

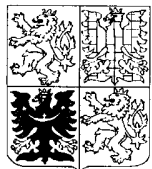
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 -4895

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19828711**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/04200**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/00596**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/22
C 07 K 1/22
C 07 K 16/40
A 61 K 38/43
A 61 K 39/395

(71) Přihlašovatel:

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH
& CO. KG, Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Neumann Thomas, Frankfurt, DE;
Hüls Christoph, Wackernheim, DE;
Gallert Karl-Christian, Karben, DE;
Virtanen Anders, Uppsala, SE;
Aström Jonas, Uppsala, SE;
Martinez Javier, Uppsala, SE;
Thuresson Ann-Charlotte, Uppsala, SE;
Ren Yanguo, Uppsala, SE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

3'-exonukleáza, její výroba a použití

(57) Anotace:

Předložené řešení se týká poly (A)-specifické 3'-
exonukleázové aktivity, kterou je možné získat
chromatografickým čištěním surového extraktu ze zvířecích
nebo lidských buněk, a rovněž jejího použití k deadenylaci 3'-
poly-(A)-zbytků nukleových kyselin a jako léčiva. Rovněž se
popisuje její použití jako diagnostika nebo k identifikaci
funkčních interaktorů.

3'-exonukleáza, její výroba a použití

Oblast techniky

Předložený vynález se týká poly (A)-specifické 3'-exonukleázové aktivity, kterou je možné získat chromatografickým čištěním surového extraktu ze zvířecích nebo lidských buněk, a rovněž její použití k deadenylaci 3'-poly(A)-zbytků nukleových kyselin a jako léčiva, diagnostika nebo k identifikaci funkčních interaktorů.

Dosavadní stav techniky

Většina eukaryotických mRNAs nese asi 200 adenosinových zbytků s dlouhým zbytkem poly(A) na zakončeních 3'. Poly- (A)-zbytky přitom zřejmě ovlivňují nejenom poločas rozpadu nebo intracelulární transport mRNAs, nýbrž také translaci mRNA na odpovídající proteiny. Přesný mechanismus není dosud objasněn, přičemž se však zdá, že výstavba a odbourání poly(A)-zbytků je přímo nebo nepřímo vázána na jejich funkce (viz příkladně Wickens, M. a spol., (1997) Curr.Opin.Genet. Dev., 7, strany 220-232).

Poly(A)-odbourávající nukleázové aktivity již byly zkoumány ve více eukaryotických systémech (viz příkladně Virtanen, A. a Aström, J. (1997) v Prog.Mol.Subcell.Biol. (Jeanteur, P., ed.) Vol. 16, 199-220, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg). Tak byly příkladně v kvasinkách identifikovány dvě reakční cesty. Jedna reakční cesta, tak zvaná "deadenylation dependent decapping passway" začíná

odstraněním poly(A)-zbytku a a týká se 5'-3'-exonukleotického odbourání mRNA pomocí Xmp5'-exonukleázy. Druhá reakční cesta, tak zvaná "3'-5'-decay passway" startuje deadenylací mRNA a zahrnuje 3'-5'-exoribonukleotické odbourání mRNA. Ve vztahu k "3'-5'-decay passway" byl před nedávnem identifikován multikomponentní komplex, zvaný exosom (Mitchell, P. a spol. (1997), Cell 91, 457-466). Exosom sestává z několika opakovaných 3'-5'-exoribonukleáz a podílí se rovněž na 3'-procesování 5.8S rRNA a 3'-5'-odbourání mRNA (Anderson, J.S.J. a Parker, R. (1998) EMBO J. 17, 1497-1506). Není však známo, jestli nějaká z exoribonukleáz exosomu odbourává přednostně poly(A). Kromě toho byl identifikován v kvasinkách protein I (PABI) závislý na poly(A)-specifické nukleáze (PAN), který váže poly(A) (viz příkladně Lowell, J.E. a spol. (1992) Genes.Dev. 6, 2088-2099). PAN je 3'-5'-exoribonukleáza a je složena nejméně ze dvou polypeptidů Pan2p a Pan3p (viz příkladně Brown, C.E.Jr. a spol. (1996) Mol.Cell.Biol., 16, 5744-5753).

V buňkách savců byly identifikovány tři rozdílné aktivity odbourávající poly(A). Příkladně má HeLa-buněčná aktivita vysokou selektivitu pro odbourávání 3'-lokalizovaných poly(A)-zbytků, prodlužuje 3'-lokalizované hydroxylové skupiny a tvoří 5'-AMP jako mononukleotidický reakční produkt (viz příkladně Aström, J. a spol. (1992) J.Biol.Chem. 267 (25) 18154-18159 a J.Aström, A.Aström a A. Virtanen, In vitro deadenylation of mammalian mRNA by a HeLa cell 3'-exonuclease, EMBO J., (1991), Vol. 10, 3067). Dále byla popsána Mg²⁺-závislá poly(A)-specifická 3'-exoribonukleáza z telecího brzlíku s molekulovou hmotností 80 kDa (Schröder a spol., (1980) J.Biol.Chem. 255 (10) 4535-4538), případně 74 kDa (Körner, C.G. a Wahle, E. J.Biol.Chem. 272

(16), 10448-10456. Dále byla popsána 3'-exonukleáza asociovaná s polyribosomy s molekulovou hmotností 33 kDa, která však není specifická pro poly(A) (Caruccio, N. a Ross, J. (1994) J.Biol.Chem. 269 (50), 31814-31821). Z telecího brzlíku byla identifikována další poly(A)-specifická 3'-exonukleázová aktivita, která má molekulovou hmotnost 60 kDa. Dodatečně se však ukázalo, že tento protein je hnRNP L-protein a tím nemá žádný vztah k měřené poly(A)-specifické 3'-exoribonukleázové aktivitě.

Úkolem předloženého vynálezu proto je dát k dispozici 3'-exoribonukleázu, která specificky odbourává 3'-lokalizované poly(A)-zbytky.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je proto způsob získávání poly(A)-specifické 3'-exonukleázové aktivity, zahrnující následující kroky :

- a) výroba surového extraktu ze zvířecích nebo lidských buněk
- b) srážení proteinu ze surového extraktu, který se získá z kroku a)
- c) chromatografie precipitátu získaného z kroku b) na bárickém aniontoměniči
- d) afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku c)
- e) chromatografie aktivní frakce z kroku d) na bárickém aniontoměniči
- f) afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku e)
- g) poly(A)-afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku f)
- h) chromatografie aktivní frakce z kroku g) na bárickém aniontoměniči a případně

- i) gelová filtrace aktivní frakce z kroku g)
nebo
j) dvojnásobná afinitní chromatografie aktivních frakcí
z kroku f).

Překvapivě je 3'-exonukleázová aktivita získaná popsáním způsobem specifická pro 3'-lokalizované poly(A)-zbytky, přičemž je nutná 3'-lokalizovaná hydroxylová skupina a jako mononukleotidický reakční produkt se tvoří 5'-AMP. V protikladu k dosud známým 3'-exonukleázovým aktivitám má 3'-exonukleázová aktivita podle vynálezu molekulovou hmotnost asi 50 kDa za podmínek denaturace. V protikladu k proteinu 74 kDa z telecího brzlíku se 3'-exonukleázová aktivita podle vynálezu nestimuluje spermidinem při nízkých koncentracích soli, nýbrž se při nízkých ale i při vysokých koncentracích soli inhibuje. Navíc interaguje 3'-exonukleáza podle vynálezu na rozdíl od 74 kDa proteinu z telecího brzlíku reálně silně s heparin-sefarozeou. Takový 74 kDa protein se v SDS-Page - obrázek 1B a 2B nenalezne. Proto bylo překvapivé, že na rozdíl od exonukleázové aktivity z buněk HeLa je exonukleáza podle vynálezu aktivní i v přítomnosti Mn^{2+} . Navíc je překvapivé, že exonukleáza podle vynálezu pracuje procesivně - to znamená, že se exonukleáza váže na 3'-konci poly(A)-zbytku a opobourává nukleotid po nukleotidu, aniž by se rozpadl exonukleázový poly(A)-komplex - zatímco protein 74 kDa pracuje distributivně, kdy se komplex po jednom pracovním kroku rozpadne a musí se regenerovat.

