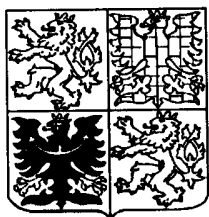


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 23.04.92

(32) 23.04.92, 23.04.91, 26.07.91

(31) 92US/9203376, 91/690199, 91/736559

(33) WO, US, US

(40) 17.08.94

(21) 2237-93

(13) A3

5(51)

C 12 N 5/10

C 12 N 15/00

C 12 N 15/09

C 12 N 15/11

C 12 N 15/12

A 61 K 37/02

(71) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., Tarrytown,
New York, US;

(72) Squinto Stephen P., Irvington, New York, US;
Glass David, New York, New York, US;
Aldrich Thomas H., New York, New York, US;
DiStephano Peter, Carmel, New York, US;
Stitt Trevor, Huntington Station, New York, US;
Furth Mark E., Pelham, New York, US;
Yancopoulos George D., Briarcliff Manor, New York, US;
Maisonpierre Peter C., Croton, New York, US;
Masiakowski Piotr, Stamford, Connecticut, US;
Ip Nancy, Stamford, Connecticut, US;

(54) **Způsob detekce a měření aktivity neurotrofinů,
způsob klonování genu pro receptor
tyrosinkinázy a rekombinantní molekula
nukleové kyseliny její buňka, mikroorganismus
a bílkovina**

(57) Způsob detekce a měření účinnosti neurotrofinu nebo pro
identifikaci látek, které mají účinnost, podobnou účinnosti
neurotrofinu. Postup je založen na zjištění, že protoonkogen
trkB je kódem pro receptor tyrosinkinázy, který může slou-
žit pro funkční vazbu BDNF a NT-3. Diagnostické a léčeb-
né metody jsou založeny na interakci mezi BDNF a/nebo
NT-3 a trkB, popřípadě na interakci s dalšími receptorový-
mi molekulami.

2237-93

Způsob detekce a měření účinnosti neurotrofinu, způsob klonování genu pro receptor tyrosinkinázy a rekombinantní molekula nukleové kyseliny její buňka, mikroorganismus a bílkovina

1. Oblast techniky

Vynález se týká způsobu detekce a měření účinnosti neurotrofinu nebo identifikace látek s účinností, podobnou účinnosti neurotrofinu. Vynález je založen na zjištění, že protoonkogen *trkB* je kódem pro receptor tyrosinkinázy, který může sloužit jako funkční vazná bílkovina pro BDNF a NT-3. Vynález se rovněž týká diagnostických a léčebných metod, založených na interakci mezi BDNF a/nebo NT-3 a *trkB* a celé řady receptorových molekul.

2. Dosavadní stav techniky

Vývoj a udržování nervového systému obratlovců závisí na specifických bílkovinách, označovaných jako neurotrofinní faktory a původně definovaných schopností podporovat přežívání populací neuronů podle Snider a Johnson, 1989, Ann. Neurol., 26, 489. Neurotrofinní faktory se rovněž účastní proliferace a diferenciace neuronů podle Cattaneo a McKay, 1990, Nature 347, 762 - 765 a Lindsay a Harmar, 1989, Nature 337, 362 - 364 a mimoto mohou mít ještě další, prozatím zcela neobjasněnou úlohu v nervovém systému i mimo něj. V případě neurotrofinního faktoru, odvozeného od mozkové tkáně (BDNF) a neurotrofinu-3 (NT-3) bylo v poslední době provedeno molekulární klonování a bylo prokázáno, že tyto látky jsou strukturně příbuzné prototypu faktorů, podporujících přežívání buněk, faktoru růstu nervových buněk NGF, jak bylo popsáno v Leibrock a další, 1989, 341:149 - 152, Hohn a další, 1990, Nature 344, 339 - 341, Maisonpierre a další, 1990, Science 247, 1446 - 1451, Rosenthal a další, 1990, Neuron 4, 767 - 773, Ernfors a další, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 5454 - 5458,

Jones a Reichardt, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 8060 - 8064. Tyto tři příbuzné faktory, označované jako "neurotrofiny" nemají žádnou strukturní homologii se čtvrtým neurotrofním faktorem, ciliárním neurotrofním faktorem CNTF, jak bylo popsáno v Lin a další, 1989, Science, 246, 1023 - 1025, Stockli a další, 1989, Nature 342, 920 - 923.

Přenos cestou receptoru nebo přenosy signálů v případě NGF byl velmi podrobně studován, převážně vzhledem k dostupnosti buněčné linie pheochromocyтому PC12, u níž dochází při reakci na NGF k diferenciaci podle Greene a Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73, 2424. Tyto studie vedly ke klonování transmembránové bílkoviny, označované LNGFR pro svou nízkou afinitu receptoru NGF, tato bílkovina váže NGF s poměrně nízkou aktivitou, jak bylo popsáno v Chao a další 1986, Science 232, 518 - 521, Radeke a další, 1987, Nature 325, 593 - 597. Kromě LNGFR je zřejmě zapotřebí ještě další bílkovina, označovaná jako HNGFR pro svou vysokou afinitu k receptoru NGF, tato bílkovina se účastní tvorby místa s vyšší afinitou pro vazbu NGF a je nutná k zahájení přenosu signálu, vyvolaného působením NGF, jak bylo popsáno v Zimmerman a další, 1978, J. Supramol. Struc., 9, 351 - 361, Sutter a další, 1979, Transmembrane Signalling, N. Y. Alan Liss, str. 659 - 667, Bernd a Greene, 1984, J. Bio. Chem. 259, 15509 - 15516, Hempstead a další, 1989, Science 243, 373 - 375. Tato látka, HNGFR, je fosforylována na tyrosinu v důsledku působení NGF a zjevně obsahuje vnitřní tyrosinkinázovou účinnost podle Meakin a Shooter, 1991, Neuron 6, 153 - 163. Mimoto zprostředkovávají kinázy ERK, uváděné také jako kinázy MAP2, které jsou časnými meziprodukty v kaskádách signálu, aktivovaných tyrosinkinázou fosforylaci tyrosinu jako odpověď na působení NGF. To znamená, že stejně jako v případě odpovědi na další růstové faktory může být přenos signálu NGF zahájen aktivací tyrosinkinázy, vázané na receptor.

Studie z poslední doby prokázaly, že produkt proto-onkogenu *trk*, napodobující receptor růstového faktoru (to znamená, že jde o transmembránovou bílkovinu, obsahující intracytoplasmatickou oblast tyrosinkinázy), pro nějž nebyla identifikována žádná vazná molekula, je rychle fosforylován v důsledku působení NGF na buňky PC12, jak bylo popsáno v Kaplan a další, 1991, *Nature*, 350, 156 - 160, Klein a další, 1991, *Cell* 65, 189 - 197 a mimoto dochází k přímé vazbě NGF s poměrně vysokou afinitou v případě exprese v heterologních buňkách, jak bylo rovněž popsáno ve svrchu uvedené publikaci Kleina a dalších. Toto zjištění spolu s omezenou neuronovou distribucí bílkoviny *trk* v živém organismu napovídá, že *trk* může být složkou HNGFR, zodpovědnou za zahájení přenosu signálu NGF.

Na rozdíl k široce rozpracovaným studiím receptorů pro NGF a prostudovaným cestám pro přenos signálů byly receptory a cesty přenosu signálu v případě ostatních neurotrofních faktorů ještě nedostatečně objasněny a studie se zahajují až v poslední době. Avšak zdá se, že se BDNF váže na LNGFR s afinitou, podobnou afinitě NGF podle publikace Rodriguez-Tebar a další, 1990, *Neuron* 4, 487 - 492. Přesto že na neuronech, odpovídajících na působení BDNF se necházejí receptory s nízkou i s vysokou aktivitou, je možno předpokládat podle dosažených výsledků, že BDNF a NGF působí na odlišné neurony, přičemž u neuronů, reagujících na působení NGF nedochází k expresi receptorů s vysokou afinitou pro BDNF, takže BDNF patrně využívá odlišný receptor s vysokou afinitou než NGF podle Rodrigues-Tebar a Barde, 1988, *J. Neurosc.* 8, 3337 - 3342.

Řada výsledků podporuje příbuznost působení BDNF a NT-3 a současně oba tyto neurotrofiny odlišuje od NGF. NT-3 a BDNF avšak nikoliv NGF, jsou faktory, u nichž při expresi dochází

v průběhu vývoje k nápadnému recopročinnému působení, přičemž k expresi NT-3 dochází ve větší míře v časném stadiu a k převážné expresi BDNF dochází v pozdějším stadiu vývoje těchto oblastí mozku podle Maisonpierre a další, 1990, Neuron 5, 501 - 509. Je zajímavé, že profily distribuce pro BDNF a NT-3, avšak nikoliv pro NGF jsou v různých oblastech dospělého mozku velmi podobné. V periferních gangliích mají BDNF a NT-3, avšak nikoliv NGF hlavní účinek na ganglia dorsálních kořenů a na nodosní ganglia, přesto, že NT-3 má zřejmě poněkud menší účinek na ganglia sympatiku podle Maisonpierre a další, 1990, Science 247, 1446 - 1451. Naproti tomu NGF převážně působí na ganglia dorsálních kořenů a na ganglia sympatiku.

Tyto skutečnosti vedly k názoru, že BDNF a NT-3 by v některých případech mohly působit na stejné skupiny neuronů a že působením NT-3 na tyto neurony v časném stadiu by mohlo později být nahrazeno účinkem BDNF podle Maisonpierre a další, 1990b, Neurons 5, 501 - 509. Mimoto zjištění, že BDNF a NT-3 jsou na rozdíl od NGF vysoce konzervované růstové faktory, dokonce až dosud nejkonzervovanější popsané faktory vede k názoru, že by oba tyto faktory mohly spolupůsobit s různými receptory a že jejich konzervace byla nutná právě z toho důvodu, aby bylo možno udržet specifičnost jejich působení na tyto různé receptory.

Klein a další, 1989, EMBO J., 8, 3701 - 3709 popsali izolaci trkB, který je kódem pro novou sloučeninu ze skupiny látek, obsahujících tyrosinkinázu a receptorů, velmi příbuzných lidskému protoonkogenu trk. Na úrovni aminokyselin bylo prokázáno, že trk a trkB mají 57% homologii extracelulárních oblastí, a to včetně 9 z 11 cysteinových zbytků, přítomných v trk. Tato homologie je zvýšena na 83 % v oblasti pro katalytickou tyrosinkinázu. Bylo prokázáno, že k expresi trkB u

dospělých myší dochází přednostně v mozkové tkáni, přestože poměrně vysokou hladinu RNA pro *trkB* je možno prokázat také v plicích, svaích a vaječnících. Mimoto bylo možno prokázat transkripty *trkB* u embryí ve středním a pozdním období gestace. Při analýze hybridizace *in situ* u myších embryí ve stáří 14 a 18 dnů bylo prokázáno, že transkripty *trkB* byly lokalizovány v centrálním i periferním nervovém systému včetně mozku, míchy, míšních i mozkových ganglií, paravertebrálním řetězcem sympatického nervového systému a také v různých dráhách pro nervové zásobení, takže je možno, že produktem genu *trkB* může být receptor, který se účastní neurogenese a časného nervového vývoje a mimoto může hrát úlohu také v nervovém systému dospělých.

