációtól függ. Ezen kívül PABI jelenlétében meghatározott reakciókörülmények között a poli(A)-farkak lépcsőzetes leépülése figyelhető meg [lásd még: Körner Chr. G. és Wahle E. előzőekben idézett munkáját (1997)]. Különösen különböznek a mintegy 30 nukleotid körül hosszúságú uralkodó lebomlási termékek. A változatok közé értjük az allél változatokat vagy polipeptideket, amelyek más emberi sejtekből illetve szövetekből származnak. Ide értjük azokat a polipeptideket is, amelyek különböző emberi egyedekből származnak.

További értelmezés szerint ide értjük azokat a polipeptideket is, amelyeknek szekvencia homológiájuk, elsősorban szekvencia azonosságuk van mintegy 70%-ban, előnyösen mintegy 80%-ban, különösen előnyösen 90%-ban és mindenekelőtt 95%-ban a SEQ ID NO:11 szerinti aminosav szekvenciával bíró polipeptidekhez. Ide számítjuk a polipeptid kiiktatásait (deléciókat) is mintegy 1-60, előnyösen mintegy 1-30, különösen előnyösen 1-15, mindenekelőtt 1-5 aminosavval. Hiányozhat például a metionin első aminosav anélkül, hogy a polipeptid működése lényegében megváltozna. Ide számítjuk emellett a fúziós fehérjéket is, amelyek az előzőekben leírt találmány szerinti polipeptideket tartalmazzák, és amelyeknél a fúziós fehérje maga már rendelkezik humán DAN funkcióval, vagy csak a fúziós rész lehasítása után kaphatjuk meg ezt a funkciót. Ide számítjuk mindenekelőtt az olyan részekkel bíró fúziós fehérjéket, amelyek mintegy 1-200 aminosavnyi, előnyösen mintegy 1-150 aminosavnyi, különösen előnyösek mintegy 1-100 aminosavnyi és elsősorban mintegy 1-50 aminosavnyi nem-humán

szekvenciával bírnak. A nem humán peptid szekvenciákra példák lehetnek prokarióta peptid szekvenciák például az *E. coli* galaktozidázából, vagy az úgy nevezett hisztidin-toldat, például Met-Ala-His6-toldat. Egy fúziós fehérje egy úgynevezett hisztidin-toldattal különösen előnyösen alkalmas az exprimált fehérje tisztításához fémion-tartalmú oszlopokon, például egy Ni^{2+} -NTA oszlopon. Az „NTA” név a kelátképző „nitrilo-triecetsav”-ra utal (Qiagen GmbH, Hilden).

A találmány szerinti polipeptidek részeit képviselhetik például az epitópok, amelyeket az antitestek fajlagosan képesek felismerni.

Ismert nukleázokkal való összehasonlítással úgy találjuk, hogy a találmány szerinti polipeptid az úgynevezett RN-áz D család tagja. A 4. ábra bemutatja az Exol, Exoll és Exolll motívumok megőrzött aminosavait, amelyek az exonukleázok családjára jellemzők. További megőrzött aminosavak szürkével vannak aláfestve. A három savanyú aminosav oldallánc, kettő az Exol doménben és egy az Exolll doménben, közvetlenül érdekeltek a két Mg^{2+} -ion kötésében, amelyek az enzimes hidrolízisben részesek. Egy harmadik savanyú aminosav oldallánc, amely az Exoll doménben van lokalizálva, a fémionok egyikét köti a hidrogénhíd molekulával. Mindezek az aminosav gyökök a családon belül nagy mértékben megőrzöttek és megtalálhatók a találmány szerinti humán DAN-ban is. A találmány szerinti polipeptid ezért az RN-áz család poli(A)-fajlagos 3'-exoribonukleázaként nevezhető meg.

A találmány szerinti polipeptid például a találmány szerinti nukleinsavak expressziójával állítható elő megfelelő expressziós rendszerben, amint az előzőekben már leírtuk, a szakember számára általánosan ismert eljárásokkal. Gazdasejtekként alkalmasak például a DH5, HB101 vagy BL21 *E. coli* törzsek a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek, a pikkelyesszárnyú rovarok sejtjei, például *Spodoptera*

frugiperda sejtek, vagy állati sejtek, mint a COS, Vero, 293 vagy HeLa sejtek, amelyek mind általánosan hozzáférhetők.

A nevezett polipeptid részek különösen jól szintetizálhatók a klasszikus peptid szintézis (Merrifield technika) segítségével. Ez különösen alkalmas olyan antiszérumok (próbák) előállítására, amelyek segítségével megfelelő gén expressziós bankok átvizsgálhatók, hogy a találmány szerinti polipeptidek további funkcionális változataihoz jussunk.

A találmány egy további tárgya tehát találmány szerinti polipeptidek előállítási eljárására vonatkozik, amely szerint egy találmány szerinti nukleinsavat megfelelő gazdasejtben exprimálunk és kívánt esetben a polipeptidet izoláljuk.

A találmány egy további tárgya olyan antitestekre vonatkozik, amelyek a találmány szerinti polipeptidekkel fajlagosan reagálnak, ahol a polipeptidek fentebb megnevezett részei vagy maguk immunogének, vagy egy megfelelő hordozóhoz, például szarvasmarha szérum albuminhoz, való kapcsolás révén immunogénekké válnak, illetve immunogenitásuk növelhető.

Az antitestek lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak. Az előállítás, amely a találmány tárgyát képezi, végbemehet például általánosan ismert eljárásokkal valamely emlős, például nyúl immunizálása révén valamely találmány szerinti polipeptiddel vagy megnevezett részeivel, kívánt esetben például Freund-féle adjuváns és/vagy alumínium-hidroxid gél jelenlétében [lásd például Diamond B. A. és munkatársai: The New England Journal of Medicine, 1344 (1981)]. Az állatban egy immunológiai reakció alapján képződött poliklonális antitestek ezután általánosan ismert eljárások szerint vérből könnyen izolálhatók és például oszlopkromatográfiával tisztíthatók. Előnyös az antitestek affinitásos tisztítása, amelynél például a C-terminális DAN-



fragmentum egy NHS-sel aktivált HiTrap (Hi-csapda)-oszlopra van kapcsolva.

Monoklonális antitesteket lehet előállítani például Winter és Milstein ismert eljárásával [Winter G. és Milstein C.: Nature 349, 293 (1991)].

A találmány tárgya továbbá olyan gyógyszer is, amely valamely találmány szerinti nukleinsavat vagy valamely találmány szerinti polipeptidet, továbbá kívánt esetben megfelelő adalék- vagy segédanyagokat tartalmaz, és a találmány tárgya valamely gyógyszer előállítása rák, autoimmun betegségek, elsősorban szklerózis multiplex vagy reumás ízületi gyulladás, továbbá Alzheimer-kór, allergiák, elsősorban neurodermitisz, I. típusú allergia vagy IV. típusú allergia, valamint artrózis, ateroszklerózis, csontritkulás, akut és krónikus fertőző betegségek és/vagy cukorbeteg kezelésére és/vagy a sejtm metabolizmus befolyásolására elsősorban az immunszuppresszió, mindenekelőtt transzplantációknál, amely eljárásban egy találmány szerinti nukleinsavat, például valamely úgynevezett antiszensz nukleinsavat, vagy valamely találmány szerinti polipeptidet valamely gyógyászati elfogadható adalék- vagy segédanyaggal együtt kisserelünk.

A génterápiás alkalmazáshoz embereknél minenekelőtt olyan gyógyszerek alkalmasak, amelyek a találmány szerinti nukleinsavakat tiszta formában, vagy valamely fentebb leírt, génterápiában hatásos vektorral képzett komplex formában, vagy liposzómával képzett komplex formában tartalmazza.

Megfelelő adalék- és/vagy segédanyagként alkalmasak lehetnek például a fiziológias konyhasóoldat, stabilizátorok, proteináz-inhibitorok, nukleáz-inhibitorok, stb.

A találmány további tárgya valamely diagnosztikum, amely tartalmaz egy találmány szerinti nukleinsavat, egy találmány szerinti polipeptidet vagy találmány szerinti antitesteket és kívánt esetben megfelelő adalék-



és/vagy segédanyagokat; a találmány tárgya továbbá eljárás valamely diagnosztikum előállítására rák, autoimmun betegségek, elsősorban szklerózis multiplex vagy reumás ízületi gyulladás, továbbá Alzheimer-kór, allergiák, elsősorban neurodermitisz, I. típusú allergia vagy IV. típusú allergia, valamint artrózis, ateroszklerózis, csonttritkulás, akut és krónikus fertőző betegségek és/vagy cukorbetegség diagnózisához és/vagy sejtm metabolizmus, elsősorban immunállapot (főleg transzplantációknál) elemzéshez, ahol valamely találmány szerinti nukleinsavval, valamely találmány szerinti polipeptidet, vagy találmány szerinti antitesteket keverünk össze megfelelő adalék és/vagy segédanyagokkal.