Poly(A)-specifická 3'-exonukleázová aktivita podle vynálezu se může s výhodou získávat z brzlíkových buněk ze zvířecích nebo lidských buněk, obzvláště z telecího brzlíku. K tomu se obecně vyrobí celobuněčný extrakt, ze kterého se

protein přednostně vysráží pomocí síranu amonného. Koncentrace nasycení přitom s výhodou činí asi 45 % síranu amonného. Jako obzvláště výhodné se přitom ukázalo, jestliže před vlastním srážením proteinu bylo možné srážením oddělit cizí proteiny při koncentraci nasycení s výhodou asi 25 % síranu amonného, takže v následujícím kroku se mohla vysrážet ze zbytku 3'-exonukleázová aktivita při asi 45 koncentraci síranu amonného. Touto frakcionací proteinů se již může oddělit podstatná část nežádoucích cizích proteinů.

Následně se provádí chromatografie precipitátu na bárickém iontoměniči, s výhodou na slabě bárickém aniontoměniči, obzvláště na DEAE, jako příkladně na DEAE-sefaroze. Obecně se eluuje aktivní frakce při asi 0,17 M soli, s výhodou jednomocné soli, jako je příkladně chlorid draselný. Následně se provádí afinitní chromatografie eluované a obvykle dialyzované aktivní frakce, s výhodou na heparinu, neboť bylo překvapivě objeveno, že se aktivní frakce obzvláště dobře váže na heparin, příkladně heparin-sefarozu. Aktivní frakce se proto obvykle eluují při vysokých koncentracích solí, jako příkladně 1,0 M jednomocné soli, jako je chlorid draselný. Následně se provádí chromatografie aktivních frakcí na bárickém aniontoměniči, s výhodou na silně bárickém aniontoměniči, obzvláště na Mono X, jako příkladně Mono X HR 16/10. S výhodou se proteiny eluují s pomocí lineárního gradientu, přičemž aktivní frakce se mohou eluovat při asi 10 %-ní koncentraci soli asi 1,0 M, obzvláště jednomocné soli, jako je chlorid draselný. Potom se provádí afinitní chromatografie aktivních frakcí, s výhodou na barvivu, obzvláště na modrém barvivu, především na Blue-sefaroze. S výhodou se proteiny eluují s pomocí vícestupňového, obzvláště dvoustupňového gradientu soli, přičemž aktivní

frakce dobře eluují s výhodou při vysokých koncentracích solí, obzvláště při vysokých koncentracích jednomocných solí, především při asi 1,0 M, jako příkladně 1,0 M chloridu draselného.

Podle předloženého vynálezu se následně provádí afinitní chromatografie poly(A), přičemž aktivní frakce se eluují při asi 0,35 až asi 0,55 M soli, obzvláště jednomocné soli, jako je chlorid draselný. Tak se provádí způsobem podle vynálezu chromatografie aktivních frakcí na dalším bárickém aniontoměniči, s výhodou na silně bárickém aniontoměniči, obzvláště na Mono X, jako Smart Mono X. Přitom se aktivita s výhodou eluuje při asi 0,17 M soli, obzvláště jednomocné soli, jako je chlorid draselný. Jako poslední čistící krok se provádí způsobem podle vynálezu případně gelová filtrace aktivních frakcí, s výhodou gelová filtrace na Superdex 200, obzvláště gelová filtrace na Smart Superdex 200, přičemž obecně jsou aktivní frakce dobře frakcionovatelné v přítomnosti asi 0,1 M soli, obzvláště jednomocné soli, jako je příkladně chlorid draselný.

Způsobem podle vynálezu je možné vyčistit poly(A)-specifickou 3'-exonukleázovou aktivitu asi 600-násobně s výtěžkem asi 13 % (viz tabulku 1). Přitom je obzvláště překvapivé, že afinitní chromatografie poly(A) podle kroku (d) poskytuje asi 14-ti násobné čištění aktivity podle vynálezu.

V dalších formách provedení se proteiny po chromatografii na barvivu podrobí dvojnásobné afinitní chromatografii, s výhodou na ssDNA agarose s následnou 5'-AMP sefaroze. Aktivní frakce se obvykle eluují při vysokých koncentracích solí, jako příkladně asi 2,0

M jednomocné soli, jako je chlorid draselný.

Na základě způsobu podle vynálezu se nyní získá poly(A)-specifická 3'-exonukleázová aktivita, která za podmínek denaturace, příkladně v gelu SDS-PAGE probíhá při asi 50 kDa a za nativních podmínek, příkladně na Superdexu 200, při asi 180 až 220 kDa.

Proto se vynález rovněž týká asi 50 kDa proteinu a případně asociáty (tetramer), který má poly(A)-specifickou exonukleázovou aktivitu, které se získají způsobem podle vynálezu.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je proto přípravek obsahující poly(A)-specifickou 3'-exonukleázovou aktivitu, která se získá způsobem podle vynálezu. Přípravek případně obsahuje další přísady a pomocné látky.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je způsob deadenylace nukleových kyselin, obzvláště deadenylace 3'-lokalizovaných poly(A)-zbytků s výhodou mRNA v přítomnosti přípravku podle vynálezu. S výhodou se provádí deadenylační reakce v přítomnosti jednomocných kationtů, jako příkladně K^+ a/nebo Na^+ , obzvláště při koncentraci jednomocného kationtu asi 0,1 M. Dále je výhodné, jestliže se deadenylační reakce provádí při pH hodnotě asi 7.

Další předmět předloženého vynálezu se týká protilátek, které specificky reagují s přípravky podle vynálezu a/nebo s některou komponentou, přičemž přípravek je buďto sám imunogenní nebo se stane imunogenním vazbou na vhodné nosiče, jako je příkladně bovinní serumalbumin, případně se

jeho imunogenita může zvyšovat.

Protilátky jsou buďto polyklonální nebo monoklonální. Jejich výroba, která rovněž představuje předmět předloženého vynálezu se příkladně provádí obecně známými metodami imunisováním zvířecího savce, příkladně králíka přípravkem podle vynálezu, případně v přítomnosti příkladně Freundova adjuvantu a/nebo gelů hydroxidu hlinitého (viz příkladně Diamond, B.A. a spol. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Polyklonální protilátky vzniklé ve zvířeti na základě imunologické reakce se mohou následně snadno izolovat z krve obecně známými metodami a vyčistit případně sloupcovou chromatografií. Výhodné je afinitní čištění protilátek, při kterém se případně přípravek podle vynálezu váže na NHS aktivovaném HiTrap-sloupci.

Monoklonální protilátky se mohou příkladně vyrábět známou metodou Winter a Milstein (Winter, G., Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293).

Dalším předmětem předloženého vynálezu je také léčivo, které obsahuje přípravek podle vynálezu a případně vhodné přísady a pomocné látky a způsob výroby léčiva k ošetřování rakoviny, autoimunitních nemocí, obzvláště Multiple Sklerose nebo Rheumatoide Arthritis, Alzheimerovy nemoci, alergií, obzvláště neurodermitis, alergií typu I nebo IV, arthrosy, atherosklerosy, osteoporesy, akutních a chronických infekčních onemocnění a/nebo diabetes a/nebo k ovlivnění buněčného metabolismu, obzvláště při imunosupresi, především při transplantacích, pro které se formuluje přípravek podle vynálezu s farmaceuticky akceptovatelnými přísadami a/nebo pomocnými látkami.

Jako vhodné přísady a/nebo pomocné látky jsou příkladně vhodné roztok chloridu sodného, stabilizátory, inhibitory proteinázy atd.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je také diagnostikum obsahující přípravek podle vynálezu a případně vhodné přísady a pomocné látky a způsob výroby diagnostika k diagnóze rakoviny, autoimunitních nemocí, obzvláště Multiple Sklerose nebo Rheumatoide Arthritis, Alzheimerovy nemoci, alergií, obzvláště neurodermitis, alergií typu I nebo IV,, arthrosy, atherosklerosy, osteoporesy, akutních a chronických infekčních onemocnění a/nebo diabetes a/nebo k analýze buněčného metabolismu, obzvláště při imunostatu, především při transplantacích, pro které se formuluje přípravek podle vynálezu s farmaceuticky akceptovatelnými přísadami a/nebo pomocnými látkami.

Podle předloženého vynálezu se může příkladně přípravek podle vynálezu vázat na pevnou fázi, příkladně na nitrocelulozu nebo nylon a tak se příkladně uvést v in-vitro kontakt s vyšetřovanou tělesnou kapalinou, příkladně krví, a tak příkladně moci reagovat s autoimunními protilátkami. Komplex protilátka-peptid se může následně prokázat příkladně značkovánými antihumánými IgG- nebo IgM-protilátkami. Při značkování se příkladně jedná o enzym, jako peroxidázu, která katalyzuje barevnou reakci. Přítomnost a množství přítomných autoimunních protilátek se tak může barevnou reakcí snadno a rychle prokázat.