Klein a další, 1990, *Cell* 61, 647 - 656 uvádějí, že *trkB* myši je kódem pro alespoň dvě skupiny molekul, které jsou podobné receptorům a které byly označeny $gp145^{trkB}$ a $gp95^{trkB}$. Tyto molekuly mají patrně identické mimobuněčné a transmembránové oblasti, avšak pouze v případě $gp145^{trkB}$ byla prokázána dlouhá cytoplasmatická oblast, která zahrnuje katalytickou oblast kinázy bílkovin. Transkripty *trkB*, které jsou kódem pro tuto bílkovinu, bylo možno prokázat v mozkové kůře a ve vrstvě pyramidových buněk v hippokampu, kdežto transkripty, které jsou kódem pro $gp95^{trkB}$ bylo možno prokázat v endymové vrstvě, vystýlající mozkové komory a v plexus choroides. Mimoto se v publikaci Middlemas a další, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11, 143 - 153 popisuje existence dvou od sebe odlišných, na C-zakončení zkrácených receptorů se společnou extracelulární oblastí a transmembránovou oblastí $gp145^{trkB}$, obě látky jsou však odlišné od $gp145^{trkB}$ (tato látka byla až dosud jednoduše označována jako *trkB*), pokud jde o krátká cytoplasmatická zakončení.

3. Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob detekce a měření účinnosti neurotrofinu nebo identifikace látek s účinností, podobnou účinnosti neurotrofinu a také systémy, jichž je možno pro tato stanovení použít. Způsob podle vynálezu je alespoň z části založen na zjištění, že protoonkogen *trkB* je kódem pro receptor tyrosinkinázy, který může sloužit jako funkční vazná bílkovina pro BDNF a pro NT-3. Systém tohoto typu může mít svou zvláštní hodnotu při identifikaci nových látek ze skupiny neurotrofinů nebo látek s účinností, podobnou účinnosti neurotrofinů. V různých provedeních je možno použít metody podle vynálezu a odpovídající systémy k detekci a/nebo k měření vazby neurotrofinu na bílkovinu *trkB* při použití přímého studia vazby nebo při detekci sekundárních účinků vazby *trkB* na neurotrofin.

Podstatu vynálezu tvoří také systémy, které je možno užít při stanovení předem známých látek a také k průkazu nových látek, které mohou působit na receptor tyrosinkinázy. V některých případech bude patrně možno tento systém využít k průkazu nových, dosud neznámých receptorů, které mohou zprostředkovat odpověď na již známé faktory. Vynález je alespoň z části založen na zjištění, že protoonkogen *trkB* je kódem pro receptor tyrosinkinázy, který je schopen nejen zprostředkovat přežívání a diferenciaci neuronů, závislých na BDNF/NT-3, nýbrž je schopen také kromě přežívání a diferenciaci, nikoliv však prolyferace neuronových buněk, v nichž k jeho expresi dochází způsobit také přežívání a prolyferaci buněk, závislých na BDNF/NT-3 v případě, že k jeho stálé expresi dochází ve zvláštním klonu buněčné linie fibroblastů, označované NIH3T3.

Znamená to, že exprese receptoru tyrosinkinázy ve fibroblastech může umožnit použití těchto buněk při zkouškách

na přežívání a proliferaci, a to jak v případě známých látek, například neurotrofinů, tak při objevování nových sloučenin, které se rovněž mohou vázat na tento receptor tyrosinkinázy nebo na jiné receptory tyrosinkinázy, pro něž až dosud neexistuje žádná známá vazná látka. Tyto systémy je možno použít i společně se systémy receptor/vazná látka (například receptory trk a neurotrofiny), které nemusí za běžných podmínek zprostředkovávat buněčnou proliferaci. Jakmile dojde k tomu, že určitý systém receptor/vazná látka je definován, tak jako tomu je v případě trkB a BDNF/NT-3, je možno využít také celou řadu dalších specifických pokusných systémů.

Vynález se dále týká celé řady samostatných molekul, podobných receptoru tyrosinkinázy včetně pěti molekul, které jsou homologní receptoru trk a látkám ze skupiny insulinových receptorů a dalších čtyř molekul, které jsou homologní CSF1R/PDGFR, rec, eck (alfa) a eck (beta). Vynález se rovněž týká způsobu identifikace receptorových molekul, přičemž může jít o molekuly s dosud neznámou vaznou látkou stejně jako o další typy receptorů, které je možno identifikovat uvedeným způsobem.

Vynález je možno využít k diagnostickým i k léčebným účelům. Ve zvláštních provedeních je možno využít nepravidelností ve funkci trkB nebo exprese této látky při diagnose různých neurologických poruch. V dalších provedeních je možno využít manipulací interakce mezi trkB a neurotrofinu pro léčení různých neurologických onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a amyotrofická laterální sklerosa (Lou Gehrigova nemoc).

3.1. Použité zkratky

BDNF	neurotrofní faktor z mozkové tkáně
BSA	sérový albumin skotu
CNTF	ciliární neurotrofní faktor
DSS	disukcinimidylsüberát
HNGFR	receptor s vysokou afinitou pro faktor nervového růstu
LNGFR	receptor s nízkou afinitou pro faktor nervového růstu
HGF	faktor růstu nervů
NT-3	neurotrofin-3,
pCMX-LNGFR	pCMX-vektor pro expresi receptoru s nízkou afinitou pro faktor nervového růstu
p-CMK-trkB	pCMX-vektor pro expresi, modifikovaný pro expresi úplné cDNA pro trkB krysy
pCMX-trkB(Δel)	modifikovaná forma pCMX-trkB, upravená pro expresi zkrácené formy trkB, v níž chybí většina oblasti pro intracytoplasmatickou tyrosinkinázu.
pT24-ras	plasmid, obsahující mutovanou (aktivovanou) verzi onkogenu ras.

4. Popis výkresů

Obr. 1: všechny tři neurotrofiny jsou schopny se specificky zkříženě vázat na LNGFR, ke jehož expresi dochází v buňkách COS.

A. Žádný z neurotrofinů nevykazuje kompetitivní zkříženou vazbu na buňky COS po transfekci kontrolním vektorem, p-CMK. Radioaktivně značená vazná látka, využitá pro každou dvojici drah je označena na vrcholu dráhy (každá radioaktivně značená vazná látka má koncentraci v rozmezí 0,1 až 0,25 nM), "-" znamená nepřítomnost a "+" znamená přítomnost neznáčené homologní vazné látky v koncentraci 500 nM. Prokazatelné pásy, které je možno pozorovat v případě použití radioaktivně značeného NGF se měnily od pokusu k pokusu a nebyly v kompetici s neznáčeným NGF, jak již bylo uvedeno.

B. Všechny tři radioaktivně značené neurotrofiny mají kompetitivní schopnost zkřížené vazby (za vzniku komplexu s molekulovou hmotností přibližně 100 000, jak je možno očekávat pro LNGFR) v buňkách COS po transfekci pCMK-LNGFR. Dráhy jsou označeny stejně jako v případě A.

C. Zesíťené látky v buňkách COS po transfekci pomocí pCMK-LNGFR se pohybují společně se zesíťenými vaznými látkami v buňkách lidského melanomu A875. Radioaktivně značená vazná látka byla v tomto případě BDNF, použité buňky pro zesíťení jsou uvedeny na horní části každé dvojice drah a označení "-" a "+" je stejné jako v případě A.

Obr. 2: Indukce růstu neuritů a časné exprese genů v buňkách PC12 jako reakce na NGF, avšak nikoliv na BDNF nebo NT-3.

A. Buňky PC12 byly pěstovány podle doporučení Greene a další, 1987, Methods Enzymol. 147, 207 - 216 v přítomnosti 100 ng/ml BSA, NT-3, BDNF nebo NGF, jak je vyznačeno. Byly užity různé koncentrace neurotrofinů, znázorněny jsou koncentrace, které pro NGF patrně znamenají nasycení.

B. Transkripty fos a jun o 2,2 a 2,7 kb byly identifikovány analýzou Northern blot celkové buněčné RNA z buněk PC12, pěstovaných jako svrchu v nepřítomnosti exogenního neurotrofního faktoru, pak byly buňky podrobeny na 30 minut působení 100 ng/ml BSA, NR-3, BDNF nebo NGF, jak je uvedeno.

Obr. 3: BDNF a NT-3, avšak nikoliv NGF se specificky váže na trkB po jeho expresi v buňkách COS.

A. Buňky COS byly podrobeny transfekci při použití pCMX-trkB a chemicky zesítěny při použití každého ze tří radioaktivně značených neurotrofinů. Radioaktivně značená vazná látka, užitá pro každou dvojici drah je uvedena v horní části drah, každá z nich byla užitá v koncentraci v rozmezí 0,1 až 0,25 nM. "-" znamená nepřítomnost, "+" znamená přítomnost neznačené homologní vazné látky v koncentraci 500 nM. Závorka a hvězdička označují zesítěnou látku, odpovídající bílkovině trkB s molekulovou hmotností přibližně 160 000 až 180 000.

B. Zesíťení v případě radioaktivně značeného NT-3 v nepřítomnosti ("-") nebo v přítomnosti ("+") neznačeného NT-3 v koncentraci 500 nM, buňky COS byly užity po transfekci vektorem pro expresi zkrácené formy trkB, pCMX-trkB(del), již chybí oblast pro tyrosinkinázu. Závorka a hvězdička označují zesítěnou látku, která odpovídá zkrácené verzi trkB, tato mutanta s vypuštěním části řetězce má molekulovou hmotnost 120 000 až 150 000.

Obr. 4: Zesíťení a vazba ^{125}I -NT-3 na LNGFR je specificky blokována všemi třemi neurotrofiny, kdežto zesíťení a vazba NT-3 na trkB je specificky blokována pouze působením BDNF a NT-3.

A. Buňky COS byly podrobeny transfekci působením pCMX-LNGFR a zesíťeny radioaktivně značeným NT-3 v koncentraci 0,1 až 0,25 nM. Neznačený neurotrofin, užitý jako kompetitivní látka je uveden v horní části každé trojice drah, před drahou je uvedena koncentrace v nM.

B. Buňky COS byly podrobeny transfekci pCMX-trkB a zesíťeny působením radioaktivně značeného NT-3. Koncentrace vazné látky a označení drah bylo stejné jako v případě A.