Elő lehet állítani például a találmány szerinti nukleinsavak segítségével egy diagnosztikumot polimeráz láncreakció (PCR-diagnosztikum, például az EP-0200362 számú európai szabadalmi irat szerint) vagy Northern-foltképzés alapján, amint ezt az 5. példában a későbbiekben leírjuk. Ezek a vizsgálatok a találmány szerinti nukleinsavak fajlagos hibridizálásán alapulnak szokásosan a megfelelő mRNS komplementer ellenszállával. A találmány szerinti nukleinsav itt módosítva is lehet, amint ezt például az EP 0063879 számú szabadalmi iratban leírják. A találmány szerinti DNS fragmentumot megfelelő reagensekkel, előnyösen például radioaktív α -P³²dATP-vel vagy nem radioaktív biotin segítségével jelöljük általában jól ismert eljárások segítségével, majd az izolált RNS-sel, amely előnyösen megfelelő membránra, például cellulóz vagy nejlon membránra van rögzítve, inkubáljuk. Ehhez előnyös az izolált RNS-t a hibridizálás és membránra kötés előtt nagyság szerint, például agaróz gélelektroforézissel, elválasztani. Egy vizsgált RNS azonos mennyiségénél mindegyik szövetmintából meghatározható az mRNS-nek az a mennyisége, amely a szondával fajlagosan meg van jelölve.



Egy további diagnosztikum tartalmazza a találmány szerinti polipeptidet illetve annak fentebb leírt részét. A polipeptidet illetve részét, amely előnyösen valamely rögzített fázishoz, például nitrocellulózhoz vagy nejlonhoz van kötve, például in vitro érintkezésbe hozhatjuk a vizsgálandó testfolyadékkal, például vérrel úgy, hogy például autoimmun antitestekkel reagálni tudjon. Az antitest-peptid-komplexet azután ki lehet mutatni például jelölt anti-humán-IgG- vagy anti-humán-IgM-antitestek segítségével. A jelölésnél például olyanok jöhetnek szóba, mint egy enzim, mint a peroxidáz, amely színreakciót katalizál. A jelen levő autoimmun antitestek jelenlétét és mennyiségét ekkor színreakcióval könnyen és gyorsan meg tudjuk határozni.

Egy további diagnosztikum magukat a találmány szerinti antitesteket tartalmazza. Ezeknek az antitesteknek a segítségével lehet például az emberek valamely szövetmintáját könnyen és gyorsan átvizsgálni, vajon a megfelelő polipeptid jelen van-e. Ebben az esetben a találmány szerinti antitest jelölve lehet például valamely enzimmel, ahogyan az előzőekben már leírtuk. A fajlagos antitest-peptid komplexet azután könnyen és ugyanolyan gyorsan meghatározhatjuk színreakcióval.

A találmány további tárgya vizsgálatokra vonatkozik funkcionális kölcsönható anyagok, például inhibitorok vagy stimulátorok azonosítására; ezek a vizsgáló készletek tartalmaznak egy találmány szerinti nukleinsavat, egy találmány szerinti polipeptidet vagy egy találmány szerinti antitestet és kívánt esetben megfelelő adalék- és/vagy segédanyagokat.

Megfelelő vizsgálat a funkcionális kölcsönható anyagok azonosítására például az úgynevezett „két-hibrides rendszer” [Two-Hybrid System; Fields S. és Sternglanz R.: Trends in Genetics 10, 286 (1994)]. Ebben a vizsgálatban egy sejtet, például egy élesztősejtet egy vagy több expressziós vektorral transzformálunk vagy transzficiálunk; ez



egy olyan fúziós fehérjét exprimál, amely tartalmazza a találmány szerinti polipeptidet és tartalmazza egy ismert fehérje, például E. coliból való Gal4 vagy LexA DNS-kötő doménjét; és/vagy egy olyan fúziós fehérjét exprimál, amely egy ismeretlen polipeptidet és egy transzkripció aktiváló domént, például Gal4-et, herpesz vírus VP16-ot vagy B42-t tartalmaz. Ezen kívül a sejt tartalmaz valamely riporter gént, például az E. coliból való LacZ-gént, „zöld fluoreszcencia fehérjét” (Green Fluorescence Protein), vagy az élesztő His3 vagy Leu2 aminosav bioszintézis génjét, amely szabályozó szekvenciák, például az élesztő LexA-promóter/operátorja révén vagy egy úgynevezett „felfelé” aktiváló szekvencia” [Upstream Activator Sequence (UAS)] révén van szabályozva. Az ismeretlen polipeptid például egy olyan DNS fragmentum révén kódolódhat, amely valamely génbankból, például valamely humán génbankból származik. Szokásos módon egy cDNS génbankot a leírt expressziós vektorok segítségével élesztőben állítjuk elő úgy, hogy a vizsgálat közvetlenül ezután elvégezhető legyen.

Így például a találmány szerinti nukleinsavat egy élesztő expressziós vektorban funkcionális egységben klónozzuk a LexA-DNS-kötő domént kódoló nukleinsavval úgy, hogy egy találmány szerinti polipeptidből és a LexA-DNS kötő doménből álló fúziós fehérje expresszálódjék a transzformált élesztőben. Egy másik élesztő expressziós vektorban egy cDNS génbankból való cDNS fragmentum van egy, a Gal4-transzkripció aktiváló domént kódoló nukleinsavval funkcionális egységben klónozva úgy, hogy egy ismeretlen polipeptidből és a Gal4-transzkripció aktiváló doménből álló fúziós fehérje exprimálódjék a transzformált élesztőben. A mindkét expressziós vektorral transzformált élesztő, mint például a Leu2⁻, tartalmaz még egy nukleinsavat, amely Leu2-t kódol, és a LexA-promóter/operátor révén van szabályozva. Egy funkcionális kölcsönhatás esetében a találmány



szerinti polipeptid és az ismeretlen polipeptid között a Gal4-transzkripció aktiváló domén a LexA-DNS kötő doménen keresztül kötődik a LexA-promóter/operátorhoz, amely által ez aktiválódik és a Leu2-gén exprimálódik. Ez azzal a következménnyel jár, hogy a Leu2⁻ élesztő minimál tápközegen, amely nem tartalmaz leucint, növekedni képes.

A LacZ – illetve „zöld fluoreszcencia fehérje” – riporter gén alkalmazásánál egy aminosav-bioszintézis gén helyett a transzkripció aktiválását úgy lehet kimutatni, hogy kéken- illetve zölden fluoreszkáló telepek képződnek. A kéken- illetve zölden fluoreszkáló színek könnyen meghatározhatók mennyiségileg is spektrofotométerben például kék színeződés esetében 585 nm-nél.

Ilyen módon az expressziós génbankokat könnyen és gyorsan át lehet vizsgálni olyan polipeptidekre, amely a találmány szerinti polipeptidekkel kölcsönhatásban vannak. Ezután a megtalált új polipeptideket izoláljuk és tovább jellemezzük.

A „két-hibrides rendszer” további alkalmazási lehetősége a kölcsönhatás befolyásolása a találmány szerinti polipeptid és egy ismert vagy ismeretlen polipeptid között további anyagok, például kémiai vegyületek révén. Ezen a módon könnyen lehet így értékes, új, kémiai úton szintetizálható hatóanyagokat találni, amelyek gyógyhatású anyagokként alkalmazhatók. A találmány tehát nemcsak eljárást határoz meg polipeptid jellegű kölcsönható anyagok feltalálására, hanem kiterjed olyan anyagok feltalálásának eljárására is, amelyek a fentebb leírt fehérje-fehérje komplexszel kölcsönhatásba képesek lépni. Az ilyen peptid jellegű, például kémiai kölcsönható anyagokat a találmány értelmében funkcionális kölcsönható anyagoknak nevezhetjük, amelyek gátló vagy stimuláló hatással bírhatnak.

A találmány szerinti polipeptidek egy további alkalmazási lehetősége a nukleinsavak, elsősorban az mRNS, poli(A)-fajlagos leépülése. A

nukleinsavak poli(A)-fajlagos leépülése különösen a kutató laboratóriumokban találhat alkalmazást.

Az alábbi ábrák és példák közelebbről is megmagyarázzák a találmányt, de az oltalmi kör nemcsak ezekre korlátozódik.

Az alábbiakban ismertetjük az ábrákat és a fontosabb szekvenciákat.

A SEQ ID NO:11 bemutatja a humán DAN aminosav szekvenciáját az Exol-hez tartozó (ADFFAIDGEFSGIS), Exoll-höz tartozó (LVIGHNMLLDVMHTVH) és ExoIII-hoz tartozó (SEQLHEA GYDAYITGLC) doménekkel.