Další diagnostikum obsahuje samotné protilátky podle vynálezu. S pomocí těchto protilátek se může příkladně snadno a rychle vyšetřovat vzorek lidského tkaniva, jestliže je k dispozici přípravek podle vynálezu a/nebo některá jeho

komponenta. V tomto případě jsou protilátky podle vynálezu značkovány příkladně enzymem, jak se popisuje výše. Specifický komplex protilátka-peptid se tak může snadno a rychle prokázat enzymatickou barevnou reakcí.

Další předmět předloženého vynálezu se týká také testu k identifikaci funkčních interaktorů, jako příkladně inhibitorů nebo stimulátorů, obsahujících přípravek podle vynálezu nebo protilátky podle vynálezu a případně vhodné přísady nebo pomocné látky. K tomu se použijí vybrané substance příkladně z tak zvané "chemical library" v již výše popsané deadenylační reakci a měří se aktivita přípravků podle vynálezu v přítomnosti případně nepřítomnosti substancí. Jako substráty jsou příkladně vhodné mRNA nebo poly(A). Test se může příkladně provádět analogicky in-vitro deanedylací, jak se blíže popisuje v příkladech.

Další obecnou možností použití přípravků podle vynálezu je proto také poly-(A) specifické odbourání nukleových kyselin, obzvláště mRNA. Poly-(A) specifické odbourání nukleových kyselin se může uplatnit obzvláště ve výzkumných laboratořích.

Dále uvedené tabulky, obrázky a příklady slouží k bližšímu vysvětlení vynálezu, aniž by jej omezovaly.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje přehled čištění bovinní poly(A)-specifické 3'-exo-nukleázové aktivity. Aktivita deadenylace se kvantifikuje inkubací chromatografické frakce se substrátem L3(A₃₀)RNA, který se během in-vitro transkripce značuje pomocí [α -³²P] ATP za podmínek pro deadenylaci

in-vitro. Jedna Unit je definována jako uvolnění 1 pmol AMP za minutu.

Tabulka 1

Frakce	Protein	Aktivita	Specifická aktivita	Čištění
	mg	Units $\times 10^{-3}$	Units $\times 10^{-3}$ /mg	fold
A.S.45	65280	72000	1.1	-
II	3360	100000	29,9	27
IIB	652	59000	90	82
MQ	43,2	17000	387	352
C	14,4	9000	654	595

Tabulka II ukazuje substrátovou specifiku poly(A)-specifické 3-exonukleázové aktivity.

Tabulka II

Substrát	K _m (M)	Rel.V _{max} /K _m
poly(A)	1 x 10 ⁻⁸	1
poly(U)	2 x 10 ⁻⁸	1/10
poly(C)	1 x 10 ⁻⁸	1/110
poly(G)	7 x 10 ⁻⁹	1/240

Obrázek 1A ukazuje identifikaci polypeptidu 50 kDa pomocí SMART Mono Q-chromatografie. Přitom se poly(A)-

sefarozeová frakce frakcionuje SMART-mono Q-chromatografií a získané frakce se spolu s s jednotně značeným substrátem RNA L3 (A_{30}) inkubují za podmínek in-vitro deadenylace po dobu 90 minut. Reakční produkty se frakcionují elektroforezou v gelu 10 %-ního polyakrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1 - 7 M močoviny. Výsledný fluorogram je znázorněn na obrázku 1A. Stopa S znamená substrát RNA inkubovaný v nepřítomnosti frakce. Stopa "Load MQ" znamená RNA substrát inkubovaný s poly(A)-sefarozeovou frakcí. Stopy 6 až 18 znamenají RNA substrát inkubovaný v přítomnosti získaných frakcí. Byly značkovány pouze sudé frakce.

Obrázek 1B ukazuje SDS-Page SMART-Mono Q-frakcí. Přitom se separují alikvoty frakcí na SDS-Page. Výsledný gel se vybarví stříbrem. Číslo frakcí jsou uvedena. Značují se pouze sudé frakce. Markery molekulové hmotnosti se se vydělí do stopy M. Číslo na levé straně udávají molekulové hmotnosti značkovacích proteinů v kDa.

Obrázek 2A ukazuje identifikaci polypeptidu 50 kDa chromatografií SMART Superdex 200. Získané frakce se spolu s jednotně značkováným RNA-substrátem L3 (A_{30}) za podmínek dedenylace in-vitro inkubují po dobu 120 minut. Reakční produkty se frakcionují na 10 %-ním polyakrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1 - 7 močovinovém gelu. Výsledný fluorogram je zobrazen na obrázku 2. Stopa L3 (A_{30}) ukazuje substrát RNA, inkubovaný v nepřítomnosti jedné frakce. Stopa "Load" ukazuje RNA-substrát s mono-Q-koncentrovanou poly(A)-sefarozeovou frakcí. Stopy 15 až 25 ukazují RNA-substrát inkubovaný v přítomnosti získaných frakcí. S a P ukazují místa doběhu RNA-substrátu (S) a produktu (P). Eluční profily markeru molekulové hmotnosti ke kalibraci sloupce Superdex 200 jsou znázorněny nahoře.

Obrázek 2B ukazuje SDS-PAGE frakcí SMART Superdex 200. Výsledný gel se vybarví stříbrem. Jsou uvedena čísla frakcí. Byly značkovány pouze sudé frakce. Marker molekulové hmotnosti se separuje ve stopě M. Čísla na levé straně udávají molekulovou hmotnost proteinového markeru v kDa.

Obrázek 2C ukazuje afinitní frakcionaci 5 AMP sefarozy 4B na specifickou poly(A)-exonukleázovou aktivitu. Značkováné frakce se inkubují po dobu 5 minut s radioaktivním RNA substrátem L3 (A₃₀). Reakční produkty se frakcionují na 10 %-ním polyakrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1 - 7 močovinovém gelu. Výsledný fluorogram je zobrazen na obrázku 2C. Ve stopě A se inkubuje substrát RNA s afinitou 5 AMP sefarozy 4B čištěné exonukleázy. Ve stopě "-" se inkubuje v nepřítomnosti aktivní frakce pouze pufr.

Obrázek 2D ukazuje SDS-Page afinitní chromatografie 5 AMP na sefaroze 4B. Výsledný gel se vybarví stříbrem. Čísla frakcí jsou uvedena. Značují se pouze sudé frakce. Markery molekulové hmotnosti se se vydělí do stopy M. Čísla na levé straně udávají molekulové hmotnosti značkovacích proteinů v kDa.

Obrázek 3 ukazuje specifitu exonukleázy pro 3'-konce lokalizovaných poly(A)-zbytků. Poly(A)-sefarozové frakce se inkubují za podmínek in-vitro deadenylace po dobu 0, 5, 10, 20, 30, 60 nebo 90 minut, jak je uvedeno, spolu s RNA substrátem L3 (A₃₀), L3 (A₃₀)X₁₅, L3 (A₃₀)X₄₉ a L3 (A₃₀)X₁₆₄, jak je uvedeno. Reakční produkty se frakcionují na 10 %-ním polyakrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1 - 7 molárním močovinovém gelu. Výsledný fluorogram je zobrazen

na obrázku 3. S a P ukazují místa doběhu RNA-substrátu (S) a produktu (P).

Obrázek 4 ukazuje reakční produkt 5'-AMP uvolněný během deadenylace. Poly(A)-sefarozeová frakce se inkubuje za podmínek in-vitro deadenylace po dobu 20 minut spolu s RNA substrátem L3 (A_{30}), který se během in-vitro transkripce značkuje pomocí $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. 3 μl reakce se podrobí 2-D TLC. Výsledný autoradiogram na vysušené PEI celulozové desce ukazuje obrázek 4. Jsou zobrazena místa doběhu 2'-AMP, 3'-AMP a 5'-AMP markerů, které se oddělí spolu s radioaktivními vzorky.

Obrázky 5 A-C ukazují pokračující odbourávání poly(A). Poly(A)-sefarozeová frakce se inkubuje s X fmol RNA-substrátu L3 (A_{30}), který se během in-vitro transkripce značkuje pomocí $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ za podmínek in-vitro dedenylace. Reakční produkty se frakcionují na 10 %-ním polyakrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1 - 7 močovinovém gelu. Výsledný fluorogram je zobrazen na obrázku 5 A-C. S a P ukazují místa doběhu RNA-substrátu (S) a produktu (P). Přitom ukazuje obrázek 5A reakce, které se provádějí v přítomnosti 0,5 μl poly(A)-sefarozeových frakcí a k uvedeným dobám se terminují. Obrázek 5B ukazuje reakce, které se provádějí v přítomnosti 0,5 μl poly(A)-sefarozeových frakcí a terminují se po 20 minutách. Uvedená množství poly(A) v ng se přidávají k reakcím. Obrázek 5C ukazuje reakce, které se provádějí v přítomnosti uvedeného množství poly(A)-sefarozeových frakcí v μl a terminují se po 20 minutách.