C. Buňky COS byly podrobeny transfekci při použití pCMX-LNGFR při vazných pokusech s radioaktivně značeným NT-3 v koncentraci v rozmezí 0,1 až 0,25 nM, graficky je znázorněna kompetice při použití různých koncentrací neznačeného NT-3, BDNF a NGF.

D. Buňky COS byly podrobeny transfekci působením pCMX-trkB při vazných pokusech s radioaktivně značeným NT-3 v koncentraci v rozmezí 0,1 až 0,25 nM, graficky je znázorněna kompetice při použití různých koncentrací neznačeného NT-3, BDNF a NGF. uvedené údaje znamenají průměr ze dvou zkoušek a uvádějí procento vázané látky v impulsích za minutu.

Obr. 5: Diferenciace buněk PC-12 po transfekci pCMX-trkB v přítomnosti BDNF a NT-3.

A. Buňky PC12 po přechodné transfekci kontrolním plasmidem pT24-ras a po zpracování působením 100 ng/ml BSA, stanoven je počet buněk po přechodné transfekci v každém pokusu (podrobnosti budou dále uvedeny).

B, C, D a E. Buňky PC12 byly podrobeny přechodné transfekci pCMX-trkB a pak podrobeny působení 100 ng/ml NGF

(obráz. 5B), BSA (obráz. 5C), NT-3 (obráz. 5D) nebo BDNF (obráz. 5E). Čísla v závorkách na spodní straně každého obrázku označují počet buněk PC12, u nichž došlo k diferenciaci, to znamená buněk, jejichž neurity jsou alespoň dvakrát delší než je tělo buňky, pozorováno ve vyhloubení s průměrem 35 mm po každém zpracování. Přesto, že se absolutní počet buněk v průběhu tří provedených transfekcí měnil, poměr diferenciovaných buněk po různém zpracování zůstal ve všech třech nezávislých pokusech stálý. Žádné diferenciované buňky nebylo možno prokázat u buněk PC12 po transfekci pCMV-trkB po působení BSA ve třech oddělených pokusech. Po otevření pórů působením elektrického proudu byly buňky přímo nanесeny na plotny z plastické hmoty bez povlaku tak, aby bylo možno vyloučit jakýkoliv růst neuritů tak, jak bude dále popsáno.

Obr. 6: Buňky lidského neuroblastomu SH-SY5Y reagují na NGF a BDNF, avšak nikoliv na NT-3 a nedochází u nich k expresi trkB.

A. Transkripty fos byly identifikovány analýzou Northern blot v celkové buněčné RNA, připravené z buněk DH-SY5Y, pěstovaných bez jakéhokoliv přidaného faktoru a pak byly podrobeny na 30 minut působení 100 ng/ml BSA, NGF, NT-3 nebo BDNF podle označení.

B. Transkripty trkB jsou identifikovány analýzou Northern blot při použití 10 mikrogramů celkové buněčné RNA z mozečku dospělých krys (označeno CB), avšak není možno je prokázat v 10 mikrogramech celkové buněčné RNA z buněk SH-SY5Y. Úplná kódová oblast trkB byla užita jako sonda, kterou je možno identifikovat větší počet transkriptů trkB podle Klein a další, 1989, EMBO J. 8, 3701 - 3709. Dráha pro mozeček se jeví jako nátěr vzhledem k příliš velké expozici ve snaze prokázat transkripty v buňkách SH-SY5Y.

Obr. 7: Expresce LNGFR a trkB v původních buňkách a v buňkách NIH3T3 po transfekci pLTR-trkB.

A. Bylo provedeno chemické zesíťení radioaktivně značeného NT-3 s buňkami COS po transfekci vektorem pro expresi LNGFR podle Squinto a další, 1991, Cell 65, 1 - 20, zesíťení s původními buňkami NIH3T3 je znázorněno v drahách 3 a 4 a s buňkami NIH3T3 po transfekci pLTR-trkB v drahách 5 a 6. "-" znamenají nepřítomnost a "+" přítomnost neznačeného NT-3 v koncentraci 500 nM. Zesíťený LNGFR a trkB jsou označeny závorkami a jejich vzhled je velmi podobný jako vzhled zesíťených materiálů podle Squinto a další, 1991, Cell 65, 1 - 20.

B. Analýza Northern blot exprese LNGFR v buňkách NIH3T3 u nichž dochází k expresi trkB, v původních buňkách NIH3T3, v buňkách PC12 a v buňkách SH-SY5Y. 10 mikrogramů celkové RNA, připravené z každé z uvedených buněčných linií bylo frakcionováno na formaldehydovém gelu s výjimkou dráhy, která je označena (PC12), v níž bylo 0,5 mikrogramů buněčné RNA buněk PC12 zředěno 10 mikrogramy RNA buněk NIH3T3. Pak byly buňky přeneseny na nylonovou membránu a hybridizovány při použití radioaktivně značených sond pro LNGFR (nahore) nebo pro trkB (dole).

Obr. 8 znázorňuje schema transfekce a selekce, které byly užity k získání a ke zkouškám s buňkami NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB. Buňky NIH3T3 byly podrobeny transfekci při použití 5 mikrogramů pLTR-trkB, 1 mikrogramu pLTR-Hyg a 20 mikrogramů lidské DNA jako nosiče, jak je popsáno v příkladové části. Stejně podíly buněk po transfekci byly naneseny na plotny s určitým prostředím, obsahující uvedené faktory v koncentraci 5 nM nebo byly buňky podrobeny selekci při použití prostředí, obsahujícího 10 % telecího séra a hygromycin. Buňky, odolné proti hygromycinu pak byly naneseny na

definovaná živná prostředí stejně jako svrchu. Jen malé množství kolonií bylo možno prokázat při přímé selekci na prostředích, doplněných BDNF nebo NT-3, spojitou vrstvu buněk bylo možno prokázat na obou těchto prostředích při použití buněk, odolných proti hygromycinu. V tabulce znamená "CONFL" vytvoření spojitě vrstvy buněk.

Obr. 9: Přežívání buněk NIH3T3 a téhož typu buněk, u něhož dochází k expresi trkB na prostředích, doplněných bFGF nebo neurotrofiny.

A. Původní buňky (horní řada) nebo buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB (spodní řada), byly pěstovány až do vytvoření 20% spojitě vrstvy a pak udržovány na definovaných živných prostředích bez uvedených faktorů nebo v jejich přítomnosti v koncentraci 5 nM celkem 5 dnů.

B. Buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB byly udržovány při různých koncentracích BDNF, NT-3 nebo bFGF. "-" znamená téměř úplné uhynutí buněk, podobně jak k němu dochází u původních buněk NIH3T3 v nepřítomnosti faktorů na obr. 9A, "+++" označuje přežívání spojitě vrstvy buněk, odpovídající buňkám NIH3T3 v přítomnosti 5 nM bFGF na obr. 9A a "+" nebo "++" znamenají střední stupně přežívání.

Obr. 10: Příjem thymidinu a proliferace při zkouškách s fibroblasty, u nichž dochází k expresi trkB, jde o závislost, podobnou závislosti na dávce neurotrofinů u primárních neuronů.

A. Byla provedena zkouška na příjem thymidinu u fibroblastů NIH3T3 v závislosti na vyznačených koncentracích bFGF, NGF, BDNF a NT-3. Příjem thymidinu je vyjádřen v im-

pulsech za minutu v buňkách, odebraných z jednoho vyhloubení plotny obsahující 24 vyhloubení. Údaje o chybě nejsou vyznačeny při použití koncentrace 5 pM každé vazné látky vzhledem k tomu, že tyto zkoušky nebyly uskutečněny ve dvojím provedení.

B. Příjem thymidinu u fibroblastů NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB v přítomnosti uvedených koncentrací bFGF, NGF, BDNF a NT-3.

C. Byla sledována proliferace buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB v závislosti na různých koncentracích bFGF, BDNF a NT-3. Do každého vyhloubení bylo uloženo 5000 buněk, uvádí se konečný počet buněk ve vyhloubení.

D. Bylo sledováno přežívání primárních neuronů v disociované kultuře v závislosti na různých koncentracích BDNF způsobem podle publikace Lindsay a Rohrer, 1985, Dev. Biol., 112 : 30 - 48. Neurony byly izolovány z ganglia dorsálních kořenů kuřecích embryí ve stáří 9 dnů.

Obr. 11: Rychlá indukce fosforylace tyrosinu u fibroblastů, u nichž dochází k expresi trkB v přítomnosti BDNF a NT-3.

A. Fosforylace tyrosinu v bílkovině o molekulové hmotnosti 145 000, která je patrně trkB a je označena šipkou, je rychle vyvolána u buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB po stimulaci působením BDNF nebo NT-3. Byla provedena imunoprecipitace rozrušených celých buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB a které byly vystaveny působením uvedených faktorů po dobu 5 minut. Imunoprecipitace byla uskutečněna při použití antifosfotyrosinové monoklonální protilátky, konjugované na agarosové kuličky po frakcionaci elek-

troforésou za akrylamidovém gelu s následným provedením imunoblotové zkoušky s použitím monoklonální protilátky, specifické pro fosfotyrosin.

B. Fosforylace tyrosinu v bílkovině o molekulové hmotnosti 41 000, která je patrně ERK2, je možno rychle vyvolat působením bFGF na původní buňky NIH3T3 a působením bFGF, NT-3 a BDNF na buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB. Lyzáty celých buněk, a to původních buněk i buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, byly vystaveny působení uvedených faktorů po dobu 5 minut, pak frakcionovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a podrobeny imunoblotové zkoušce při použití monoklonální protilátky, specifické proti fosfotyrosinu.

Obr. 12:

A. Jsou uvedeny PCR-primery, užité k amplifikaci řetězců, homologní se známými molekulami tyrosinkinázy.

B. Je znázorněn řetězec aminokyselin pro novou klonovanou tyrosinkinázu.

C. Řetězec nukleových kyselin a aminokyselin pro klony tyrosinkinázy Rtk-1, Rtk-6, Rtk-7, Rtk-8 a Rtk-9, uvedeny jsou také zdroje cDNA a primery, užité v PCR-reakci a srovnání s homologními molekulami.

D. Srovnání řetězce Rtk-1 z cDNA krysy s řetězcem pro trkA a trkB.

E. Oblasti homologie tyrosinkinázy, tak jak byly identifikovány v publikaci Hanks a další, 1988, Science 241, 42 - 52.

Obr. 13:

A. Srovnání oblasti tyrosinkinázy receptorů trk a podskupiny insulinových receptorů.

B. Řetězce nukleových kyselin a aminokyselin pro Rtk-2, Rtk-3, Rtk-4 a Rtk-5.

C. Srovnání odvozených řetězců aminokyselin pro Rtk-2, Rtk-3, Rtk-4 a Rtk-5 s řetězcem lidského trk.

D. Srovnání odvozeného řetězce aminokyselin pro Rtk-2 s lidským trk, kryším trkB, receptorem pro růstový faktor, příbuzným receptorem insulinu a receptorem pro insulin.