A SEQ ID NO:12 bemutatja a humán DAN nukleinsav szekvenciáját a rajttól (58. hely) a Stop kodonig (1977. hely), 3'UTR-rel ez után.

Az 1. ábra a humán DAN elúciós profilját mutatja be MonoQ-n (1A. ábra) és SDS PAGE-n (1B. és 1C. ábra).

A 2. ábra a rekombináns humán DAN és natív szarvasmarha DAN Western-foltképezését mutatja be.

A 3. ábra bemutatja az mRNS dezadenilezését, a dezadenilezett mRNS felgyülemelését és a PABI befolyását.

A 4. ábra ismert nukleázok összehasonlítását mutatja be a találmány szerinti humán DAN-nal.

KIVITELI PÉLDÁK

1. példa. Humán DAN cDNS-klón azonosítása

A szarvasmarha DAN tisztítását, amelyet Körner G. és Wahle E. [fentebb idézett munka (1997)] írnak le, a következőképpen végezzük.

A tisztítás minden lépését 4°C hőmérsékleten hajtjuk végre. A tisztítási lépések között a mintákat (próbákat) folyékony nitrogénben lefagyasztjuk és -80°C hőmérsékleten tároljuk. Az alábbi alap-puffert alkalmazzuk: 50 mmól/l trisz.HCl, 1 mmól/l EDTA, 10% (térfogat/térfogat) glicerín, 1 mmól/l ditriotreitol, 0,4 µg/ml leupeptin-hemisulfát, 0,7 µg/ml

pepszatin, 0,5 mmól/l fenil-metil-szulfonil-fluorid, 0,02% (térfogat/térfogat) Nonidet P-40; pH 7,9. A különböző tisztítási lépéseknél ezt az alap-puffert különböző koncentrációjú, KCl-lel egészítjük ki, ahogyan leírjuk.

Friss borjú tímuszt szerzünk be egy helyi vágóhídról, jégben szállítjuk és -80°C hőmérsékleten tároljuk. 1 kg ilyen anyagot 2 liter 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferben felengedtetünk és Waring Blendar Homogenizator homogenizáló berendezésben először kis, majd közepes, végül nagyobb sebességgel homogenizáljuk. A homogenizátumot 1 órán át 16000g-vel centrifugáljuk és a felülúszót egy nagyszemű gézen át dekantáljuk [Wahle E.: J. Biol. Chem. 266 (1991)].

Ezt a borjú tímuszból való extraktumot DEAE-Sepharose FF oszlopra (oszloptérfogat: 4 l) visszük fel és az oszlopot 2,5-szörös oszloptérfogat sógradienssel (50 mmól/l $\rightarrow$ 600 mmól/l KCl) eluáljuk 3 l/óra átfolyási sebességgel. Az aktív frakciók a 75 mmól/l és 200 mmól/l KCl közti sókoncentrációknál eluálódnak az oszlopról. A frakciókat összegyűjtjük, egyesítjük, ammónium-szulfáttal keverjük 30% telítettségű oldatig, majd 1,5 órán át jégen kevertetjük. Centrifugálás után (30 perc, 10800xg; ez érvényes minden később említett centrifugálási lépésre) a felülúszót ammónium-szulfáttal 50%-os telítettségre beállítjuk, majd újból jégen kevertetjük és centrifugáljuk. Az üledéket 400 ml, 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral újra szuszpendáljuk és 10 órán át 2x4,5 liter alap-pufferral szemben dializáljuk, majd újból centrifugáljuk. Egy 1,4 literes Sepharose-Blue oszlopot (7x36 cm) 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral kiegyensúlyozunk és a dializált extraktumot az oszlopra felvisszük. Az oszlopot 1,5 liter ágytérfogat, 250 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral mossuk és 1 ágytérfogat, 1 mól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral eluáljuk (átfolyási sebesség 2 l/óra).



Az aktív frakciókat két készítményből, mindig 1,2 kg borjú tímuszból, egyesítjük és ammónium-szulfáttal (60%-os telítettség) kicsapjuk. Centrifugálás után az üledéket 200 ml, 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral felvesszük, 12 órán át 3x4 l azonos pufferral szemben dializáljuk és két részletben Heparin-Sepharose oszlopra (2,5x37 cm) visszük fel. Az oszlopot 1,5 liter ágytérfogat, 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral mossuk, majd 10 ágytérfogat gradienssel (500 mmól/l KCl-ig) eluáljuk (átfolyási sebesség: 145 ml/óra). A DAN aktivitás 80 mmól/l és 150 mmól/l KCl között eluálódik. Az aktív frakciókat egyesítjük és 30 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral szemben 4 órán át dializáljuk. A dializátumot kicentrifugáljuk és két részletben MonoQ FPLC oszlopon kromatografáljuk (ágytérfogat: 8 ml). Az oszlopot két ágytérfogat, 50 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral mossuk, majd 320 ml gradienssel, növekvő sókoncentrációval (végső koncentráció: 500 mmól/l KCl; átfolyási sebesség 2,5 ml/óra) az oszlopról eluáljuk. A DAN-aktivitás mintegy 160 mmól/l KCl-nél eluálódik. Az aktív frakciókat (40 ml) egyesítjük és 4 órán át 2 liter, 30 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferrel szemben dializáljuk, centrifugáljuk és egy további MonoQ oszlopra (1 ml ágytérfogat; átfolyási sebesség: 0,9 ml/óra) felvisszük. Az oszlopon megkötött DAN aktivitást 500 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferrel eluáljuk és négy adagban Superdex HR 10/30 FPLC oszlopra visszük fel (300 mmól/l KCl-lel kiegészített alap-pufferral kiegyensúlyozva; átfolyási sebesség: 0,15 ml/óra) [Körner Ch. R. és Wahle E.: az előzőekben idézett munka (1997)].

A Superdex oszlopok különböző frakcióit, amelyek a DAN aktivitást tartalmazzák, összegyűjtjük és egy fenil-Superose oszlopon elválasztjuk [Körner G. és Wahle E., előzőekben idézett munka (1997)]. Az aktív frakciókat összegyűjtjük és pufferral szemben [50 mmól/l trisz.HCl (pH 7,9), 1 mmól/l EDTA, 10% (térfogat/térfogat) glicerín, 1 mmól/l ditiotritol,



0,4 µg/ml leupeptin hemiszulfát, 0,7 µg/ml pepsztatin, 0,5 mmól/l fenil-metil-szulfonát (PMSF), 0,02% (térfogat/térfogat) Nonidet P-40, 50 mmól/l KCl] dializáljuk. Centrifugálás után a dializátumot egy 100 µl-es Smart MonoQ (PC 1.6/5) oszlopra visszük fel. Ezután az oszlopot 200 µl pufferral mossuk. A megkötött fehérjét növekvő sókoncentrációjú gradienssel (végső koncentráció: 500 mmól/l KCl), 40 ágytérfogat térfogattal eluáljuk. Azok a frakciók, amelyek a DAN-aktivitásra pozitívak, mintegy 200 mmól/l KCl koncentrációnál eluálódnak. A két frakciót a legnagyobb DAN aktivitással SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel elemezzük. Ezután következik egy in situ hidrolízis Lys-C proteáz segítségével, az elválasztás HPLC-vel, és a peptid szekvencia-elemzése. Az alábbi szekvenciákat találjuk.

1. KSFNFYVFPK;
2. KPFNRSSPD(V/K)K;
3. KYAESYWIQTYADYVG; valamint
4. keverék KEQEELNDA-ból és KLFLMRVMD-ből.

A tisztított szarvasmarha DAN N-terminális szekvenciáját nem tudtuk meghatározni.

Ezután EST (expressed sequence tags) adatbankban kutatást végzünk a BLAST program (NCBI) segítségével. Az alábbi klónok azonosíthatók.

I.M.A.G.E.- Konzorcium klón, ID 645295 az 1. és 2. peptidhez; és

I.M.A.G.E.- Konzorcium klón, ID 301901 a 3. peptidhez.

A talált klónok teljes szekvencia elemzését ABI373A szekvencia meghatározó berendezésben, ABI Dye Terminator Cycle SequencingKit-tel végezzük el.

Úgy találjuk, hogy az ID 301901 számú I.M.A.G.E.-Konzorcium klón a DAN 176 C-terminális aminosavat és az egész 3'-UTR-t kódolja, míg az ID 645295 számú I.M.A.G.E.-Konzorcium klón az egész ORF-et és az



5'-UTR-t, továbbá a 3'-UTR egy részét kódolja, amely egy 639 aminosavas, 73,5 kDa molekulatömegű fehérjének felel meg (SEQ ID NO:11). Az az 57 nukleotid, amely felfelé fekszik az első AUG kodontól, nem tartalmaz stop kodont a leolvasó keretben. Ezek az AUG-kodont körülvevő szekvenciák (AGAAUGG) megfelelnek az úgynevezett Kozak-szabálynak [Kozak (1991)], amely a transzlációs rajthoz előnyös rajt-szekvenciákat ír le. Egy 0,7 kB-s 3'-UTR-t találunk a 645295. cDNS klónban és egy poli(A)-farkat a 301901. cDNS klón végén. A poli(A)-fark „felfelé” megelőzi az AUUAAA ritka polidenilező szignált (SEQ ID NO:12).