Obrázek 6A :

SGS-PAGE pro experiment zpětného procesu podle Dayle A.

Hager, Richard R. Burgess, Anal. Biochem (1980), 109, 76. Výsledný gel se vybarví stříbrem. Čísla na levé straně udávají molekulové hmotnosti značkovacích proteinů v kDa. Výsledné pásy se vyříznou, jak je uvedeno v na obrázku 6A (A, 110, B, C, D a E).

Obrázek 6B :

Denaturovaný RNA-polyakrylamidový gel : kousky gelu získané v obrázku 6A se eluují podle Hager a spol. Získané eluované proteiny se inkubují se substrátem L3(A₃₀) podle příkladu 9 a reakční násady se oddělí na polyakrylamidovém gelu. Aktivita byla prokázána v kousku gelu C (asi 50 kDa).

Obrázek 7 ukazuje chromatografické kroky způsobu podle vynálezu.

Zkratky použité v textu :

L3 poly(A)-site pozdní oblasti humáního adenoviru 2 (délka : 54 nukleotidů (J.Aström, A.Aström a A. Virtanen, In vitro deadenylation of mammalian mRNA by a HeLa cell 3'-exonuclease, EMBO, (1991), Vol. 10, 3067)

X_n n-nukleotidy (A, G, T, C)

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Výroba extraktů neobsahujících buňky

Surový extrakt celých buněk se vyrobí z telecího brzlíku podle Wahle, E. (1991) J.Biol.Chem. 266, 3131-3139. K tomu se 3 až 15 kg mraženého telecího brzlíku nataje na ledu, nařeže na kousky a homogenizuje se v přibližně stejném objemovém množství pufru 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM K_3PO_4 , 1 mM EDTA, 10 % glycerinu, 50 mM KCl, 0,1 mM DTT, pH 7,9) ve Waring-Blender po dobu 50 sekund při nízké rychlosti a po dobu 50 sekund při vysoké rychlosti. Pevný materiál se sráží centrifugací v Sorwall GSA-Rotor při 16000 g při teplotě 4 °C po dobu 60 minut. Surový extrakt se následně filtruje sítím s velikostí ok 7 - normal (Pascal Eng.Co. Ltd.), přidá se 0,134 g/ml síranu amonného (25 % sycení), 2 hodiny se míchá na ledu a precipitát se sráží centrifugací v Sorwall GSA-Rotor při 16000 g při teplotě 4 °C po dobu 60 minut. Ke zbytku se přidá dalších 0,115 g/ml síranu amonného (45 % sycení) a zpracuje se stejně, jak se popisuje výše. Pelety získané po centrifugaci se rozpustí v 2 až 4 objemech pufru D (20 mM HEPES (KOH), 100 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20 % glycerinu, pH 8,2) a dialyzuje se po dobu 10 hodin při teplotě 4 °C v dialyzační trubici s vylučovací hranicí molekulové hmotnosti 6000 až 8000. Po dialyze se 45 % frakce ze síranu amonného (A.S. 45) zamrazí v kapalném dusíku a skladuje se při teplotě -70 °C.

Při výchozí hmotnosti 4,5 kg telecího brzlíku obsahuje A.S. 45 frakce (asi 960 ml) asi 68 mg proteinu na ml, což poskytne celkové množství 65 mg proteinu. Koncentrace proteinu se stanoví pomocí Biorad-Protein-Assay-Kit (č. 500-0001) s boviním gama-globulinem jako referenční substancí.

P ř í k l a d 2

Dílčí čištění poly(A)-specifické 3'-exonukleázové aktivity

K dílčímu čištění se vychází z 960 ml surové A.S. 45 frakce (65 g proteinu) (viz tabulka 1). Provedou se dvě v podstatě stejné chromatografie s DEAE-sefaroze. Při první se ke 160 ml A.S.45 extraktu k DEAE-sefaroze CL-6B (Pharmacia Nr. 10-0710-01) přidá iontoměnič (240 ml sbalené matrice), který byl ekvilibrován pufrem D. Suspenze se pomalu míchá po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Nevázaný materiál se odstraní trojnásobným promytím pufrem D a následnou centrifugací (Sorwall H 4000-Rotor při 800 otáčkách po dobu 3 minuty). DEAE sefarozeová matrice se potom uvede na sloupec (průměr 50 mm) a promyje se pufrem s průtokem 9 cm za hodinu. Provede se dvoustupňový gradient soli (pufr D s 0,17 M případně 1,0 M KCl) a eluovaný protein s shromáždí. Dalších 800 ml frakce A.S. 45 se frakcionuje stejným způsobem. V tomto případě se však použije 240 ml balené DEAE-sefarozy a sloupec o průměru 70 mm. Protein eluovaný při 0,17 M KCl, označený jako frakce II se dialyzuje proti pufru D po dobu 10 hodin, zamrazí se v kapalném dusíku a skladuje se při teplotě -70 °C. Následně se frakce II frakcionuje přes heparin-sefaroze CI-6B (Pharmacia Nr. 17-0467-01)-chromatografie. Sloupec s objemem lože 100 ml a průměrem 50 mm se ekvilibruje pufrem D při průtoku 9 cm za hodinu. Provedou se dvě v podstatě stejné frakcionace na heparin-sefaroze. Frakce II (210 ml) se nanese na sloupec heparin-sefarozy CI-6B s průtokem 9 cm za hodinu. Poté, co se eluuje nevázaný materiál se eluuje vázaný protein promytím sloupce pufrem D s 1,0 M KCl. K oddělení zbytku frakce II (270 ml) se použije další sloupec heparin-sefarozy. Eluované frakce (označené jako IIB) se dialyzují proti pufru

D po dobu 10 hodin při teplotě 4 °C, zamrazí se v kapalném dusíku a skladují se při teplotě -70 °C. Následně se frakce IIB frakcionují čtyřmi v podstatě stejnými FPLC (Pharmacia) Mono Q HR 16/10 (Pharmacia Nr. 17-0467-01)-chromatografie. K tomu se Mono Q-sloupec ekvilibrovaný pufrem D nasytí pomocí 50 ml Superloop (Pharmacia Nr. 19-7850-01) (asi 30 ml frakce IIB na průtok). Protein se eluuje pomocí dvoustupňového lineárního gradientu (0 až 20 % ve 250 ml a 20 až 50 % ve 150 ml pufru D s 1,0 M KCl), shromáždí se 9 ml frakcí a aktivní frakce, které elují při 10 % 1,0 M KCl se spojí (označeny jako frakce MQ), dialyzují se proti pufru D po dobu 10 hodin při teplotě 4 °C, zamrazí se v kapalném dusíku a skladují při -70 °C. 21 ml balené Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia Nr. 17-0830-01) se podle návodu výrobce připraví na sloupec s průměrem 26 mm. Sloupec se ekvilibruje pufrem D při průtoku 34 cm za hodinu. Frakce MQ (108 ml) se uvede na sloupec a vázaný protein se eluuje pomocí dvoustupňového gradientu soli (pufr D s 0,17 M případně 1,0 M KCl).

Aktivní frakce, označená jako C, která se získá při eluci 1,0 M KCl se dialyzuje proti pufru D po dobu 10 hodin při teplotě 4 °C, zamrazí se v kapalném dusíku a skladuje při -70 °C.

P ř í k l a d 3

Chromatografie na poly(A)-Sepharose

Podle návodu výrobce se připraví poly(A)-Sepharose CL-6B. Sloupec HR 10/10 s objemem lože 8 ml se ekvilibruje pufrem D s 25 mM KCl při pH 7. 12 mg (12 ml) frakce C se dialyzuje proti 2 x 21 pufru D s 25 mM KCl při pH 7 po dobu 4 hodiny. Dialyzovaná frakce se vloží na sloupec s průtokem

1 ml za minutu. Sloupec se následně promyje nejdříve 5 objemy lože pufrem D s 25 mM KCl při pH 7 a potom znovu 5 objemy lože pufrem D s 200 mM KCl při pH 6 a následně 5 objemy lože pufrem D s 280 mM KCl při pH 6. Následně se zavede gradient (5 objemů lože) od 280 do 600 mM KCl při pH 6. Poly(A)-specifická exonukleázová aktivita eluuje mezi 350 a 550 mM. Tím bylo dosaženo 14-ti násobného vyčištění nukleázové aktivity.