Obr. 14: Je znázorněn nukleotidový řetězec a odvozený řetězec aminokyselin pro Rtk-2.

Obr. 15: Je znázorněn nukleotidový řetězec a řetězec aminokyselin pro Rtk-3.

Obr. 16: Jsou srovnány řetězce Rtk-3 s řetězcem pro Rtk-2, trk, trkB, receptorem pro růstový faktor, příbuzným receptorem pro insulin (IGF-R) a receptorem pro insulin (INS-R).

Obr. 17: Graficky je znázorněn účinek neurotrofinů NGF, BDNF a NT-3 na růst neuritů v gangliích dorsálních kořenů embrya krysy ve stáří 14 dnů. Koncentrace neurotrofinů se pohybovaly v rozmezí 0,05 pg/ml až 50 ng/ml, doba pěstování byla 24 hodin.

Obr. 18: Embryonální DRG byly pěstovány 24 hodin v přítomnosti 50 ng/ml NGF a pak byla sledována koncentrace mRNA

pro trkA a trkB. Jako kontrola byly odebrány DRG z krysy bez následného pěstování.

Obr. 19: Embryonální DRG byly pěstovány v přítomnosti BDNF 50 ng/ml nebo NT-3 50 ng/ml celkem 24 hodin, pak byla stanovena koncentrace mRNA pro trkA, B a C. Úroveň tohoto materiálu byla zkoumána také v mediodorsální a ventrální míše kryších embryí ve stáří 14 dnů.

5. Podrobný popis vynálezu

Pro větší jasnost je podrobný popis vynálezu rozdělen do následujících odstavců:

- i) systémy a metody k provádění zkoušek,
- ii) pokusné modelové systémy,
- iii) diagnostické metody,
- iv) léčebné metody,
- v) systémy pro zkoumání a průkaz látek, působících na receptor tyrosinkinázy a nové receptory tyrosinkinázy.

5.1. Systémy a metody k provádění zkoušek

5.1.1 Metody

Vynález se týká systémů a metod, které mohou být použity k detekci a/nebo měření účinnosti neurotrofinů nebo k identifikaci látek s podobnou účinností. Pod pojmem "účinnost neurotrofinů" se rozumí účinnost BDNF nebo NT-3 nebo dalších, až dosud neidentifikovaných neurotrofních faktorů nebo i jiných, neneurotrofních faktorů včetně peptidů a nepeptidových molekul, které jsou schopné se vázat na

trkB. Látky, které mají neurotrofinovou účinnost zahrnují, avšak nejsou omezeny na neurotrofinní a neneurotrofinní faktory včetně peptidových a nepeptidových molekul, které mají biologickou účinnost, podobnou BDNF a/nebo NT-3, pokud jde o časnou indukci genu, ovlivnění buněčných typů, vyvolaných jevů a podobně. Biologické účinky BDNF a NT-3, byly popsány v PCT patentových přihláškách č. PCT/US90/04915 a PCT/US90/04916. Pro účely vynálezu budou neurotrofiny i látky s účinností neurotrofinů společně označovány jako zkoumané látky.

Vynález navrhuje způsob detekce nebo měření neurotrofinové účinnosti, který spočívá v tom, že se

- i) buňka, u níž dochází k expresi trkB vystaví působení zkoumané látky a
- ii) měří se nebo se prokazuje specifická vazba zkoumané látky na trkB, přičemž specifická vazba na trkB je v pozitivní korelaci s neurotrofinní účinností.

Buňka, u níž dochází k expresi trkB může být buď buňka, u níž k této expresi dochází přirozeně nebo buňka, získaná genetickým inženýrstvím tak, aby u ní k této expresi docházelo. Je například možno zavést do buňky řetězec nukleové kyseliny, který je kódovým řetězcem pro trkB a byl získán například způsobem podle odstavce 6.1.2, a to transfekcí, transdukcí, mikroinjekcí, otevřením pórů pomocí elektrického proudu, přes transgenního živočicha a podobně při použití jakéhokoli známého postupu. Transfekce buněk COS a buněk PC12 bude například popsána v odstavci 6, popis použitého systému je popsán v odstavci 5.1.2.

Specifickou vazbu zkoumané látky na trkB je možno měřit celou řadou postupů. Například vazbu zkoumané látky na buňky, u nichž dochází k expresi trkB je možno prokázat nebo

měřit tak, že se prokazuje nebo měří:

- i) zkoumaná látka, vázaná na povrch neporušených buněk,
- ii) zkoumaná látka, vázaná zkříženou vazbou na bílkovinu trkB v materiálu z rozrušených buněk nebo
- iii) zkoumaná látka, vázaná na trkB in vitro.

Specifická interakce mezi zkoumanou látkou a trkB může být vyhodnocena při použití reakčních činidel, které prokazují specifické vlastnosti této interakce. Bylo například prokázáno způsobem podle vynálezu (odstavec 6), že BDNF a NT-3 jsou schopné se vázat na trkB, avšak NGF není schopné se vázat. To znamená, že specifická vazba zkoumané látky na trkB může být kompetitivně inhibována působením BDNF nebo NT-3, avšak nikoliv působením NGF.

Dále bude uveden specifický příklad způsobu podle vynálezu, který však nemá sloužit k omezení vynálezu. Uvažuje se případ, v níž je zapotřebí měřit ve vzorku množství neurotrofinu, například BDNF. V tomto případě je možno vystavit buňkám různá ředění vzorku se zkoumanou látkou, mimoto se užije negativní kontrola NC bez obsahu účinnosti typu BDNF a pozitivní kontrola PC, která obsahuje známé množství BDNF, užijí se buňky, u nichž dochází k expresi trkB v přítomnosti zjiitelně značeného BDNF, v tomto případě BDNF, značeného radioaktivním jodem. Množství BDNF ve zkoumaném vzorku je možno prokázat tak, že se stanoví množství ^{125}I -značeného BDNF, které se váže na jednotlivé kontroly v každém ředění a pak se srovnává se standardní křivkou hodnota pro zkoumaný vzorek. Čím více BDNF se nachází ve vzorku, tím menší množství ^{125}I -BDNF se bude vázat na trkB. Množství vázaného značeného BDNF je možno prokázat měřením radioaktivity v buňce nebo vazbou BDNF na bílkoviny buněčného povrchu při použití DSS podle publikace Meakin a Shooter, 1991, Neuron 6, 153

až 163 s následnou detekcí množství značené bílkoviny v buněčných extraktech například při použití elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu, čímž je možno prokázat značené bílkoviny s velikostí molekuly, odpovídající BDNF, vázanému na trkB. Specifická interakce zkoumané látky a trkB může být dále zkoumána tak, že se ke vzorku přidá neznačený NGF v různém zředění. Tato látka by neměla mít žádný podstatný vliv na kompetici mezi značeným BDNF a zkoumanou látkou při vazbě na trk. Je také možno použít látku, o níž je známo, že je schopna přerušit vazbu neurotrofin/trkB, například neznačený NT-3 nebo protilátku proti trkB, čímž je možno dosáhnout kompetice mezi ¹²⁵I-BDNF a zkoumanou látkou při vazbě na trkB.

Zjistitelně značený neurotrofin zahrnuje například neurotrofin, vázaný kovalentně nebo nekovalentně na radioaktivní látku, fluorescenční látku, látku s enzymatickým účinkem, látku, která může být substrátem pro určitý enzym (příčemž se dává přednost enzymům a substrátům, u nichž je možno průběh reakce prokázat kolorimetricky) nebo látku, kterou je možno rozpoznat molekulou protilátky, s výhodou zjistitelně značenou molekulou protilátky.

Specifickou vazbu zkoumané látky na trkB je možno prokázat také tak, že se vyhodnotí sekundární biologické účinky vazby neurotrofinu na trkB, jde například o indukci růstu nervových látek, časnou expresi genu nebo fosforylaci trkB, tak jak je znázorněna na obr. 11. Například schopnost zkoumané látky vyvolat růst nervových vláken je možno zkoumat na buňkách, které neobsahují trkB a na srovnatelných buňkách, u nichž k expresi trkB dochází. Růst nervových látek v buňkách, u nichž dochází k expresi trkB, avšak nikoliv ve srovnatelných buňkách, kterým trkB chybí, může ukazovat na specifickou interakci mezi zkoumanou látkou a trkB. Podobnou analýzu je možno provést tak, že se stanoví časná tvorba genu (napří-

klad fos a jun) v buňkách trkB-minus a trkB-plus nebo tak, že se prokazuje fosforylace trkB při použití standardních zkoušek na fosforylaci, jak se obecně provádějí. Analýzy tohoto typu mohou být vhodné pro identifikaci agonistů nebo antagonistů neurotrofinu, který se neváže kompetitivně na trkB.

Může například být žádoucí stanovit, zda určitý zkoumaný vzorek obsahuje BDNF. U buněk PC12, dobře charakterizované buněčné linie neuroblastomu nedochází k vyrůstání nervových vláken po působení BDNF, jak bude dále podrobněji uvedeno v odstavci 6 a jak je znázorněno na obr. 2A. Avšak u buněk PC12 po transfekci trkB dochází k vyrůstání nervových vláken po působení BDNF, jak bude rovněž dále popsáno v odstavci 6 a jak je znázorněno na obr. 5. Je tedy možno normální buňky PC12 (trkB-minus) a buňky PC12 po transfekci trkB (trkB-plus) vystavit působení vzorku (zkoumané látky) a pak je možno hodnotit mikroskopicky, zda vyrůstají nebo nevyrůstají nervová vlákna. V dalším možném provedení je možno měřit množství BDNF ve zkoumaném vzorku tak, že se stanoví množství vyrůstajících nervových látek nebo míra indukce genu v časném stádiu a získané hodnoty se srovnávají se standardní křivkou závislosti účinku na dávce určitého neurotrofinu, v tomto případě BDNF.

Vynález se týká také způsobu identifikace sloučeniny s účinností neurotrofinu, postup spočívá v tom, že se

- i) buňka, u níž dochází k expresi trkB vystaví působení zkoumané látky, načež se
- ii) prokáže specifická vazba zkoumané látky na trkB.