2. példa. Expressziós vektorok előállítása

A pGMMCS plazmidot a következő módon alkotjuk meg.

A pGM10 T7 expressziós vektorát [Martin (1996)], amely a PABII cDNS szekvenciát [Nemeth (1996)] Met-Ala-His6-toldat N-terminálissal tartalmazza, XhoI-gyel és BamHI-eggel emésztjük, és azt a fragmentumot, amely a PABII 3' részét tartalmazza, egy, a pBluescript KS (+/-) plazmid többszörös klónozó helyéből (Multiple Cloning Site) való Xho/BamHI fragmentumra cseréljük. A létrejövő plazmid tartalmaz egy, a T7-promóter segítségével szabályozott szekvenciát, amely Met-Ala-His6-tal kezdődik és a PABII 5'-részén át egy többszörös klónozó hellyel (Multi Cloning Site) folytatódik. Egy NdeI hasítási hely fekszik a His6-toldat és a PABII szekvencia között, és a többszörös klónozó hellyel (Multi Cloning Site) együtt arra lehet alkalmas, hogy a megmaradt PABII szekvenciát bármely tetszés szerinti kódolandó szekvenciára kicserélhessük.

A pGMMCS301901. plazmidot a következő módon állítjuk elő.

A humán DAN szekvenciájának egy részét, amely a 176 C-terminális aminosavat tartalmazza, PCR segítségével a 301901. számú klónból az alábbi körülmények között amplifikáljuk:

15 ciklus: 45 másodperc 94°C hőmérsékleten, 45 másodperc 54°C hőmérsékleten, és 3,5 perc 72°C hőmérsékleten. Pfu-polimeráz; az NdeI 301901. primer: CCATATCCATATGCTTTTCAGTGCCTTTCCTACC; és az XhoI 301901. primer: AGTACTCGAGTTACAATGTGTCAGG. Az NdeI-gyel és XhoI-gyel végzett emésztés után a keletkezett cDNS-fragmentumot Qia-Ex-Kit készlettel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) tisztítjuk és az NdeI-gyel és XhoI-gyel emésztett pGMMCS vektorba integráljuk. A szekvenciát szekvencia elemzés segítségével igazoljuk.

A pGMMCS645295. plazmidot a következő módon állíthatjuk elő.

A humán DAN klón kódoló szekvenciáját PCR segítségével a 645295. számú klónból az alábbi körülmények között amplifikáljuk:

20 ciklus: 45 másodperc 94°C hőmérsékleten, 45 másodperc 54°C hőmérsékleten és 3,5 perc 72°C hőmérsékleten. Pfu-polimeráz; az NdeI 645925. primer: AGTGTCGCATATGGAGATAATCAGGAGCA; és az XhoI 645295. primer: AGTACTCAGCGGTTTGCTGCCCTCA. A keletkezett terméket a pCR2.1 vektorban klónozzuk TA klónozó készlet (TA-Klonierungs-Kit) (Invitrogen) segítségével. NdeI-gyel és XhoI-gyel végzett emésztés után a keletkezett cDNS fragmentumot a Qia-Ex-Kit készlettel (Qiagen) tisztítjuk és az NdeI-gyel és XhoI-gyel emésztett pGMMCS vektorba integráljuk. Ezután a PCR-rel kialakított szekvencia nagyobb részét DraIII-mal és BstEII-vel végzett emésztéssel eltávolítjuk és az eredeti klón megfelelő fragmentumára cseréljük. Az új szekvenciát szekvencia elemzés segítségével igazoljuk.

3. példa. Antitestek előállítása

A humán DAN C-terminális része elleni antitesteket a következő módon állítjuk elő:

A pGMMCS301901. plazmidot BL21-be (pLysC) transzformáljuk. A sejteket 37°C hőmérsékleten 200 mg/ml karbenicillinnel kiegészített SOB

tápközegben inkubáljuk 1,9 OD600 értékig. Ezután 200 $\mu\text{mol/l}$ izopropil- β -D-tiogalaktozidot adunk hozzá és további 5 órán át inkubáljuk. A sejteket kinyerjük és A pufferben [100 mmól/l NaH_2PO_4 , 10 mmól/l trisz, 8 mmól karbamid (pH 7,9)] felvesszük. A sejteket ultrahanggal lizáljuk, a lizátumot centrifugáljuk és 3 ml Ni-NTA oszlopanyaggal 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az oszlopanyagot oszlopba töltjük és 70 ml A pufferrel (pH 6,3) mossuk. Ezután 15 ml B pufferral [300 mmól/l NaCl , 10% (térfogat/térfogat) glicerín, 50 mmól/l trisz, 0,01% (térfogat/térfogat) Nonidet-P40, 8 mól/l karbamid (pH 7,9)] mossuk. A fehérjék az oszlopon visszamaradnak, miközben a karbamid tartalmat két gradienssel lecsökkentjük (45 ml/óra; 1. gradiens: B puffer, 8 mól/l karbamidról 4 mól/l karbamidra szobahőmérsékleten; 2. gradiens: 4 mól/l karbamidról 0 mól/l karbamidra 4°C hőmérsékleten). A fehérjét olyan B pufferral, amely 500 mmól/l imidazolt is tartalmaz, az oszlopról eluáljuk, karbamid nélküli B pufferral szemben dializáljuk és nyulak immunizálására használjuk fel.

Az anti-DAN antitestek affinitásos tisztítását a következőképpen végezzük el. A C-terminális DAN fragmentumot NHS-sel aktivált HiTrap-oszlophoz (1 ml térfogat; Pharmacia, Freiburg) kapcsoljuk a gyártó cég útmutatásai szerint. 3 ml szérumot viszünk fel az oszlopra és a gyártó cég útmutatásai szerint eluáljuk. 300 $\mu\text{g/ml}$ BSA-t és 0,02% (tömeg/térfogat) NaN_3 -at adunk hozzá a frakciókhoz és a puffert dialízis segítségével kicseréljük.

4. példa. Humán DAN expressziója és tisztítása

Humán DAN-t exprimálunk E. coliban fúziós fehérjeként N-terminális His-toldattal (Met-Ala-His6-toldat) a következőképpen.

A pGMMCS645295. plazmidot BL21-be (pLysC) transzformáljuk. A sejteket 50 ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ karbenicillinnel és 24 $\mu\text{g/ml}$ klóramfenikollal kiegészített LB tápközegen 37°C hőmérsékleten tenyésztjük, majd 500



ml-es tápközegbe visszük át, amelyben klóramfenikol nem található, és 33°C hőmérsékleten tovább inkubálunk. Miután elértük az 1,3 OD600 értéket, 100 $\mu\text{mol/l}$ izopropil- β -D-tiogalaktozidot adunk hozzá és a tenyészetet további 1 órán át inkubáljuk. A sejteket kinyerjük és A pufferban [50 mmól/l trisz, 300 mmól/l KCl, 0,1 mmól/l magnézium-acetát, 1 mmól/l β -merkaptó-etanol; 0,4 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 0,7 mg/ml pepsztatin, 0,5 mmól/l PMSF (pH 7,9)] felvesszük. A sejteket ultrahanggal lizáljuk, a lizátumot centrifugáljuk és 2 órán át 4°C hőmérsékleten inkubáljuk 2 ml Ni^{2+} -NTA-oszlopanyaggal. Az oszlopanyagot oszlopba csomagoljuk és 25 ml A pufferral, majd 20 ml B pufferral [A puffer és 10% (térfogat/térfogat) glicerín, 0,02% (térfogat/térfogat) Nonidet-P40, magnézium nélkül (pH 6,3)] mossuk. Ezután a fehérjét 5 ml C pufferrel (B puffer 500 mmól/l imidazollal) eluáljuk. Ezután dialízis következik D pufferrel [50 mmól/l trisz, 20 mmól/l KCl, 1 mmól/l EDTA, 5 mmól/l PMSF, 10% (térfogat/térfogat) glicerín, 0,02% (térfogat/térfogat) Nonidet-P40 (pH 7,9)] szemben. A készítményt centrifugáljuk és MonoQ oszlopra (1 ml ágytérfogat) visszük fel. Ezután az oszlopot 5 ágytérfogat, 50 mmól/l KCl-lel kiegészített pufferral mossuk és az oszlopot 40 ágytérfogat gradienssel, amelynek végső koncentrációja 500 mmól/l KCl, eluáljuk. A DAN aktivitás éles csúcsban eluálódik mintegy 190 mmól/l KCl-nél (1A. ábra).