P ř í k l a d 4

SMART Mono-Q-chromatografie

Sloupec SMART Mono Q PC 1,6/5 se ekvilibruje pufrem D při pH hodnotě 7 pomocí 50 mM KCl a při průtoku 50 μ l za minutu. 1 ml poly(A)-sefarozeové frakce (60 μ g proteinu) se dialyzuje proti pufru D s 50 mM KCl při pH 7 a se stejným průtokem se nanese na sloupec. Sloupec se promývá 1,5 ml gradientem od 50 do 500 mM KCl. 50 μ l frakce se shromáždí a pomocí in-vitro deadenylačního testu (viz níže) se identifikuje exonukleázová aktivita. Exonukleázová aktivita se eluuje při asi 170 mM KCl.

P ř í k l a d 5

Gelová filtrace SMART (Pharmacia, Uppsala) Superdex 200

Poly(A)-sefarozeová frakce (0,7 ml, 0,06 mg na ml proteinu) se nejprve koncentruje dále popsáním způsobem pomocí chromatografie SMART Mono Q PC 1,6/5 (Pharmacia Nr. 17-0671-01). Sloupec se ekvilibruje pufrem D při pH hodnotě 7 s pomocí 50 mM KCl. Poly(A)-sefarozeová frakce se dialyzuje proti pufru D s 50 mM KCl při pH 7 a nanese se na mono-Q

sloupec s průtokem 50 μ l za minutu. Vázaný materiál se eluuje pomocí lineárního gradientu do 500 mM KCl a sbírají se 25 μ l frakce. Aktivní frakce se (celkový objem 100 μ l) se identifikují a čistí. Následně se frakcionuje 50 μ l koncentrované poly(A)-sefarozy frakce pomocí gelové filtrace na sloupci SMART Superdex 200 PC 3,2/30, který byl ekvilibrován pufrům D při pH 7 se 100 mM KCl. Průtok činí 40 μ l za minutu. Aktivní frakce se identifikují pomocí in-vitro de-denylačního testu (viz níže). Markery molekulové hmotnosti se frakcionují stejným způsobem na sloupci Superdex 200. Markery molekulové hmotnosti jsou Ferritin, Katalase, Aldolase a BSA s molekulovými hmotnostmi 440, 232, 158 a 67 kDa.

P ř í k l a d 6

Afinitní chromatografie na ssDNA Agarose

ssDNA Agarose se připraví podle údajů výrobce (Pharmacia Nr. 27-5575-02). Sloupec 0,6 ml se naplní. Na sloupec se vnese aktivní frakce C (10 ml) z příkladu 3 v pufru D s 50 mM KCl (pH 7,0). Prošlé frakce se shromažďují.

P ř í k l a d 7

Afinitní chromatografie 5'AMP

5'-AMP Sepharose (Pharmacia 17-0620-01) se připraví podle údajů výrobce a prošlé frakce z příkladu 6 se nanese na sloupec v pufru D s 50 mM KCl (pH 7,0). Následně se promývá 5 ml pufru D v 50 mM KCl (pH 7,0). Nato se promývá 5 ml pufru D v 200 mM KCl (pH 7,0). Nakonec se aktivita eluuje ze sloupce 2 ml pufru D s 2 M KCl (pH 7,0).

P ř í k l a d 8

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (prováděná pro obrázky 1B, 2B a 2D)

Podle Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685 se s pomocí gelového aparátu Mini-Protean II (Bio Rad Nr. 125 BR) vyrobí SDS-polyakrylamidový (akrylamid : bisakrylamid 30 : 0,8) gel (5 % akrylamidu ve spaceru a 7,5 % akrylamidu v dělicím gelu). Vznikající množství proteinu se frakcionuje přímo na gelu nebo se před nanesením na gel vysráží přidavkem 1 objemu 20 % TCA, následovaným centrifugací při 13000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Získaná sraženina se promyje acetonem a rozpustí v 10 µl vzorkovacího pufru (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % W/V) SDS, 100 mM DTT, 8 % v/v glycerinu, 0,025 % (w/v) bromfenolové modři) a rozdělí se gelovou elektroforézou. Získaný gel se fixuje a vybarví. Vybarvení stříbrem se provádí podle Oakley, B.R. a spol. (1980) Anal.Biochem. 105, 361-363. Vybarvení Com-massie Brilliant Blue se provede podle Merryl, C.R. (1990) Meth.Enzymol. 182, 477-488.

P ř í k l a d 9

Výroba RNA substrátů

5'-chráněný RNA substrát L3 (A₃₀), L3 (A₃₀)X₁₅, L3 (A₃₀)X₄₉ a L3 (A₃₀)X₁₆₄, se vyrobí pomocí in-vitro transkripce s T3 RNA-polymarázou (Promega Nr. P208C) a plasmidem pT3L3 (A₃₀) (Aström, J. a spol. (1991) EMBO J. 10 (10), 3067-3071) jako DNA-matrice, která byla strávena s NsiI, Hinc II, Eco R I a Pvu II. RNA substráty ML(G₃₀) ML (C₃₂)

a ML(U₃₀) se vyrobí stejně jako popisuje Aström, J. a spol. (1991), supra. RNA-substráty se značkují buďto celé nebo na jejich homopolymerních zbytcích vestavbou radioaktivně značených mononukleotidů v průběhu in-vitro transkripce (viz Aström, J. a spol. (1991), supra, Aström, J. a spol. (1992), supra). Specifická radioaktivita vestavěných radioaktivních mononukleotidů činí 40 Ci/mmol v transkripční směsi pro celé značení nebo 4 Ci/mmol v transkripční směsi pro značení zbytků. Transkribovaná RNA se čistí podle Moore, C.L. a Sharp, P.A. (1985) Cell, 41, 845-855.

P ř í k l a d 10

In-vitro deadenylace

Testovací podmínky pro in-vitro deadenylaci jsou následující : 1 mM MgCl₂, 2,5 % (w/v) poly(vinylalkohol) (Sigma P-8136), Mw 10000), 100 mM KCl, 0,15 Unit RNAGuard, 5 až 20 fmol RNA substrátu, 20 až 48 % (v/v) pufr (20 mM HEPES (KOH), 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 25 % glycerinu, pH 7) a odpovídající proteinové frakce (Aström, J. a spol. (1992), supra). Reakční objem činí 15 nebo 25 µl a inkubace se provádí při teplotě 30 °C. Reakce se následně terminuje a RNA se vyčistí podle Moore, C.L. a Sharp, P.A. (1985) supra. RNA se analyzuje pomocí elektroforézy v 10 % polyakrylamidu (19 : 1 akrylamid/bisakrylamid) - 7 M močovinovém gelu, následovanou autoradiografií získaných gelů.

P ř í k l a d 11

2D-chromatografie v tenké vrstvě

Dvourozměrová (2D-chromatografie v tenké vrstvě) se provádí na PEI-celuloze F-deskách (Merck Nr. 5579) podle Kornarska, M.M. a spol. (1985) Nature 313 (6003), 552-557. Produkty uvolněné deadenylační reakcí se analyzují dvourozměrovou chromatografií v tenké vrstvě (2D-TLC) v komoře. Prvním elučním prostředkem (I) je kyselina isobutanová/koncentrovaný amoniak/voda; 577/38/385 (v/v) a druhým elučním prostředkem (II) je nasycený síran amonný/1M octan sodný/isopropanol; 80/18/12 (v/v). Po prvním dělení se desky suší po dobu 8 hodin při teplotě místnosti, aby se odpařila kyselina isobutanová. Jako markery se použijí 5'-AMP (Sigma A-1752), 2'-AMP (Sigma A-9396), 3'-AMP (Sigma A-0386). Poloha markeru se stanoví pomocí UV-světla (lampa s minerálním světlem UVG-54, Ultra-Violet Prod. Inc.). Radioaktivní molekuly se stanoví pomocí autoradiografie výsledné PEI-celulozy F-desky.

P ř í k l a d 12

1-D TLC a kvantifikace nukleázové aktivity

Deadenylační aktivita se kvantifikuje následovně : L3 (A₃₀)-RNA-substrát, značkový pomocí [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP se inkubuje in-vitro dedenylační reakcí. Reakční produkty se analyzují 1-D TLC s elučním prostředkem III (0,75 M K₂HPO₄, pH 3,5 (H₃PO₄)). Výsledná PEI-celulozová F-deska se vysuší a skanuje se ve 400 S fosforimageru (Molecular Dynamics). Stanovují se frakce s uvolněným [$\alpha^{32}\text{P}$]AMP. Na základě známé specifické aktivity [$\alpha^{32}\text{P}$]AMP v RNA substrátu se vypočítá množství uvolněné AMP v molech. Jednotka deadenylační aktivity odpovídá uvolnění 1 pmol AMP/minuta.