V tomto případě je specifická vazba na trkB v pozitivní korelaci s účinností, podobnou účinnosti neurotrofinu. Specifickou vazbu je možno prokázat buď přímým stanovením vazby

nebo sekundárními biologickými účinky, k nimž dochází v důsledku této vazby, jak již bylo svrchu uvedeno. Tento postup může být zvláště vhodný pro identifikaci nových látek ze skupiny neurotrofinů nebo ve farmaceutickém průmyslu ke sledování velkého množství peptidových a nepeptidových látek, například peptidomimetik, na účinnost, podobnou účinnosti neurotrofinů. Ve výhodném specifickém provedení způsobu podle vynálezu je možno připravit velké množství ploten s vyhloubeními, které v jednotlivých řadách střídavě obsahují buňky PC12 nebo fibroblasty, které jsou buď trkB-minus nebo po genetickém zpracování trkB-plus. Pak je možno přidávat řadu zkoumaných látek tak, že v každém sloupci plotny nebo ve stanovené části tohoto sloupce bude obsažena odlišná zkoumaná látka. Pak se v každém vyhloubení stanoví přítomnost nebo nepřítomnost vyrůstajících nervových látek. Tímto způsobem je možno prozkoumat veliký počet neznámých látek na neurotrofinovou účinnost.

V dalším provedení se vynález týká také způsobu detekce nebo měření neurotrofinové účinnosti nebo způsobu identifikace sloučeniny jako látky s neurotrofinovým účinkem, tento postup spočívá v tom, že se

- i) zkoumaná látka vystaví působení bílkoviny trkB in vitro za podmínek, při nichž může dojít k vazbě a pak se
- ii) prokazuje vazba zkoumané látky na bílkovinu trkB,

příčemž vazba zkoumané látky na trkB je v přímé korelaci s neurotrofinovým účinkem nebo účinkem, podobným účinku neurotrofinu. Při provádění těchto postupů může, avšak nemusí, být použito v podstatě čisté bílkoviny trkB, mimoto může být uvedena bílkovina vázána na pevný nosič, například na sloupec pro afinitní chromatografii nebo ve formě zkoušky ELISA, nebo může být bílkovina uložena na uměle vytvořenou membránu. Vazba zkoumané látky na bílkovinu trkB může být vyhodnocena

jakýmkoliv běžným způsobem. Ve výhodném provedení může být vazba zkoumané látky vyhodnocena nebo změřena vyhodnocením schopnosti kompetice se zjistitelně značenými známými látkami, schopnými se vázat na trkB.

Vynález se rovněž týká způsobu detekce schopnosti zkoumané sloučeniny působit jako antagonist a účinku neurotrofinu, postup spočívá v tom, že se prokazuje schopnost sloučeniny způsobit inhibici vlivu vazby neurotrofinu na trkB v buňce, u níž dochází k expresi trkB. Antagonista tohoto typu může, avšak nemusí bránit vazbě trkB na neurotrofin. Účinky vazby neurotrofinu na trkB jsou obvykle biologické nebo biochemické, jde například o vyvolání růstu nervových vláken, podporu přežívání buněk nebo jejich proliferace, vyvolání transformace buněk, vyvolání tvorby genu v časném stádiu nebo vyvolání fosforylace trkB. Je například možno postupovat tak, že se buňky PC12, fibroblasty nebo jiné buňky po transfekci trkB vystaví účinku účinného množství BDNF nebo účinného množství BDNF spolu se zkoumanou látkou, jejíž antagonistický účinek na BDNF by měl být prokázán. Pak se srovnává vyrůstání nervových vláken u těchto dvou skupin buněk a vyrůstání vláken u buněk, které nebyly podrobeny transfekci, avšak byly vystaveny působení BDNF nebo BDNF a zkoumané látky, nebo NGF nebo NGF a zkoumané látky. V případě, že antagonizující látka působí specifickou inhibici BDNF, mělo by k inhibici vyrůstání nervových látek dojít pouze v buňkách trkB-plus po působení BDNF spolu se zkoumanou látkou ve srovnání s buňkami trkB-plus, vystavenými pouze působení BDNF a mělo by dojít jen k malé nebo by nemělo dojít k žádné inhibici růstu nervových látek v buňkách trkB-minus po působení NGF a zkoumané látky ve srovnání s buňkami trkB-minus, například s buňkami PC12 po působení samotného neurotrofinu NGF.

5.1.2 Systémy

Vynález se rovněž týká systémů, které je možno použít k provádění svrchu popsaných postupů. Tyto systémy mohou spočívat v přípravě *trkB* in vitro například ve formě, vázané na pevný nosič nebo mohou být tvořeny buňkami, u nichž dochází k expresi bílkoviny *trkB*.

Buňky, u nichž dochází k expresi bílkoviny *trkB* mají tuto svou funkci přirozeně nebo ji mohou získat po úpravě genetickým inženýrstvím tak, aby produkovaly *trkB* například po transfekci, transdukci, otevření pórů pomocí elektrického proudu, mikroinjekcí, využitím transgenního živočicha a podobně při použití kódové nukleové kyseliny pro *trkB*, uložené do vhodného vektoru pro expresi.

Je možno užít jakýkoliv v oboru známý postup pro uložení fragmentu DNA do vektoru a tak uskutečnit konstrukci vektoru pro expresi s kódovým řetězcem pro *trkB*. Vektor může obsahovat chimérní gen, obsahující také příslušné řídicí signály pro transkripci a translaci a mimoto kódový řetězec pro uvedenou bílkovinu. Postupy mohou spočívat v rekombinaci DNA in vitro a v genetických rekombinačních postupech in vivo. Expresi řetězce nukleové kyseliny, který je kódovým řetězcem pro bílkovinu *trkB* nebo její peptidový fragment je možno řídit pomocí druhého řetězce nukleové kyseliny tak, aby v rekombinantní molekule DNA byla obsažena informace, umožňující expresi bílkoviny *trkB* nebo jejího peptidového fragmentu v transformovaném hostiteli. Expresi *trkB* je možno řídit například jakýmkoliv známým prvkem, jako je promotor nebo zesilovač transkripce. Promotory, které je možno využít k řízení exprese *trkB* zahrnují například dlouhé opakované koncové řetězce, popsané v publikaci Squinto a další, 1991, Cell, 65, 1 - 20, oblast promotoru

SV40 podle Bernoist a Chambon, 1981, Nature 290, 304 - 310, promotor CMV, terminální opakování M-MuLV 5' promotoru, obsaženého v 3'-dlouhé terminální repetici viru Rousova sarkomu podle Yamamoto a další, 1980, Cell 22, 787 - 797, promotor pro thymidinkinázu ve viru oparu podle Wagner a další, 1981, Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 78, 144 - 145, řídící řetězec metallothioneinového genu podle Brinster a další, 1982, Nature 296, 39 - 42, prokaryotické vektory pro expresi, například promotor pro $\times$ I704 $\times$ l2 $\times$ b $\times$ I704 $\times$ l0 $\times$ -laktamázu podle Villal-Kamaroff a další, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 3727 - 3731, nebo tac-promotor podle DeBoer a další, 1983, Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 80, 21 - 25, a také "Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American, 1980, 242, 74 - 94, dále je možno užít promotory z kvasinek nebo jiných hub, například promotor Gal 4, promotor ADH pro alkoholdehydrogenázu, promotor PGK pro fosfoglycerolkinázu, promotor pro alkalickou fosfatázu a také další řídící oblasti pro transkripci u různých živočichů, které jsou specifické pro určité tkáně a byly již užity u transgenních živočichů, jsou to například řídící oblast genu pro elastázu I, která je účinná u acinárních buněk slinivky břišní podle Swift a další, 1984, Cell 38, 639 - 646, Ornitz a další, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50, 399 - 409, MacDonald, 1987, Hepatology 7, 425 - 515, řídící oblast genu pro insulin, která je účinná u buněk beta slinivky břišní podle Hanahan, 1985, Nature 315, 115 - 122, řídící oblast imunoglobulinového genu, která je účinná v lymfoidních buňkách podle Grosschedl a další, 1984, Cell 38, 647 - 658, Adames a další, 1985, Nature 318, 533 - 538, Alexander a další, 1987, Mol. Cell. Biol. 7, 1436 - 1444, řídící oblast viru nádoru mléčné žlázy myši, která je aktivní u buněk varlat, mléčné žlázy, u lymfoidních a tukových buněk podle Leder a další, 1986, Cell 45, 485 - 495, řídící oblast genu pro albumin, která je aktivní v játrech podle Pinkert a další,

1987, Genes and Devel. 1, 263 - 276, řídící oblast genu pro alfa-fetoprotein, která je aktivní v játrech podle Krumlauf a další, 1985, Mol.Cell. Biol. 5, 1639 - 1648, Hammer a další, 1987, Science 235, 53 - 58, řídící oblast genu pro alfa-1-antitrypsin, která je aktivní v játrech podle Kelsey a další, 1987, Genes and Devel. 1, 161 - 171, řídící oblast genu pro beta-globin, která je aktivní v myelodininích buňkách podle Mogram a další, 1985, Nature 315, 338 - 340, Kollians a další, 1986, Cell 46, 89 - 94, řídící oblast genu pro basický myelin, která je účinná v oligodendrocytech mozku podle Readhead a další, 1987, Cell 48, 703 - 712, řídící oblast genu pro tenký řetězec 2 myosinu, která je účinná v kosterních svaích podle Sani, 1985, Nature 314, 283 - 286, a řídící oblast genu pro uvolnění gonadotropního hormonu, která je účinná v hypothalamu podle Mason a další, 1986. Science 234, 1372 - 1378.

Vektory pro expresi, které obsahují uložený gen pro trkB je možno identifikovat třemi odlišnými postupy:

- a) hybridizací DNA-DNA,
- b) přítomností nebo nepřítomností funkce "značícího" genu nebo
- c) expresí uloženého řetězce.

Při provádění prvního postupu je možno prokázat přítomnost cizorodého genu, uloženého do vektoru pro expresi pomocí hybridizace DNA-DNA při použití sond s obsahem řetězců, které jsou homologní s řetězcem uloženého genu trkB. Při provádění druhého postupu je možno identifikovat a podrobit selekci systém rekombinantního vektoru a hostitele v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti funkce určitého "značícího" genu, jako je účinnost thimidinkinázy, odolnost proti antibiotikům, transformovaný fenotyp, tvorba okluzních tělísek u baculoviru a podobně, tyto funkce

vznikají v důsledku uložení cizorodého genu do vektoru. Například v případě, že se do řetězce značícího genu ve vektoru uloží gen *trkB*, je možno identifikovat rekombinanty, které tento vložený gen obsahují na základě nepřítomnosti funkce značícího genu. Podle třetího postupu je možno identifikovat rekombinantní vektory pro expresi tak, že se identifikuje produkt cizorodého genu, k jehož expresi dochází u hostitele po uložení rekombinantního vektoru. Tyto zkoušky mohou být založeny například na fyzikálních nebo funkčních vlastnostech produktu genu *trkB*, například na základě vazby receptoru a neurotrofinního faktoru nebo pomocí protilátky, která je schopna přímo rozpoznat *trkB*. Buňky, získané podle vynálezu mohou být transformovány tak, že u nich přechodně nebo s výhodou konstitutivně a trvale dochází k expresi *trkB*.