A tisztítás egy fehérje csaknem homogén készítményéhez vezet, amely a várt molekulatömeggel bír (1B. és 1C. ábra). A fehérje poli(A)-fajlagos 3-exoribonukleáz aktivitást mutat (lásd a 6. példát). Ebből az következik, hogy talált cDNS klón humán DAN-t kódol.

5. példa. Northern folt elemzés.

RNS-t izolálunk HeLa sejtekből Chomczynski P. és Sacchi N. eljárása szerint [Anal. Biochem. 162, 156 (1987)]. A poli(A) mRNS-t oligo(dT)-cellulóz segítségével Sambrook J. és munkatársai eljárása



szerint izoláljuk [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)]. A létrejövő RNS-t 1%-os agaróz-formaldehid gélen szétválasztjuk, Hybond N+ membránra, amely az Amersham Buchler, Braunschweig cég terméke, kapilláris cseppentés segítségével átvisszük, és 2 órán át 80°C hőmérsékleten végzett inkubálással a membránra rögzítjük. A humán DAN-t kódoló szekvenciát PCR segítségével amplifikáljuk, α -³²P-dATP-vel véletlenszerű beindítás (random priming) révén jelöljük és szondaként alkalmazzuk. A hibridizálást úgy hajtjuk végre, ahogyan le van írva (Ausubel) és a membránt nagy szigorúsági körülmények között mossuk. A Northern-folt elemzés HeLa sejtekből való poli(A)⁺ RNS-sel egy egyedi 3,1 kB-s fragmentumot mutat, amely a DAN-mintával hibridizál. Ez a méret jó összhangban van a cDNS klón méretével.

6. példa. DAN-aktivitási vizsgálatok

A DAN-aktivitás vizsgálatát úgy végezzük el, ahogyan Körner Ch. G. és Wahle E. leírták [fentebb idézett munka (1997)]. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli U. K. szerint végezzük [Nature 227, 680 (1970)].

Akárcsak a szarvasmarha enzim, a rekombináns DAN is a foszfát töltés semlegesítésétől függően két különböző reakciókörülménynél aktív. Só távollétében az aktivitása teljes mértékben a spermidin jelenlététől függ 1 mmól/l koncentráció optimumnál. Ilyen körülmények között a rekombináns DAN fajlagos aktivitása (79000 egység/mg) nem különbözik szignifikánsan a tisztított szarvasmarha DAN fajlagos aktivitásától (110000 egység/mg). Spermidin jelenlétében a DAN aktivitása sóval megakadályozható. Spermidin távollétében az enzim aktivitása 150 mmól/l kalcium-acetát koncentráció optimummal a sótól függ. A szarvasmarha DAN ugyanezen körülmények között hasonlóképpen viselkedik. Kétségtelen, hogy a rekombináns fehérje



fajlagos aktivitása (960 egység/mg) ugyanezen körülmények között csekélyebb, mint a borjú timuszból tisztított enzimé (8070 egység/mg). Ez a különbség egy transzláció utáni módosításnak vagy a szarvasmarha enzim készítményben levő szennyező fehérjének tulajdonítható.

Amikor egy CAP-pal ellátott, poliadenilezett RNS-t a DAN készítménnyel só jelenlétében inkubálunk, a poli(A)-farok elbomlik és átmenetileg teljesen dezadenilezett RNS gyülemlik fel (3. ábra). Amikor a vizsgálatot PABI jelenlétében hajtjuk végre, az aktivitás részlegesen gátlódik és a poli(A)-farkak lépcsőzetes lebomlása figyelhető meg. Az uralkodó lebomlási termék hosszban mintegy 30 nukleotiddal különbözik, amelyet nyilvánvalóan a PABI kötés okoz. Ezek az eredmények összhangban vannak a szarvasmarha fehérjével kapcsolatos vizsgálatokkal [Körner Chr. és Wahle E.: fentebb idézett munka (1997)]. Összefoglalva az eredmények azt mutatják, hogy a rekombináns fehérje egy poli(A)-fajlagos 3'-exoribonukleáz.

7. példa. Western folt elemzés

A Western folt elemzést a következőképpen hajtjuk végre. A fehérjét SDS-PAGE segítségével elválasztjuk és nitrocellulóz membránra visszük át a „Semidry”-eljárással [Kyse-Andersen (1984)]. A foltokat TNT pufferral [20 mmól/l trisz.HCl, 150 mmól/l NaCl; 0,05% (térfogat/térfogat) Tween 20 (pH 7,5)], amely 5% (tömeg/térfogat) zsírmentesített tejjel van kiegészítve, inkubáljuk. Ugyanezt a puffert alkalmazzuk az antiszérummal végzett inkubálásnál és a mosási lépéseknél. A foltokat az antitestekkel 2-3 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd mossuk. A megkötött antitesteket peroxidázzal konjugált sertés-anti-nyúl antitestek (DAKO, Glostrup, Dánia) és kemilumineszcenciás színezék (SuperSignal-Kit, Pierce) segítségével mutatjuk ki.



Az elemzés azt mutatja, hogy a nyúl antitest, amely a DAN-nak egy C-terminális fragmentuma ellen jön létre, a részben tisztított DAN frakciókból képes kicsapódást előidézni. Az antitest felismeri a Western-foltban mind a szarvasmarha, mind a humán DAN-t (4. ábra). Ebben a kísérletben megmutatkozik, hogy a rekombináns DAN valamivel nagyobb, mint az enzim a HeLa sejtekből való SDS-lizátumban, amit a todatnak (Tag; 1004 Da) a szekvenciába való bevezetése magyaráz meg. Amennyiben a cDNS szekvenciában nem az első AUG lenne az alkalmazott start kodon, a természetes DAN a HeLa sejtekből legalább 1260 Da-val nagyobb lenne, mint az egy toldattal ellátott rekombináns fehérjének lennie kellene. Ezek az eredmények az első AUG szekvencia alkalmazását bizonyítják a cDNS klónban start kodonként in vivo.

SZEKVENCIALISTA

(1) ÁLTALÁNOS ADATOK

(i) BEJELENTŐ:

- (A) NÉV: Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG
- (B) UTCA:
- (C) HELYSÉG: 65926 Frankfurt
- (D) SZÖVETSÉGI ÁLLAM:
- (E) ORSZÁG: Németország
- (F) POSTAI KÓD: 65926

(ii) A TALÁLTMÁNY CÍME: Humán dezadenilező nukleáz, ennek előállítása és alkalmazása

(iii) A SZEKVENCIA SZÁMA: 29

(iv) SZÁMÍTÓGÉPPEL OLVASHATÓ KERET:

- (A) ADATHORDOZÓ: Floppy lemez
- (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis
- (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SZOFTVER: WINDOWS 3.1

(2) ADATOK A SEQ ID NO:1-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 10
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS:

KSFNFYVFPK

10

(2) ADATOK A SEQ ID NO:2-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 11

(B) FAJTA: aminosav szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:2

KPFNRSSPDV K

11

(2) ADATOK A SEQ ID NO:3-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 11
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:3

KPFNRSSPDK K

11

(2) ADATOK A SEQ ID NO:4-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 16
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:4

KYAESYWIQT YADYVG

16

(2) ADATOK A SEQ ID NO:5-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 8
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:5

KEQEELNDA

8

(2) ADATOK A SEQ ID NO:6-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 9
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:6

KLFLMRVMD

9

(2) ADATOK A SEQ ID NO:7-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 34

(B) FAJTA: nukleotid szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: további nukleinsav: primer DNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:7

CCATATCCAT ATGCTTTTCA GTGCCTTTCC TAAC

34

(2) ADATOK A SEQ ID NO:8-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 25

(B) FAJTA: nukleotid szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: további nukleinsav: primer DNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:8

AGTACTCGAG TTACAATGTG TCAGG

25

(2) ADATOK A SEQ ID NO:9-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 29

(B) FAJTA: nukleotid szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: további nukleinsav: primer DNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:9

AGTGTCGCAT ATGGAGATAA TCAGGAGCA

29

(2) ADATOK A SEQ ID NO:10-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 25

(B) FAJTA: nukleotid szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: további nukleinsav: primer DNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:10

AGTACTCAGC GGTTTGCTGC CCTCA

25

(2) ADATOK A SEQ ID NO:11-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 639

(B) FAJTA: aminosav szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: fehérje