P ř í k l a d 13

Podmínky in-vitro deadenylace

Podmínky poly(A)-deadenylační aktivity se stanoví výše popsaným deadenylačním testem za použití poly(A)-sefarozeové frakce jako zdroje enzymu a poly(A)-zbytku značkováného L3(A₃₀)-RNA jako substrátu. Aktivita se stanoví na základě uvolnění mononukleotidu testem 1 D TLC (viz výše). K tomu byla šetřena nutnost jednomocných (draslík a sodík) iontů a dvojmocných iontů (hořčík, mangan, zinek a vápník).

Bylo zjištěno, že dvojmocné kationty nejsou pro aktivitu nutné a že optimální koncentrace jednomocných kationtů činí asi 100 mM. Rovněž bylo zjištěno, že aktivita v přítomnosti iontů draslíku je vyšší než v přítomnosti iontů sodíku. Rovněž bylo zjištěno, že spermidin nemá žádný vliv na aktivitu.

Dále bylo zjištěno, že ionty hořčíku jsou výhodnými dvojmocnými ionty a že optimální koncentrace činí 1 mM. Dále bylo zjištěno, že ionty manganu, zinku a vápníku mohou do určitého stupně nahradit ionty hořčíku. V přítomnosti 1 mM Mn²⁺, Zn²⁺ a Ca⁺ poklesá aktivita ze 17 % přes 2 % na 0,7 % ve srovnání s Mg⁺.

Ze šetření závislosti na pH vyplývá, že aktivita je nejvyšší při pH hodnotě asi 7.

P ř í k l a d 14

Substrátová specifita

RNA-substrátová specifita aktivity se šetří ve dvou pokusech. V prvním experimentu se inkubují na jejich homopolymerních zbytcích radioaktivně značené RNA-substráty L3 (A_{30}), ML45 (U_{30}), ML40 (C_{32}) a ML43 (G_{30}) v in-vitro deadenylačním testu (viz výše). Uvolnění radioaktivních mononukleotidů se zjišťuje testem 1-D TLC (viz výše). Na základě zjištěných výsledků se podle Lineweaver-Burke stanoví K_m a V_{max} hodnoty pro každý RNA-substrát (viz tabulka II). Ve druhém experimentu se stanoví specifita substrátu tak, že se RNA-substráty inkubují s interními poly(A) řezy, následovanými plasmidem kodovanými RNA-sekvencemi stoupající délky s frakcemi poly(A)-sefarozy v in-vitro deadenylačním testu. Bylo zjištěno, že RNA-substráty L3 (A_{30}) X_{15} , L3 (A_{30}) X_{49} a L3 (A_{30}) X_{164} jsou vůči odbourání zcela rezistentní v protikladu k RNA-substrátu L3 (A_{30}) (viz obrázek 3). Z toho vyplývá, že RNA-zbytky z adenosinových zbytků jsou výhodným substrátem a že pouze 3'-koncové lokalizované poly(A)-zbytky se efektivně odbourávají.

P ř í k l a d 15

Stanovení uvolněných mononukleotidů

Uvolněné mononukleotidické reakční produkty se stanoví pomocí 2-D TLC. K tomu se v in-vitro deadenylačním testu inkubuje poly(A)-sefarozová frakce spolu s RNA-substrátem L3 (A_{30}), který byl v průběhu in-vitro transkripce značkován pomocí [$\alpha^{32}P$]AMP. Po 20 minutách se reakční produkty analyzují pomocí 2-D TLC za použití neznačkových 2'-AMP, 3'-AMP a 5'-AMP jako markery. Z výsledku (viz obrázek 4) vyplývá, že 5'-AMP v průběhu in-vitro deadenylační reakce uvolňuje enzym.

P ř í k l a d 16

Kinetika nukleázové aktivity

Ke zjištění, zda se nukleázová aktivita RNA-substrátů odbourává procesivním nebo distributivním z působem, stanoví se nejprve kinetika deadenylační reakce in-vitro v přítomnosti 0,5 μ l poly(A)-sefarozyové frakce a x fmol L3 (A_{30}) RNA-substrátu, cele značených. Obrázek 5 ukazuje, že se akumuluje zcela odbouraná RNA dříve než než reaguje veškerý RNA-substrát. Důsledkem toho je, že deadenylační reakce je za těchto podmínek po 20 minutách zcela dokončena. V další reakci se po dobu 20 minut inkubuje v přítomnosti stoupajícího množství poly(A). Obrázek 5B ukazuje, že přísada poly(A) reakci inhibuje a že při nejvyšších měřených koncentracích přidané poly(A) byly přítomné jak nedeadenylované tak i plně deadenylované RNA-substráty. Při třetím pokusu se změnilo množství nukleázové aktivity. Inkubační doba činí 20 minut. Obrázek 5C ukazuje, že jak nedeadenylované tak i deadenylované RNA-substráty jsou přítomny dokonce i při nejmenších množstvích přidané nukleázové aktivity. Z toho vyplývá, že exonukleázová aktivita je vysoce procesivní, to znamená, že enzym nedisociuje ze substrátu, dokud není adenosinový konec zcela odbourán.

P ř í k l a d 17

Experiment zpětného sestavení (Obrázek 6)

Experimenty zpětného sestavení se provedou podle Dayle a spol (supra) s tím rozdílem, že zpětné sestavení se provádí na gelu přes noc při teplotě 4 °C. Pro tyto experimenty se použijí aktivní frakce z chromatografie poly(A)-sefarozy (příklad 3).

upravené

PV 2000-4895

91/11

JINÉ PRÁVNÍ
6000
120 00 PRÁVNÍ

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob získávání poly(A)-specifické 3'-exonukleázové aktivity, zahrnující následující kroky :

- a) výroba surového extraktu ze zvířecích nebo lidských buněk
 - b) srážení proteinu ze surového extraktu, který se získá z kroku a), s výhodou síranem amonným
 - c) chromatografie precipitátu získaného z kroku b) na slabě bázičném aniontoměniči, obzvláště na DEAE
 - d) afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku c) na heparinu
 - e) chromatografie aktivní frakce z kroku d) na silně bázičném aniontoměniči, obzvláště na Mono-Q
 - f) afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku e) na barvivu, obzvláště na modrém barvivu, především na Blue-Sepharose
 - g) poly(A)-afinitní chromatografie aktivní frakce z kroku f)
 - h) chromatografie aktivní frakce z kroku g) na bázičném aniontoměniči, s výhodou na silně bázičném aniontoměniči, obzvláště na Mono-Q a případně
 - i) gelová filtrace aktivní frakce z kroku g)
- nebo
- j) dvojnásobná afinitní chromatografie aktivních frakcí z kroku (f) především na ssDNA agarose s následnou 5'-AMP chromatografií.

2. Způsob podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zvířecí nebo lidské buňky jsou buňky brzlíku.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že srážení síranem
amonným podle kroku (b) se provádí při asi 45 % nasycení.
4. Způsob podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že před uvedeným srážení
síranem amonným se provede srážení síranem amonným při
asi 25 % nasycení.
5. Způsob podle některého nároku 1 až 4,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při
chromatografii podle kroku (c) se eluuje při asi 0,17 M
soli.
6. Způsob podle některého nároku 1 až 5,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při
chromatografii podle kroku (d) se eluuje při asi 1,0 M soli.
7. Způsob podle některého nároku 1 až 6,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při
chromatografii podle kroku (e) se eluuje při asi 10 %-ním
1,0 M soli.
8. Způsob podle některého nároku 1 až 7,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při
chromatografii podle kroku (f) se eluuje při asi 1,0 M soli.
9. Způsob podle některého nároku 1 až 8,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při
chromatografii podle kroku (g) se eluuje při asi 0,35-0,55
M soli.