Ve výhodném provedení se vynález týká také buněk, u nichž dochází k expresi *trkB* a které také obsahují rekombinantní nukleovou kyselinu, obsahující promotor genu, vznikajícího v časném stádiu, jde například o promotory *fos* nebo *jun* podle Gilman a další, 1986, *Mol. Cell, Biol.* 6, 4305 - 4316. V případě, že se taková buňka vystaví působení neurotrofinu, je možno očekávat, že se neurotrofin bude vázat na *trkB* a sekundárně vyvolá transkripci časného promotoru. Buňku tohoto typu je možno užít k detekci vazby neurotrofinu a *trkB* měřením účinnosti transkripce promotoru časně vytvářeného genu, například analýzou jader, analýzou Northern blot, nebo měřením množství genu, řízeného promotorem. Časný promotor je možno užít k řízení exprese genu *fos* nebo *jun* nebo jakéhokoli zjištěitelného produktu genu, například včetně jakéhokoli známého zjištěitelného genu, jako genu pro odolnost proti hygromycinu podle Murphy a Efstratiadis, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 8277 - 8281, genu pro chlo-ramfenikolacetyltransferázy CAT, neomycinfosfotransferázu

neo, beta-galaktosidázu, beta-glukuronidázu a podobně. Ve specifickém provedení je možno očekávat, že při vazbě neurotrofinu a trkB v buňce, v níž dochází k expresi trkB a která obsahuje gen pro lidský růstový hormon pod řízením promotoru genu fos dojde k produkci rekombinantního lidského růstového hormonu, jak bylo popsáno v Seldon a další, 1986, Mol. Cell. Biol., 6, 3173 - 3179. V dalším možném provedení je možno využít exprese trkB jako značící gen a uložit jej pod řízením časného promotoru navíc k trkB, k jehož expresi dochází konstitutivně, čímž je možno dosáhnout amplifikované odpovědi na neurotrofin. Takto uložený gen pro expresi trkB a buněčná linie, která jej obsahuje mohou představovat výjimečně citlivý a účinný systém pro detekci nebo měření účinnosti neurotrofinů.

Mimoto je možno jako pokusný systém při provádění způsobu podle vynálezu použít buňky nervového systému, vynález však není na tento typ buněk omezen. Například ve specifickém provedení je možno jako základ systému pro průkaz neurotrofinu užít fibroblasty, závislé na růstovém faktoru, jak bude dále uvedeno v odstavci 7. Transfekci genem trkB je například možno použít u buněčné linie fibroblastů, závislých na růstovém faktoru, v prostředí, prostém séra, například podle publikace Zham a Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol. 6, 3541 - 3544, je například možno použít fosforečnan vápenatý spolu s 5 mikrogramy vektoru pro expresi na bazi příslušné DNA a promotoru CMV v přítomnosti genu pro trkB krysy a spolu s 1 mikrogramem vektoru pro expresi genu pro odolnost proti hygromycinu. Po 48 hodinách je pak možno buňky podrobit selekci podle odolnosti proti hygromycinu a tak identifikovat buňky, u nichž došlo k pozitivní transfekci. Tyto buňky je pak možno pěstovat přibližně 3 týdny v přítomnosti hygromycinu, načež se spojí kolonie, které jsou proti hygromycinu odolné. Získané buňky se pak naočkují na plotny pro pěstování

tkáňových kultur, opatřené povlakem poly-D-lysinu a lidského fobronektinu a buňky se nechají růst přibližně 4 hodiny na prostředí DMEM s 10 % telecího séra tak, aby došlo k vazbě buněk na plotny. Pak se prostředí s obsahem séra odsaje a buňky se třikrát promyjí PBS k odstranění jakéhokoli zbytku séra. Pak se buňky přenesou buď do definovaného prostředí, které je prosté séra (směs DMEM a Gams F12 v poměru 3 : 1, doplněná 8 mM hydrogenuhličitanu sodného, 15 mM GEPES, 4×10^{-6} M chloridu manganatého, 3 mM histidinu, 10^{-5} M ethanolaminu, 10^{-7} M selenitu sodného, 5 mg transferinu na litr, 200 mg komplexu sérového albuminu a kyselinu linoleinové na litr, dále obsahuje prostředí gentamycin, penicilin a streptomycin a 20 mM L-glutaminu). Buňky, získané tímto způsobem se pak inkubují v přítomnosti neurotrofinu, například 100 ng/ml NT-3 nebo BDNF a po 5 dnech pěstování, při němž se každých 48 hodin užije čerstvé živné prostředí s růstovými faktory, je možno očekávat růst a vývoj buněk. Buňky v přítomnosti NGF v koncentraci 100 ng/ml nebo buňky v prostředí, prostém séra by se však neměly vyvíjet, jak je zřejmé také z obr. 7. Jak bude dále podrobněji vysvětleno v odstavci 6, získané výsledky napovídají, že v buňkách SH-SY5Y patrně dochází k expresi dalšího receptoru pro BDNF, který je odlišný od trkB. Vynález se týká rovněž systémů a postupů, při nichž se využívá receptorů, odlišných od trkB způsobem, který je analogický postupům, při nichž se receptor trkB využívá.

5.2 Pokusné modelové systémy

Vynález se rovněž týká pokusných modelových systémů pro studium fyziologické úlohy látek ze skupiny genů pro neurotrofiny. V těchto pokusných modelových systémech mohou být bílkovina trkB, její peptidové fragmenty nebo její deriváty do systému dodávány nebo mohou být v tomto systému

produkovány. Pokusné modelové systémy je možno použít pro studium přebytku neurotrofinu nebo jeho nedostatku. Tyto pokusné systémy je také možno použít ke studiu vlivu zvýšené nebo snížené odpovědi na neurotrofin v buňce, ve tkáňové kultuře nebo u neporušených živočichů, zvláště v buňkách nebo tkáních neporušených živočichů nebo v tkáňových kulturách v průběhu specifických časových období včetně embryonálního vývoje. Jde zejména o provedení, v nichž je exprese trkB řízena indukovatelným nebo vývojově řízeným promotorem. Ve specifickém provedení vynálezu je možno užít promotor CMV k řízení exprese trkB u transgenických živočichů. Pod uvedeným pojmem se v průběhu přihlášky rozumí transgenický živočich, odlišný od člověka, který v sobě nese, a to v některých svých buňkách nebo ve všech cizorodý gen. Tyto živočichy, odlišné od člověka je možno získat různými známými postupy, například mikroinjekcí, fúzí buněk, transfekcí, otevřením pórů působením elektrického proudu a podobně. Například živočichy je možno získat mikroinjekcí zygotů známými postupy, například způsobem podle publikace Brinster a další, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4433 - 4442.

Vynález se rovněž týká modelových systémů pro studium autoimunologických onemocnění, u nichž je autoimunologická odpověď směřována proti trkB. Tímto modelem mohou být například živočichové, kteří byli imunizováni imunogenním množstvím trkB a u nichž je s výhodou možno prokázat tvorbu protilátek proti trkB a/nebo vznik buněčně zprostředkované imunity. K získání takového modelového systému může být vhodné podávat trkB spolu s pomocným činidlem pro zvýšení imunologické odpovědi, jako je například *Bacillus Calmette Guerin* (BCG).

5.2.1 Modely pro studium zvýšené účinnosti neurotrofinu

Pokusný modelový systém pro toto použití je například možno vytvořit tak, aby jej bylo možno použít pro studium účinku zvýšené účinnosti neurotrofinů. V takovém systému je možno odpověď na neurotrofin zvýšit tak, že se zkonstruuje zvýšený počet molekul trkB v buňkách modelového systému ve srovnání s nezpracovanými buňkami. Může být vhodné použít zvýšený počet neurotrofinu selektivně u buněk, u nichž k expresi neurotrofinů za obvyklých podmínek dochází.

Buňky je možno zkonstruovat tak, aby docházelo k produkci zvýšeného množství bílkoviny trkB po infekci virem, který nese gen trkB podle vynálezu. Gen trkB je možno do buněk dodat také transfekcí.

V případě, že modelovým systémem má být živočich, je možno do buněk tohoto živočicha uložit rekombinantní gen pro trkB infekcí virem, který uvedený gen nese. Je také možno vytvořit transgenického živočicha, který bude nést gen trkB jako cizorodý gen.

Aby bylo možno zajistit expresi trkB, je zapotřebí uložit gen pro trkB pod řízením vhodného řetězce promotoru. Může být žádoucí uložit gen pro trkB pod řízením konstitutivního promotoru a/nebo promotoru, specifického pro určitou tkáň, například může jít o promotor, specifický pro enolázu neuronů CNS, promotor pro nervová vlákna nebo pro tyrosinhydroxylázu, nebo může jít o indukovatelný promotor, například metallothioneinový promotor nebo promotor, k jehož aktivaci dochází pomocí ultrafialového světla v dlouhé terminální repetici viru HIV podle Valeri a další, 1983,

Nature 333, 78 - 81, nebo také o promotor CMV, který je obsažen v plasmidu pCMV, jak bude dále popsáno, nebo také o vývojově řízený promotor.

Odpověď na endogenní neurotrofin je možno zvýšit také zvýšením počtu molekul trkB v buňce. V případě, že modelový systém obsahuje příliš malé množství neurotrofinu nebo neurotrofin neobsahuje, je možno tuto látku do systému přidat. Může být také žádoucí přidat do modelového systému další neurotrofin pro vyhodnocení účinku příliš vysoké aktivity neurotrofinu. Také příliš velká exprese neurotrofinu nebo příliš velké množství vylučovaného neurotrofinu může být vhodnou metodou pro sledování vlivu zvýšené hladiny neurotrofinu na buňky, u nichž již dochází k expresi trkB. Ještě výhodnější je exprese trkB ve všech buňkách (všeobecná exprese), pak se stanoví, které z těchto buněk pak funkčně odpovídají na neurotrofin, což umožní potenciální identifikaci druhé složky receptoru v případě, že tato složka existuje.

5.2.2 Modely pro studium snížené účinnosti neurotrofinu

Pokusný model, vhodný pro toto použití je například možno vytvořit tak, aby byl vhodný pro sledování vlivu snížené účinnosti neurotrofinu. Takový systém může umožnit identifikaci pochodů nebo neuronů, které vyžadují přítomnost neurotrofinu a které by mohly představovat potenciální léčebné cíle. V systémech tohoto typu může být odpověď na neurotrofin snížena tak, že se připraví rekombinantní bílkoviny trkB, které nejsou spojeny s povrchem buňky nebo které jsou zkonstruovány tak, aby byly zcela neúčinné při převodu odpovědi na neurotrofin.