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: N-terminális

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:11

MEIIRS NFKS NLHKVYQAIE EADFFAIDGE FSGISDGPSV SALTNGFDTP EERYQKLKXH	60
SMDFLLFQFG LCTFRYDYTD SKYITKSFNF YVFPKPFNRS SPDVKFVCQS SSIDFLASQG	120
FDFNKVFRNG IPYLNQEEER QLREQYDEKR SQANGAGALS YVSPNTSKCP VTIPEDQKKF	180
IDQVVEKIED LLQSEENKNL DLEPCTGFQR KLIYQTLNWK YPKGIHVETL ETEKKERYIV	240
ISKVDEEERK RREQQKHAK EELNDVGF SRVIHAIANS GKLVIHNM LDMHTVHQF	300
YCPLPADLSE FKEMTTCVFP RLLDTKLMS TQPFKDIINN TSLAELEKRL KETPFNPPKV	360
ESAEGFPSYD TASEQLHEAG YDAYITGLCF ISMANYLGSE LSPPKIHVSA_RSKLIEPFFN	420

KLFLMRVMDI PYLNLEGPDL QPKRDHVLHV TFPKEWKTSD LYQLFSAFGN IQISWIDDTs	480
AFVSLSQPEQ VKIAVNTSKY AESYRIQTYA EYMGRKQEEK QIKRKWTEDS WKEADSKRLN	540
PQCIPYTLQN HYYRNNSFTA PSTVGKRNLs PSQEEAGLED GVSGEISDTE LEQTDSCAEP	600
LSEGRKKAKK LKRMKKELSP AGSISKNSPA TLFEVPDTW	639

(2) ADATOK A SEQ ID NO:12-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 2941
- (B) FAJTA: nukleotid szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: kettős szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: cDNS mRNS-hez

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:12

GAACCGCTGA GCGGGGCGCG GGCCCGGGTG GGGCCAAGGT TCCGGCCACT CTGCAGAATG	60
GAGATAATCA GGAGCAATTT TAAGAGTAAT CTTACAAAG TGTACCAGGC CATAGAGGAG	120
GCCGACTTCT TCGCCATCGA TGGGGAGTTT TCAGGAATCA GTGATGGACC TTCAGTCTCT	180
GCATTAACAA ATGGTTTTGA CACTCCAGAA GAGAGGTATC AGAAGCTTAA AAAGCATTCC	240
ATGGACTTTT TGCTATTTCA GTTTGGCCTT TGCACTTTTA AGTATGACTA CACAGATTCA	300
AAGTATATAA CGAAGTCATT TAACTTCTAT GTTTTCCCGA AACCTTCAA TAGATCCTCA	360
CCAGATGTCA AATTTGTTTG TCAGAGCTCC AGCATTGACT TTCTAGCAAG CCAGGGATTT	420
GATTTTAATA AAGTTTTTCG AAATGGAATT CCATATTTAA ATCAGGAAGA AGAAAGACAG	480
TTAAGAGAGC AGTATGATCA AAAACGTTCA CAGGCGAATG GTGCAGGAGC TCTGTCCTAT	540
GTATCTCCTA AACTTCAAA ATGTCCTGTC ACGATTCTTG AGGATCAAAA GAAGTTTATT	600
GACCAAGTGG TAGAGAAAAT AGAGGATTTA TTACAAAGTG AAGAAAACAA GAACTTGGAT	660
TTAGAGCCAT GTACCGGGTT CCAAAGAAAA CTAATTTATC AGACTTTGAG CTGGAAGTAT	720

CCGAAAGGCA	TTCATGTTGA	GACTTTAGAA	ACTGAAAAGA	AGGAGCGATA	TATAGTTATC	780
AGCAAAGTAG	ATGAAGAAGA	ACGCAAAAGA	AGAGAGCAGC	AGAAACATGC	CAAAGAACAG	840
GAGGAGCTGA	ATGATGCTGT	GGGATTTTCT	AGAGTCATTG	ACGCCATTGC	TAATTCGGGA	900
AAACTTGTTA	TTGGACACAA	TATGCTCTTG	GACGTCATGC	ACACAGTTCA	TCAGTTCTAC	960
TGCCCTCTGC	CTGCCGACTT	AAGTGAGTTT	AAAGAGATGA	CAACATGTGT	TTCCCCCAGA	1020
CTCTTGATA	CTAAATTGAT	GGCCAGCACA	CAACCTTTTA	AGGATATCAT	TAACAACACA	1080
TCCCTTGCGG	AATTGGAAAA	GCGGTAAAA	GAGACACCTT	TCAACCCTCC	TAAAGTTGAA	1140
AGTGCCGAAG	GTTTTCCAAG	TTATGACACA	GCCTCTGAAC	AACCTCCACGA	GGCAGGCTAC	1200
GATGCCTACA	TCACAGGGCT	GTGCTTCATC	TCCATGGCCA	ATTACCTAGG	TTCTTTTCTC	1260
AGCCCTCCAA	AAATTCATGT	GTCTGCCAGA	TCAAAACTCA	TTGAACCTTT	TTTTAACAAG	1320
TTATTTCTTA	TGAGGGTCAT	GGATATCCCC	TATCTAAACT	TGGAAGGACC	AGACTTGCAG	1380
CCTAAACGTG	ATCATGTTCT	CCATGTGACA	TTCCCCAAAG	AATGGAAAAC	CAGCGACCTT	1440
TACCAGCTTT	TCAGTGCCTT	TGGTAACATT	CAGATATCCT	GGATTGATGA	CACATCAGCA	1500
TTTGTTTCCC	TTAGCCAGCC	CGAGCAAGTA	AAGATTGCTG	TCAATACCAG	CAAATATGCA	1560
GAAAGCTATC	GGATCCAAAC	CTATGCTGAA	TATATGGGGA	GAAAACAGGA	AGAGAAGCAG	1620
ATCAAAAGAA	AGTGGACTGA	AGATAGCTGG	AAGGAGGCTG	ACAGCAAACG	GTAAACCCC	1680
CAGTGCATAC	CCTACACCCT	GCAGAATCAC	TATTAACCGCA	ACAATAGTTT	TACAGCTCCC	1740
AGCACAGTAG	GAAAGAGAAA	TTTGAGTCCT	AGTCAAGAGG	AAGCTGGCCT	GGAGGACGGA	1800
GTGTCAGGGG	AGATTTCCGA	CACTGAGCTT	GAGCAGACCG	ATTCTGTGTC	AGAGCCCCTC	1860
TCAGACGGAA	GGAAAAAGGC	CAAGAAATTA	AAAAGAATGA	AGAAGGAGCT	TTCTCCAGCA	1920
GGAAGCATCT	CGAAGAACAG	CCCTGCCACA	CTCTTTGAAG	TTCTTGACAC	ATGGTAACCA	1980
AGACCTGAGG	GCAGCAAACC	GCTGGTGCTG	TCGCTGTGAG	CAAGAGCCGG	CTGGCACATT	2040
TGGAAGCCGC	ACTGTATTTA	ACTTAATCAA	ATGTGGTATG	GGAGGGGTTG	GAAACCAAGT	2100
TGTCTCCTGG	GGGGGAGAAA	ACAGGTTTTA	TTTTTGTGGC	TGTGGTTTTT	TCCCCTTTTT	2160
AATCTAACTG	CCTGTTGACA	TTGACACTCA	TCACGGTTGT	AGGCTGTGTC	GAATGTGTAC	2220
GTGCTTAACC	AGTGAATTCC	GTGTTGCTCT	TGTGAGGCCT	TTCTGTGTC	GACCCAGTGT	2280
GCTTAAGAAC	CTGCCTGATG	GGGAGTGTCG	GCTGTGAAAT	CTGCAAAAAG	AGCTGACATT	2340
CCAGCTGCTG	TGATCATGAA	TTTGGGGGTG	TACTGTCCTG	CCTGTGCATC	TTCTCGCACT	2400
GAGATTTTGA	GGCAGTTGCA	GCCCTCGGTT	AGTCTCCCAG	TGGAAAAATC	GGTTGTGCCT	2460
CCCTGCTTCC	CACCATAGCT	GCCTGAAAAC	ATGACGCTCT	CAAGCTTGTC	CTTCCTTCAG	2520



GAAGATGTCC	ACTCATGCCC	ACCCATGAGA	GGGCTTGCCG	TATGCCCTGG	CCTTTGGGCA	2580
TATTTATGTA	GAGTTCCTTT	CTCCTAAGAC	GTGAGTTTCT	CATGGGGGAT	GTACGAGTAA	2640
AAAGGTAAAC	TTCTGTTCTT	ATGCGTGGCG	CTGTGTTTAC	TTTCCAGAGT	CTCTGTTCGT	2700
TTGTTTGGAT	GGCGGTCTCG	GGGTACGGCA	GCGTGTGTGC	GTACGTGTCT	GTGTGTGTGT	2760
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGA	AATCGTGCAA	ATCTACAACA	TGTCCCAGCC	2820
CATTCTCCGT	TGAAACAGAT	CACAGCAACG	ACAAACGCTC	ATGGCGCTGC	TTTGCTCCAC	2880
CCGCTTCAGA	TAGATCATTG	TTAGATATTT	CACATTTTTC	TAIGGTGGAA	ATAAAAAATGA	2940
AAAATGTATT	TCCAAAAGAT	GAAAATTAAA	AACATTTTCA	TAGGAAAAAA	AAAAAAAAAA	3000
AA						2