10. Způsob podle některého nároku 1 až 8,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při chromatografii podle kroku (j) se eluuje při asi 2,0 M soli.
11. Způsob podle některého nároku 1 až 9,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní frakce při chromatografii podle kroku (h) se eluuje při asi 0,17 M soli.
12. Přípravek obsahující poly(A)-specifickou 3'-exonukleázovou aktivitu, která se získá způsobem podle nároků 1 až 11.
13. Přípravek podle nároku 12,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že jmenovaná aktivita má za podmínek denaturace molekulovou hmotnost asi 50 kDa.
14. Přípravek podle nároku 12 nebo 13,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že jmenovaná aktivita má za přirozených podmínek molekulovou hmotnost asi 180-220 kDa.
15. Způsob deadenylace nukleových kyselin,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se deadenylační reakce provádí v přítomnosti přípravku podle některého z nároků 12-14.
16. Způsob podle nároku 15,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že deadenylační reakce odbourává 3'-poly(A)-zbytky s výhodou mRNA.
17. Způsob podle nároku 15 nebo 16,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že deadenylační reakce probíhá navíc v přítomnosti jednomocných kationtů, obzvláště draslíku, s výhodou při pH asi 7.

18. Protilátky proti přípravku podle některého z nároků 12-14.

19. Způsob výroby protilátky podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se savec imunizuje přípravkem podle některého z nároků 12 až 14 a případně vzniklé protilátky se izolují.

20. Léčivo obsahující přípravek podle některého z nároků 12 až 14 a případně farmaceuticky přijatelné přísady a/nebo pomocné látky.

21. Způsob výroby léčiva k ošetřování rakoviny, autoimunitních nemocí, obzvláště Multiple Sklerose nebo Rheumatoide Arthritis, Alzheimerovy nemoci, alergií, obzvláště neurodermitis, alergií typu I nebo IV,, arthrosy, atherosklerosy, osteoporesy, akutních a chronických infekčních onemocnění a/nebo diabetes a/nebo k ovlivnění buněčného metabolismu, obzvláště při imunosupresi, především při transplantacích, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se formuluje přípravek podle některého z nároků 12 až 14 s farmaceuticky akceptovatelnými přísadami a/nebo pomocnými látkami.

22. Diagnostikum obsahující přípravek podle některého z nároků 12 až 14 nebo protilátky podle nároku 18 a případně vhodné přísady a/nebo pomocné látky.

23. Způsob výroby diagnostika k diagnóze rakoviny, autoimunitních nemocí, obzvláště Multiple Sklerose nebo Rheumatoide Arthritis, Alzheimerovy nemoci, alergií, obzvláště neurodermitis, alergií typu I nebo IV,, arthrosy, atherosklerosy, osteoporesy, akutních a chronických infekčních onemocnění

ní a/nebo diabetes a/nebo k analýze buněčného metabolismu, obzvláště imunostatu, především při transplantacích, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přípravek podle některého z nároků 12 až 14 nebo protilátky podle nároku 18 smísí s farmaceuticky akceptovatelnými nosiči.

24. Test k identifikaci funkčních interaktorů obsahující přípravek podle některého z nároků 12 až 14 nebo protilátky podle nároku 18 a případně vhodné přísady a/nebo pomocné látky.

25. Použití přípravku podle některého z nároků 12 až 14 nebo protilátky podle nároku 18 k identifikaci funkčních interaktorů.