Je například možno bílkovinu trkB, peptid nebo derivát do systému přivést tak, aby přidaný receptor mohl být v kompetici s endogenním trkB při vazbě na neurotrofin, takže dojde ke zmenšení odpovědi na neurotrofin. Bílkovinu trkB je možno přidat jako receptor, prostý buněk nebo může být v systému přímo produkován. Například je možno získat bílkovinu trkB, prostou transmembránové oblasti z buněk uvnitř systému, které mohou tuto látku vylučovat bez oblasti pro zakotvení. Mimoto je také možno bílkovinu trkB, peptidový fragment nebo derivát do systému přidávat tak, že se dostane do extracelulárního prostoru.

V dalším možném provedení vynálezu je možno použít rekombinantní gen pro trkB k inaktivaci nebo k odstranění účinku endogenního genu homologní rekombinací, čímž dojde k vytvoření buňky, tkáně nebo živočicha, v nichž chybí trkB. Je například možno vytvořit rekombinantní gen pro trkB tak, aby obsahoval mutaci, například gen neo, který trkB inaktivuje. Takovou konstrukci je možno uložit do buňky pod řízením vhodného promotoru, například buňky základního embryonálního kmene pomocí transfekce, transdukce, injekce a pod. Buňky, které tuto konstrukci obsahují, je pak možno podrobit selekci na základě odolnosti proti G418. Pak je možno identifikovat buňky, jimž chybí neporušený gen trkB například metodou Southern blot nebo Northern blot nebo na základě exprese. Buňky, jimž chybí neporušený gen TrkB je pak možno spojit pomocí fúze s časnými embryonálními buňkami za vzniku transgenických živočichů, kteří nevytvářejí trkB. Při srovnání takového živočicha s živočichem, u nějž nedochází k expresi endogenního neurotrofinu pak bude možno prokázat, zda si oba fenotypy úplně odpovídají nebo zda si neodpovídají, čímž by bylo možno prokázat přítomnost případných dalších látek typu neurotrofinu nebo receptorů pro tyto látky.

Živočichy tohoto typu je možno užít k definování specifických populací neuronů nebo jakýchkoliv jiných postupů *in vivo*, obvykle závislých na přítomnosti neurotrofinu. Je tedy možno očekávat, že tyto pochody nebo buněčné populace budou ovlivněny v případě, že u živočicha nedojde k expresi *trkB*, takže nebude moci dojít ani k žádné odpovědi na přítomnost neurotrofinu.

Mimoto může docházet k expresi rekombinantní bílkoviny *trkB*, jejího peptidového fragmentu nebo derivátu, který je v kompetici s endogenním receptorem pro neurotrofin také na povrchu buněk v systému, avšak tato rekombinantní bílkovina může být konstruována tak, aby nepřenášela odpověď na vazbu neurotrofinu.

Rekombinantní bílkoviny *trkB*, jejich peptidové fragmenty nebo jejich deriváty se mohou vázat na neurotrofin s afinitou, která je obdobná nebo je odlišná od afinity endogenního *trkB* k neurotrofinu. Aby bylo možno účinněji snížit odpověď na neurotrofin, může se tato bílkovina *trkB*, její peptidový fragment nebo derivát s výhodou vázat na neurotrofin s afinitou větší, než má pro tuto látku natývný receptor.

V případě, že je bílkovina *trkB*, její peptidový fragment nebo její derivát produkován v modelovém systému, může být kódová nukleová kyselina pro bílkovinu *trkB*, její peptidový fragment nebo její derivát do systému přiváděna infekcí, transdukci, transfekcí a podobně jako cizorodý gen. Jak již bylo svrchu uvedeno, je možno gen pro *trkB* uložit pod řízení vhodného promotoru, kterým může být například promotor, specifický pro určitou tkáň nebo indukovatelný promotor nebo také vývojově řízený promotor.

Ve specifickém provedení vynálezu je možno nahradit endogenní gen *trkB* v buňce mutovaným genem *trkB* homologní rekombinací. V dalším možném provedení vynálezu je možno pokusné živočichy imunisovat proti *trkB*.

V ještě dalším provedení je možno dosáhnout snížení exprese *trkB* tak, že se do buněk, u nichž dochází k expresi tohoto receptoru uloží určité množství antimediatorové RNA nebo DNA, která je schopna snížit expresi bílkoviny *trkB*.

5.3 Diagnostické použití

Při provádění vynálezu je možno použít sondy *trkB* k identifikaci buněk a tkání, které reagují na neurotrofin ve zdravé nebo chorobně změněné tkáni. Vynález se tedy týká také způsobu diagnostiky neurologických poruch u nemocných, způsob spočívá v tom, že se srovnává úroveň exprese receptoru *trkB* u nemocných s úrovní exprese téhož receptoru ve srovnatelné skupině zdravých lidí, přičemž rozdíl v úrovni exprese receptoru *trkB* u nemocných a u zdravých lidí prokazuje, že porucha u nemocných může být primárně nebo sekundárně vázána na metabolismus *trkB*. Nemocným orgánem může být buňka, tkáň nebo může jít o změnu ve složení tělesné tekutiny, s výhodou jde o tkáň nervového systému nebo o mozkomíšni mok. Vynález se týká také způsobu identifikace buněk, které jsou schopné reagovat na neurotrofin, postup spočívá v detekci exprese receptoru *trkB* v těchto buňkách. Expresi *trkB* je možno prokázat transkripcí mRNA pro *trkB* nebo produkcí bílkoviny *trkB*. Expresi genu pro *trkB* je možno zjistit s použitím sond, které jsou schopné identifikovat nukleovou kyselinu pro *trkB* nebo přímo receptor ve formě bílkoviny.

Další sondou, kterou je možno použít je protilátka proti *trkB* nebo proti fragmentu této bílkoviny, která obsahuje vaznou oblast.

Podle vynálezu je možno použít bílkovinu trkB, její fragmenty nebo její deriváty jako imunogenní látky k získání protilátek proti receptoru trkB. K tomuto účelu je zapotřebí mít k dispozici větší množství receptoru, avšak rekombinantní technikou syntézy bílkovin, která je založena na řetězci nukleové kyseliny pro trkB je možno získat poměrně značné množství bílkoviny trkB, takže problém omezených množství této bílkoviny byl odstraněn.

Aby bylo možno dále zvýšit pravděpodobnost vzniku imunologické odpovědi jako reakce na trkB, je možno analyzovat řetězec aminokyselin trkB tak, aby bylo možno identifikovat ty části molekuly, které by mohly být spojeny se zvýšenou imunogenitou. Je například možno podrobit řetězec aminokyselin počítačové analýze k identifikaci povrchových epitopů a tak získat počítačové údaje, týkající se hydrofilnosti, povrchu, flexibility, indexu antigenity, amfifilní šroubovice, plošné amfifilnosti a sekundární struktury uvedené bílkoviny. Je možno postupovat také tak, že se srovnává odvozený řetězec aminokyselin pro trkB z různých živočišných druhů a identifikují se poměrně nehomologní oblasti. Tyto nehomologní oblasti budou patrně snáze vyvolávat imunitní reakci u jiných živočišných druhů.

Při přípravě monoklonálních protilátek proti receptoru trkB je možno použít jakýkoliv postup, jímž je možno dosáhnout produkce molekul protilátek u kontinuální buněčné linie, pěstované v kultuře. Je například možno užít techniku hybridomu, původně popsanou v publikaci Kohler a Milstein, 1975, Nature 256, 495 - 497, stejně jako techniku triomu, hybridomu lidských B-buněk podle publikace Kozbor a další, 1983, Immunology Today 4, 72, dále techniku EBV-hybridomu k získání lidských monoklonálních protilátek podle publikace Cole a další, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,

Alan R. Liss, Inc. str. 77 - 96, všechny tyto postupy a další podobné postupy je možno při provádění vynálezu využít.

Monoklonální protilátky pro léčebné použití mohou být lidské monoklonální protilátky nebo také chiméřní protilátky člověka a myši nebo jiného živočišného druhu. Lidské monoklonální protilátky je možno připravit jakýmkoliv z celé řady známých postupů, například způsobem podle publikací Teng a další, 1983, Proc. Natl. Acad.Sci., USA, 80, 7308 až 7312, Kozbor a další, 1983, Immunology Today 4, 72 - 79, Olsson a další, 1982, Meth. Enzymol, 92, 3 - 16. Chiméřní molekuly protilátek je možno připravit také tak, aby obsahovaly oblast pro vazbu antigenu z myši a lidské konstantní oblasti, jak bylo popsáno v Morrison a další, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 6851, Takeda a další, 1985, Nature 314, 452.

K získání polyklonálních protilátek proti různým epitopům receptoru trkB je rovněž možno použít celou řadu známých postupů. Pro získání protilátek je možno imunizovat různé hostitelské živočichy injekcí bílkoviny trkB nebo jejího fragmentu nebo derivátu, z živočichů je možno použít například králíky, myši, krysy a podobně. Ke zvýšení imunologické odpovědi je možno ještě použít různé pomocné prostředky v závislosti na druhu hostitele, může jít například o Freundův úplný i neúplný pomocný prostředek, o různé gely anorganického původu, například hydroxid hlinitý, o povrchově aktivní látky, například lysolecitin, polyoly typu pluronice, polyanionty, peptidy, emulze oleje, hemocyaniny, dinitrofenol a některé pomocné látky, užívané u člověka, například BCG (Bacillus Calmette-Guerin) a Corynebacterium parvum.

Molekulární klon protilátky proti epitopu trkB je rovněž možno připravit známým způsobem. Ke konstrukci řetězců nukleových kyselin, které jsou kódovými řetězci pro molekulu monoklonální protilátky nebo pro její oblast pro vazbu antigenu je možno užít postupu s využitím rekombinantní DNA, tak jak byly popsány v publikaci Maniatis a další, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Molekuly protilátek je možno čistit známými postupy, například imunoabsorpcí nebo imunoafinitní chromatografií a také dalšími chromatografickými postupy, jako vysokotlakou kapalinovou chromatografií HPLC, kombinací různých uvedených postupů a podobně.

Vynález se týká také molekul protilátek a fragmentů těchto molekul. Fragmenty protilátek, které obsahují idiotyp molekuly je možno vytvořit známým způsobem. Tyto fragmenty zahrnují například fragment $F(ab')_2$, který je možno získat rozštěpením molekuly protilátky působením pepsinu, fragmenty Fab' , které lze získat redukcí disulfidových můstků ve fragmentu $F(ab')_2$ a fragmenty Fab , které je možno vytvořit zpracováním molekuly protilátky působením papainu a redukčního činidla.

Svrchu uvedené sondy je možno experimentálně využít také k identifikaci buněk nebo tkání, u nichž zatím nebyla exprese trkB prokázána.