(2) ADATOK A SEQ ID NO:13-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 12
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:13

(2) ADATOK A SEQ ID NO:14-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:13

LVIGHNMLLV MHTVH

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:14-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 16
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:14

SEQLHEAGYA YITGLC

16

(2) ADATOK A SEQ ID NO:15-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 12
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:15

CDFVAIFFLG LD

12

(2) ADATOK A SEQ ID NO:16-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:16

LVVGHNSLLA MYMYH

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:17-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 16

(B) FAJTA: aminosav szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:17

ENVYHNAGFS YVTGEV

16

(2) ADATOK A SEQ ID NO:18-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 12

- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:18

ADFVAILMTG VT

12

(2) ADATOK A SEQ ID NO:19-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:19

LIVGHNCFLI AHVYS

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:20-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 16
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:20

AGGKHEAGYA FMTGCI

16

(2) ADATOK A SEQ ID NO:21-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 12
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:21

GTLVAIAFVS LQ

12

(2) ADATOK A SEQ ID NO:22-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:22

VFVGHGLNNF KHINI

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:23-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 16
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:23

QEGNHDSIEA HTALIL

16

(2) ADATOK A SEQ ID NO:24-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 12

(B) FAJTA: aminosav szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:24

FPAIALTFVR TR

12

(2) ADATOK A SEQ ID NO:25-HÖZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 15

- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:25

TKFLHAGSEL EVFLN

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:26-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:26

ERQEWAAAVW YLLPI

15

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:28

LKVGQNLKYR GILAN

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:29-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

(A) HOSSZÚSÁG: 15

(B) FAJTA: aminosav szekvencia

(C) SZÁLFORMA: egyedi szál

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:29

EEAGRAAEAD VTLQL

15

(2) ADATOK A SEQ ID NO:27-HEZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 12
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső fragmentum

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: SEQ ID NO:27

APVFAFTTDS LD

12

(2) ADATOK A SEQ ID NO:28-HOZ

(i) SZEKVENCIA ISMERTETŐJELEK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 15
- (B) FAJTA: aminosav szekvencia
- (C) SZÁLFORMA: egyedi szál
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULA FAJTA: peptid

(v) A FRAGMENTUM FAJTÁJA: belső peptid



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Nukleinsav, amely a SEQ ID NO:11 szerinti aminosav szekvenciával bíró humán dezadenilező nukleázt (DAN) vagy annak funkcionális változatát kódolja, és ennek a nukleinsavnak részei legalább 8 nukleotiddal, ahol a SEQ ID NO:11 szekvencia az igénypont része.

2. Az 1. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a nukleinsav DNS vagy RNS, előnyösen kettős szálú DNS.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a nukleinsav valamely DNS a SEQ ID NO:12 szerinti nukleinsav szekvenciával az 58. helytől az 1977. helyig, ahol a SEQ ID NO:12 az igénypont része.

4. A 3. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a nukleinsav egy vagy több nem kódoló szekvenciát és/vagy egy poli(A)-szekvenciát tartalmaz.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav, ahol a nukleinsav valamely vektorban, előnyösen valamely expressziós vektorban vagy génterápiában hatásos vektorban található.

6. Eljárás az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav előállítására azzal jellemezve, hogy a nukleinsavat kémiai úton szintetizáljuk vagy valamely szonda segítségével egy génbankból izoláljuk.

7. Polipeptid a SEQ ID NO:11 szerinti aminosav szekvenciával, vagy ennek funkcionális változata vagy ennek része legalább 6 aminosavval.

8. Eljárás 7. igénypont szerinti polipeptid előállítására azzal jellemezve, hogy valamely 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat megfelelő gazdasejtben exprimálunk.

9. Antitestek valamely 7.igénypont szerinti polipeptid ellen.

10. Eljárás 9. igénypont szerinti antitestek előállítására azzal jellemezve, hogy egy emlős állatot valamely 7. igénypont szerinti

polipeptiddel immunizálunk és kívánt esetben a kapott antitesteket izoláljuk.

11. Gyógyszer, amely egy, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat vagy egy 7. igénypont szerinti polipeptidet és kívánt esetben gyógyászatilag elfogadható adalék- és/vagy segédanyagokat tartalmaz.

12. Eljárás gyógyszerek előállítására rák, autoimmun betegségek, elsősorban szklerózis multiplex vagy reumás ízületi gyulladás, továbbá Alzheimer-kór, allergiák, elsősorban neurodermitisz, I. típusú allergia vagy IV. típusú allergia, valamint artrózis, ateroszklerózis, csontritkulás, akut és krónikus fertőző betegségek és/vagy cukorbetegség kezelésére és/vagy a sejtm metabolizmus befolyásolására elsősorban immun szuppresszióknál, mindenekelőtt transzplantációknál, azzal jellemezve, hogy valamely, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat vagy egy 7. igénypont szerinti polipeptidet vagy 9. igénypont szerinti antitesteket valamely gyógyászatilag elfogadható adalék- és/vagy segédanyaggal kiegészítjük.

13. Diagnosztikum, amely egy, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat vagy egy 7. igénypont szerinti polipeptidet vagy 9. igénypont szerinti antitesteket és kívánt esetben megfelelő adalék- és/vagy segédanyagokat tartalmaz.

14. Eljárás diagnosztikum előállítására rák, autoimmun betegségek, elsősorban szklerózis multiplex vagy reumás ízületi gyulladás, továbbá Alzheimer-kór, allergiák, elsősorban neurodermitisz, I. típusú allergia vagy IV. típusú allergia, valamint artrózis, ateroszklerózis, csontritkulás, akut és krónikus fertőző betegségek és/vagy cukorbetegség diagnosztizálására, és/vagy sejtm metabolizmus, de különösen immun állapot elemzésére főleg transzplantációknál, azzal jellemzve, hogy valamely, az 1-5. igénypontok bármelyike szerint előállított nukleinsavat,

vagy egy 7. igénypont szerint előállított polipeptidet vagy 9. igénypont szerinti antitesteket valamely gyógyászatilag elfogadható hordozóval összekeverünk.

15. Vizsgáló készlet funkcionális kölcsönható anyagok azonosítására, amely egy, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat vagy egy 7. igénypont szerinti polipeptidet vagy 9. igénypont szerinti antitesteket, és kívánt esetben megfelelő adalék- és/vagy segédanyagokat tartalmaz.

16. Egy, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav, vagy 7. igénypont szerinti polipeptid alkalmazása funkcionális kölcsönható anyagok azonosítására.

17. Eljárás az 1-5. igénypontok bármelyike szerint nukleinsav alkalmazásával a humán DAN változatainak megtalálására azzal jellemezve, hogy egy génbankot a nevezett nukleinsavval átvizsgáljuk és a talált változatokat izoláljuk.

18. Egy, a 7. igénypont szerinti polipeptid alkalmazása a nukleinsavak, elsősorban mRNS poli(A)-fajlagos leépítéséhez.

A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDELMI IRODA
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő

50+4 -T4 J-de

gk

2001. 05. 30.