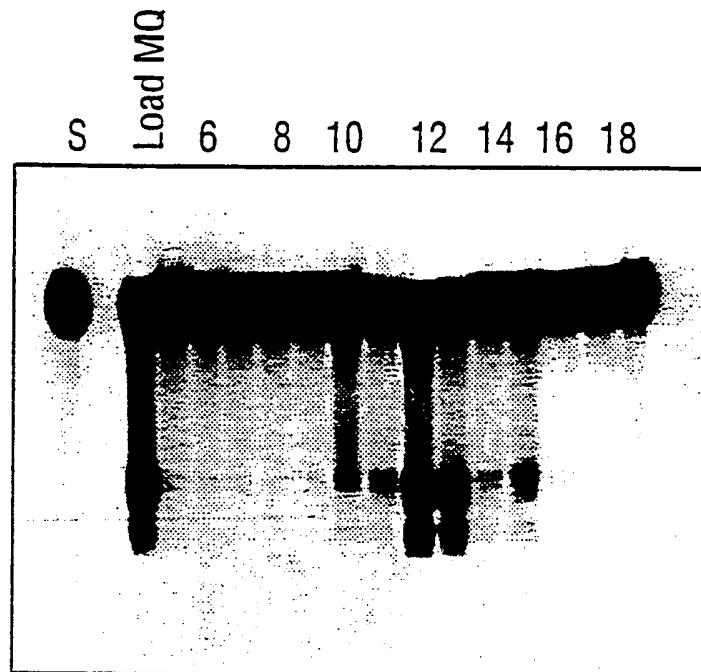
27.12.00

1/6

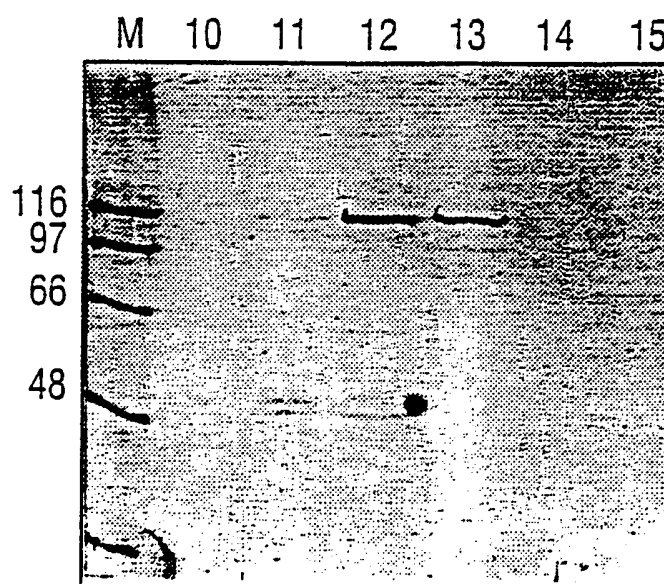
PV 2000-4895

91544

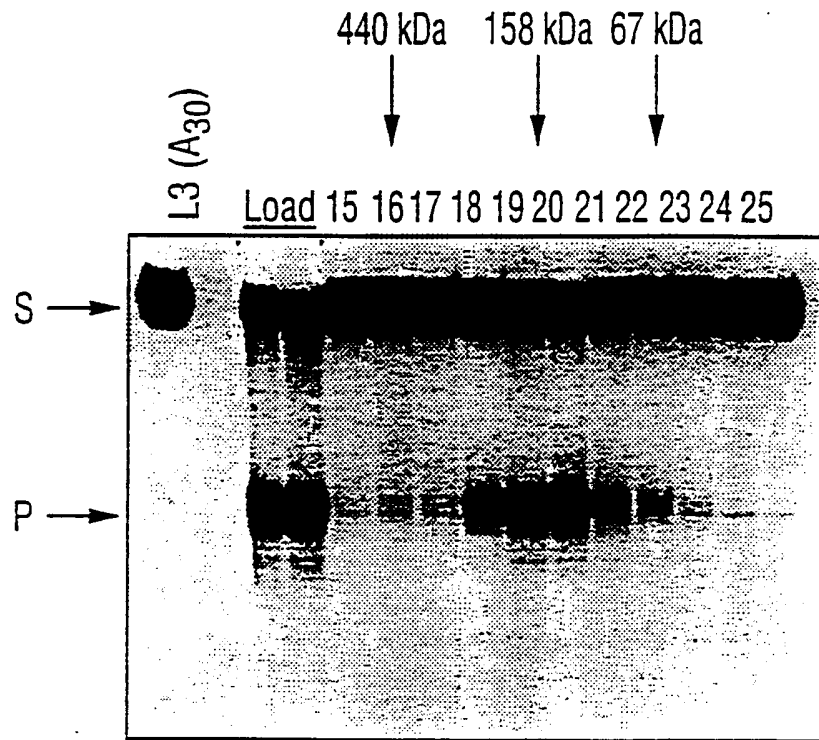
obr. 1a



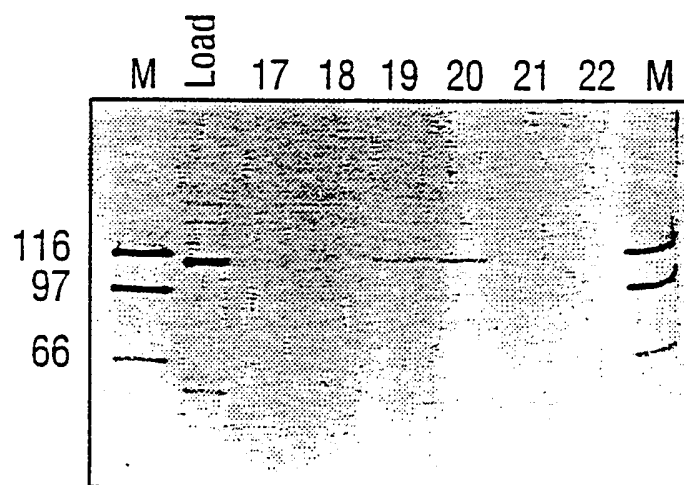
obr. 1b

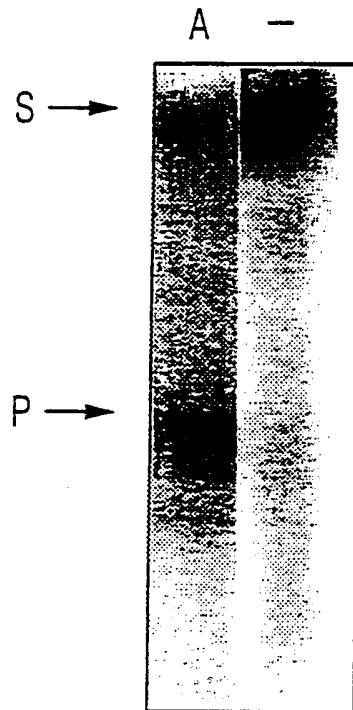
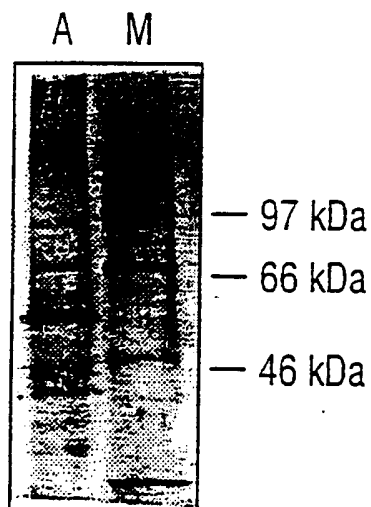


obr. 2a



obr. 2b

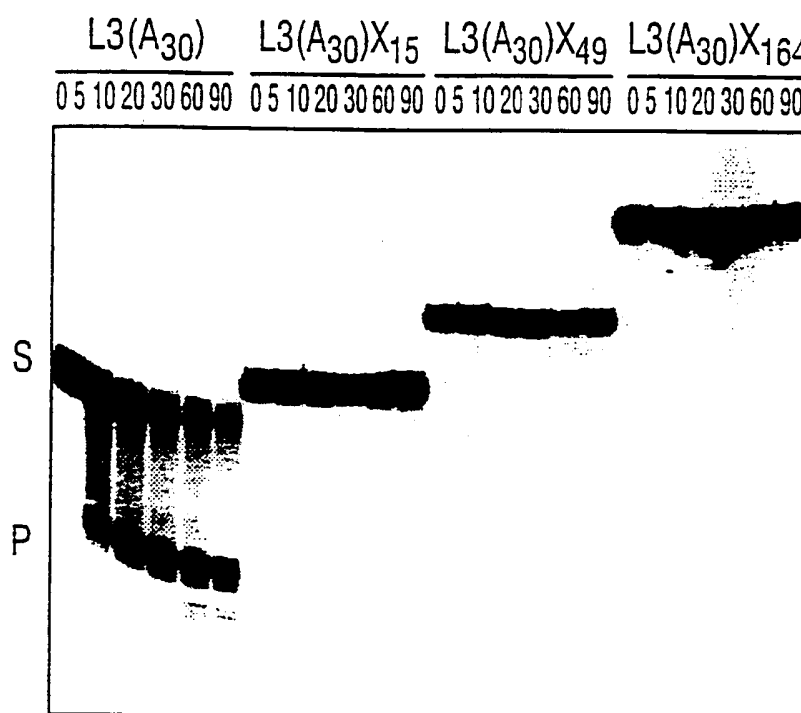


obr. 2c**obr. 2d**

27.12.00

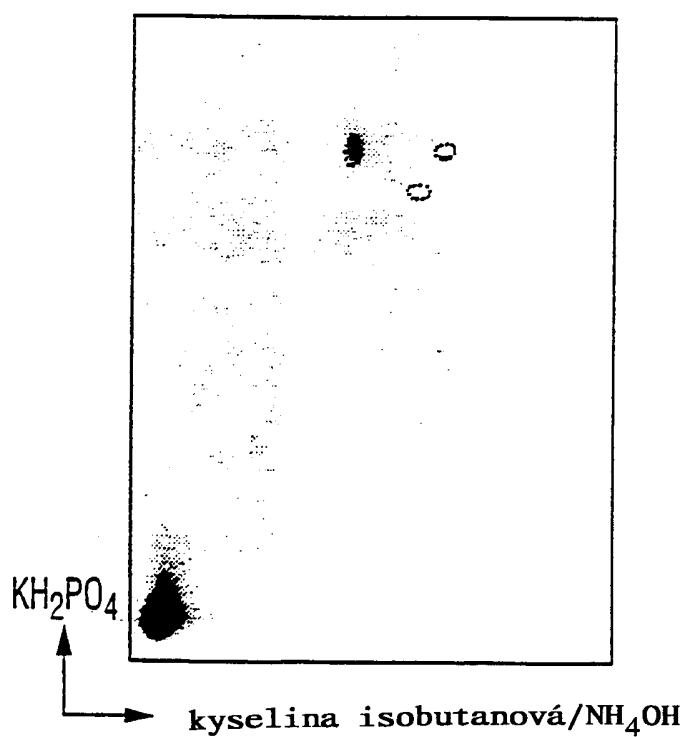
obr. 3

4 / 6



obr. 4

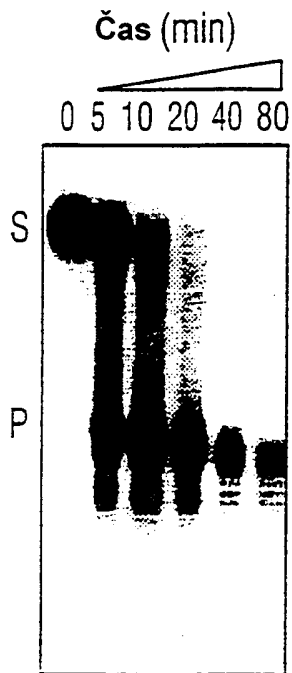
Poly(A)-sefarožová frakce



27.12.00

5 / 6

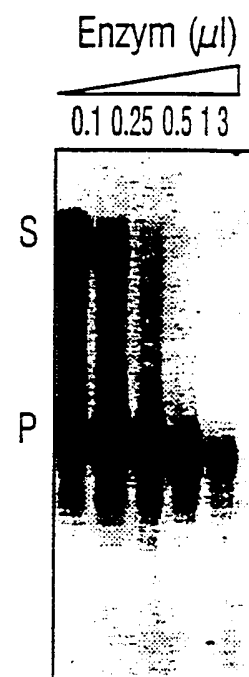
obr.5a



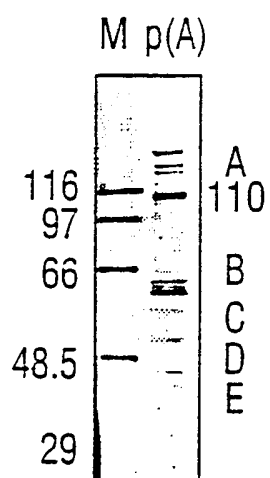
obr.5b



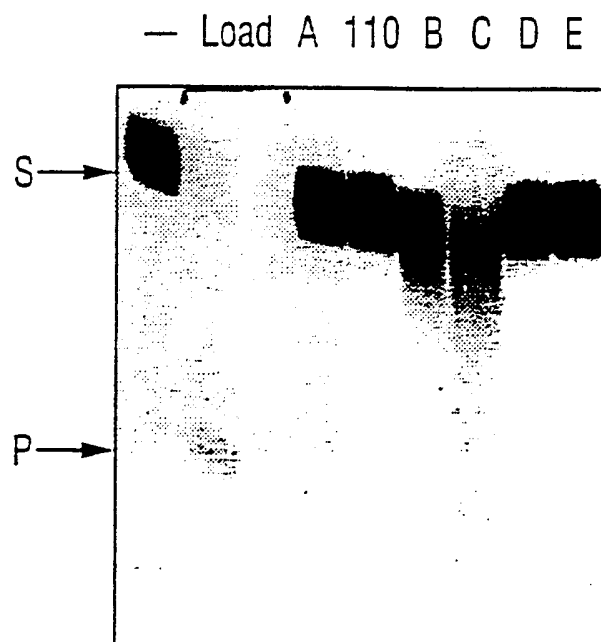
obr. 5c



obr. 6a



obr. 6b



obr. 7