20101005

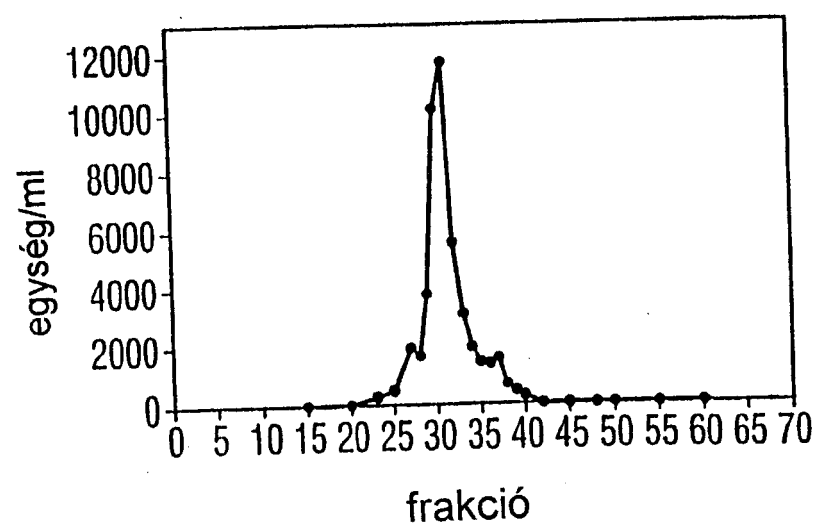
1. ÁBRA

2019

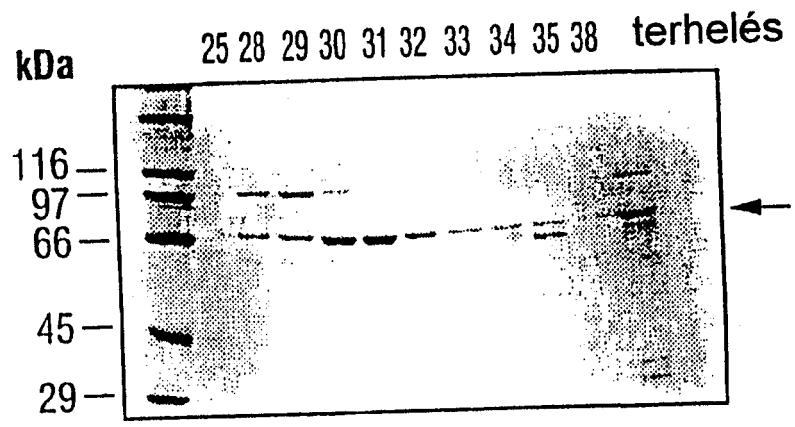
1/4

A2

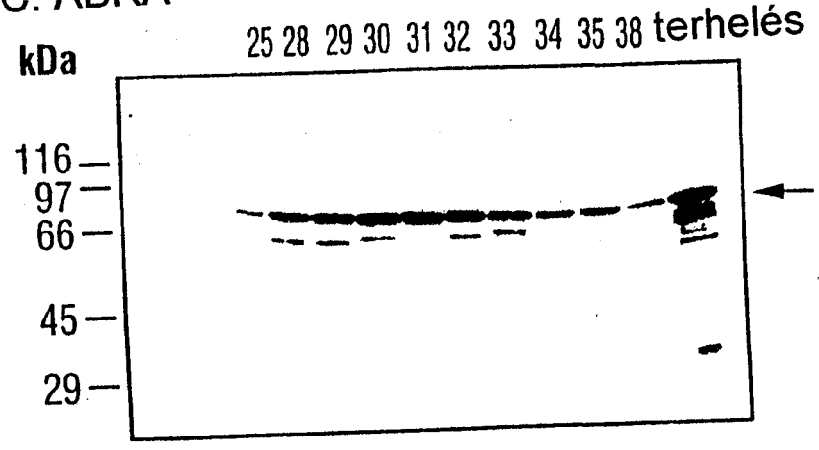
1A. ÁBRA



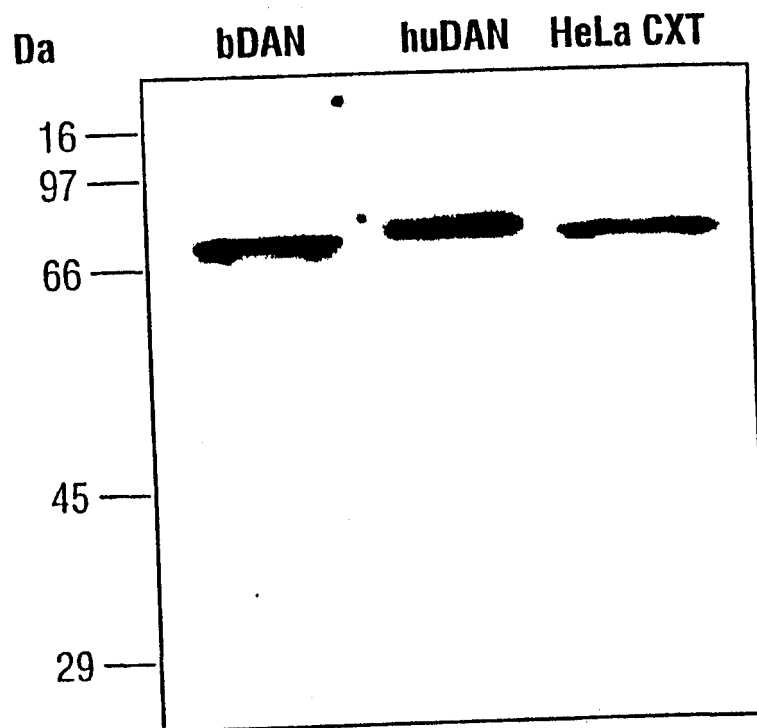
1B. ÁBRA



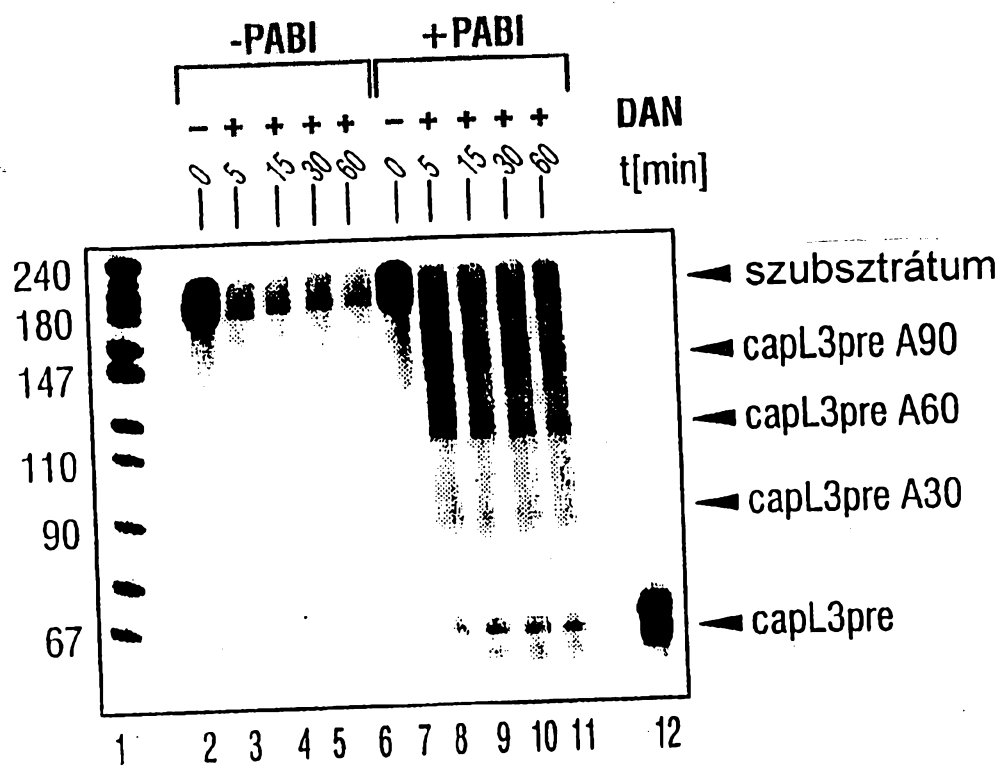
1C. ÁBRA



2. ÁBRA



3. ÁBRA



4. ÁBRA

huDAN	22	A	D	F	F	A	I	D	G	F	S	G	I	S	35
K10C81	23	C	D	F	V	A	I	D	F	F	L	G	L	D	36
A. thaliana		A	D	F	V	A	I	L	L	M	T	G	V	T	
PAN2	904	G	T	L	V	A	I	D	A	F	V	S	L	Q	917
RN-áz D	22	F	P	A	I	A	L	D	T	F	V	R	T	R	35
EcoDNSPol1	349	A	P	V	F	A	F	D	T	T	D	S	L	D	362

Exol

huDAN	283	L	V	I	G	H	N	M	L	L	D	V	M	H	T	V	H	298
K10C81	284	L	V	V	G	H	N	S	L	L	D	A	M	Y	M	Y	H	299
A. thaliana		L	I	V	G	H	N	C	F	L	D	I	A	H	V	Y	S	
PAN2	1011	V	F	V	G	H	G	L	N	N	D	F	K	H	I	N	I	1026
RN-áz D	76	T	K	F	L	H	A	G	S	E	D	L	E	V	F	L	N	91
EcoDNSPol1	415	L	K	V	G	Q	N	L	K	Y	D	R	G	I	L	A	N	430

ExolI

huDAN	373	S	E	Q	L	D	E	A	G	Y	D	A	Y	I	T	G	L	C	389
K10C81	370	E	N	V	Y	D	N	A	G	F	D	S	Y	V	T	G	E	V	376
A. thaliana		A	G	G	K	D	E	A	G	Y	D	A	F	M	T	G	C	I	
PAN2	1062	Q	E	G	N	D	D	S	I	E	D	A	H	T	A	L	I	L	1078
RN-áz D	146	E	R	Q	E	W	Y	A	A	A	D	V	W	Y	L	L	P	I	162
EcoDNSPol1	493	E	E	A	G	R	Y	A	A	E	D	A	D	V	T	L	Q	L	507

ExolII