Mimoto je možno tyto postupy využít k identifikaci exprese trkB aberantními tkáněmi, například tkáněmi zhoubných nádorů. V dalších možných provedeních je možno použít tyto postupy diagnosticky ke srovnávání exprese trkB v různých buňkách, tkáňových tekutinách nebo tkáních u nemocných,

trpících určitou poruchou a ve srovnatelných buňkách, tělesných tekutinách nebo tkáních zdravých lidí. Tělesnou tekutinou se v tomto smyslu rozumí jakákoliv tělesná tekutina, zvláště však krev nebo mozkomíšní mok. Rozdíl v úrovni exprese trkB u nemocného ve srovnání s úrovní exprese u zdravých lidí může prokazovat, že porucha u nemocného se může primárně nebo sekundárně vztahovat na metabolismus trkB. Například vzestup množství trkB by mohl ukazovat na to, že porucha u nemocného je spojena se zvýšenou citlivostí na normální hladiny neurotrofinu nebo také může jít o případ, že hladiny neurotrofinů u nemocného jsou tak nízké, že došlo ke zvýšení množství receptorů ke kompenzaci tohoto jevu. Obě etiologie je možno od sebe odlišit tak, že se nemocnému podá neurotrofin. V případě, že se jeho stav zhorší, může nemocný trpět zvýšenou citlivostí na neurotrofin. V případě, že dojde ke zlepšení stavu, může nemocný trpět nedostatkem neurotrofinu. V zásadě je tak možno podle uvedeného výsledku volit léčbu, která spočívá buď v podání neurotrofinu nebo látky, která účinek neurotrofinu antagonisuje. Rozdíly v expresi je možno prokázat na úrovni bílkoviny a/nebo na úrovni RNA, to znamená přímým měřením množství bílkoviny trkB, nebo měřením RNA pro trkB u nemocného a u zdravých lidí s následným srovnáním získaných hodnot.

Svrchu uvedené sondy je možno použít také pro selekci buněk, schopných reagovat na přítomnost neurotrofinů pro použití v různých systémech, tak jak byly popsány svrchu nebo v systému, popsaném v US patentové přihlášce č. 07/532 285, podané 1. června 1990 nebo jakýmkoliv dalším postupem, který se týká selekce buněk.

5.4 Léčebné použití

Vynález se rovněž týká způsobu léčení nemocných, kteří trpí neurologickými poruchami. Postup spočívá v tom, že se nemocným podá účinné množství bílkoviny trkB, jejího peptidového fragmentu nebo jejího derivátu, schopného se vázat na neurotrofin. Léčebné postupy, týkající se podávání trkB, antagonistů tohoto receptoru a látek, které antagonizují účinek receptoru kompeticí o endogenní neurotrofin, podávání agonistů trkB nebo protilátek proti receptoru rovněž spadají do oboru vynálezu.

Vynález se rovněž týká farmaceutických prostředků, které jako svou účinnou složku obsahují bílkovinu trkB, její peptidový fragment nebo její derivát spolu s vhodným farmaceutickým nosičem.

Bílkovinu trkB, její peptidový fragment nebo její derivát je možno podávat systemicky nebo místně. Příslušný způsob podání se volí ze známých postupů, jde tedy například o podání nitrožilní, intrathekální, intraarteriální, o podání nosní sliznicí, perorální podání, podání podkožní, intraperitoneální, místní podání pomocí injekce nebo ve formě chirurgického implantátu. Je možno použít také prostředky s řízeným uvolněním účinné látky.

S postupem výzkumů, které vedou k lepšímu porozumění neurodegenerativním onemocněním a poškozením nervové soustavy je stále jasnější, že v některých případech by bylo žádoucí snížit trofický účinek endogenního neurotrofinu. V oblastech poškození nervového systému by proto mohlo být žádoucí použití antagonistů neurotrofinu včetně rozpustných forem trkB, které se mohou dostávat do kompetice s endogenním buněčným receptorem při vazbě neurotrofinu. Za uvedených

okolností může být žádoucí spíše místní použití antagonisty neurotrofinu v místě poškození než jeho systemické použití. Může být použit také implantát, obsahující trkB.

V dalším možném provedení může být určitý chorobný stav příznivě ovlivněn zvýšením citlivosti na neurotrofin. V tomto případě může být žádoucí zvýšit počet molekul receptoru nebo zvýšit afinitu vazby trkB u nemocných s uvedenými poruchami. Tohoto cíle by bylo možno dosáhnout přiváděním příslušného genu. Selektivní exprese rekombinantního receptoru trkB v příslušných buňkách lze dosáhnout při použití genu pro trkB, řízeného promotory, které jsou pro tkáň specifické nebo indukovatelné nebo vyvoláním lokalizované infekce virem s defektní replikací, nesoucím rekombinantní gen pro trkB. Poruchami, které by bylo možno zlepšit zvýšenou citlivostí na neurotrofin jsou zejména poruchy motorických neuronů včetně amyotrofní laterální sklerosy, Werding-Hoffmanova onemocnění, chronická proximální spinální svalová atrofie a syndrom Guillain-Barre. Stejného léčebného postupu by mělo být možno použít také v případě neurologických poruch u cukrovky, Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby a Huntingtonovy chorey.

5.5. Systémy pro stanovení a vyhledávání látek, které působí na receptor tyrosinkinázy a postupy pro vyhledávání nových receptorů tyrosinkinázy

Vynález se rovněž týká systémů, které je obecně možno použít při stanovení předem definovaných látek a k vyhledávání nových látek, působících na receptor tyrosinkinázy. Téhož postupu podle vynálezu a téhož systému je možno užít také k průkazu dosud neznámých receptorů, zprostředkovávajících odpověď na některé známé faktory. Jakmile je defino-

ván určitý systém receptoru a vazné látky, například v tomto případě trkB a BDNF/NT-3, je možno využít také řadu dalších specifických systémů, jak již bylo svrchu podrobněji vysvětleno.

Bylo prokázáno, že v případě, že se receptor pro tyrosinkinázu uloží do buněk, v nichž za běžných podmínek k expresi tohoto receptoru nedochází, mohou uvedené buňky reagovat snadno zjistitelným způsobem na vaznou látku, která se na uvedený receptor váže. Bylo také prokázáno, že typ vznikající odpovědi závisí na typu použité buňky a nikoliv na specifickém receptoru, který byl do buňky uložen. To znamená, že při uložení receptoru trkB do buněk PC12 pheochromocytomu má za následek závislost diferenciaci těchto buněk na BDNF/NT-3, kdežto po uložení téhož receptoru do fibroblastů dojde k závislosti přežívání a diferenciaci těchto buněk na BDNF nebo NT-3. Je tedy možno zvolit příslušnou buněčnou linii k dosažení odpovědi, kterou bude možno nejlépe využít pro stanovení nebo pro vyhledávání látek, schopných spolupůsobit s receptorem tyrosinkinázy. Touto látkou může být jakákoliv molekula včetně peptidových a nepeptidových molekul, která je schopna působit v těchto systémech způsobem, specifickým pro receptor. Jedním z vhodných systémů, který by měl být zkoumán, zahrnuje přivádění požadovaného receptoru, například trkB do buněčné linie fibroblastů, například do určitého klonu buněk NIH3T3, který bude dále podrobněji popsán v odstavci 7. To znamená, že receptor, který za obvyklých podmínek nezprostředkovává proliferativní odpověď, může být po zavedení do fibroblastů prokazován různými známými postupy, které vedou ke kvantitativnímu stanovení účinků růstových faktorů pro fibroblasty, jde například o příjem thymidinu nebo další typy zkoušek na proliferaci, tak jak byly popsány v publikacích van Zoelen 1990, The Use of Biological Assays For Detection Of Polypeptide Growth Factors, Progress Factor

Research, sv. 2, str. 131 - 152, Zhan a M. Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol., sv. 6, str. 3541 - 3544. Tyto zkoušky mají tu další výhodu, že tentýž prostředek je možno sledovat jak na buněčné linii s uloženým receptorem, tak na původní buněčné linii, která receptor neobsahuje. Pouze specifické účinky na buněčnou linii s receptorem jsou považovány za účinky, zprostředkované uloženým receptorem.

Systémy tohoto typu nejsou omezeny na zkoumání známých vazných látek pro známé receptory, je možno je použít také k identifikaci nových látek, které by mohly působit na tyto nebo jakékoliv další receptory. Například buněčná linie s uloženým receptorem i původní buněčná linie bez receptoru mohou být vystaveny jakémukoliv potenciálnímu zdroji látky, která by mohla působit přes uvedený receptor. Jakékoliv specifické účinky, například přežívání buněk nebo jejich proliferaci v případě buněčné linie s uloženým receptorem je možno použít k identifikaci zdrojů látek, schopných přes tento receptor působit a zjištěnou látku je popřípadě možno dále čistit.

Receptory nemusí být omezeny na ty, pro něž již existuje známá vazná látka. Tento systém může umožnit identifikaci vazných látek pro receptory, které zatím nemají známou vaznou látku. To znamená, že fibroblasty, u nichž dochází k expresi trkB by bylo možno v takových systémech využít pro identifikaci a popřípadě k čištění vazných látek, například BDNF a NT-3, které za obvyklých podmínek aktivují trkB. Nyní je však možno je využít také k identifikaci dalších peptidových vazných látek nebo i jiných látek, například molekul nepeptidové povahy, které by rovněž mohly přes tyto receptory působit. Zdroje zkoumaných látek mohou zahrnovat například extrakty z různých tkání a různých organismů nebo supernatantu z buněk po transfekci při použití DNA genomu

nebo bank pro expresi cDNA. Ve zvláštním provedení vynálezu je možno podrobit fibroblasty, u nichž dochází k expresi vloženého receptoru, pro nějž se hledá vazná látka, expresi pomocí banky cDNA, odvozené od potenciálního zdroje takové vazné látky. Buňky, které by přezívaly a vytvářely kolonie na definovaném prostředí, neobsahujícím růstové faktory pro fibroblasty podle publikace Zhan a Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol., sv. 6, str. 3541 - 3544 by pravděpodobně vytvářely růstový faktor, který by splnil jejich běžné požadavky na přítomnost tohoto faktoru. Aby bylo možno prokázat, že uvažovaný růstový faktor působí přes zkoumaný receptor, bylo by zapotřebí supernatanty těchto buněk zkoumat na původní buněčné linii tak, aby bylo možno prokázat, že supernatant působí pouze na buněčnou linii, u níž dochází k expresi zkoumaného receptoru. Pak by bylo možno izolovat tu část DNA, použité k transfekci, která je kódovým řetězcem pro tento nový účinek při použití známých postupů.

Vynález se rovněž týká způsobu klonování alespoň části genu pro receptor tyrosinkinázy, kterou je pak možno využít k identifikaci dvojic vazná látka/receptor, tak jak bylo uvedeno svrchu. Postup spočívá v tom, že se

- i) řetězec nukleové kyseliny, která je kódem pro tyrosinkinázu amplifikuje PCR-reakcí při použití se stavy molekul cDNA, například knihovny cDNA jako matrice při použití oligonukleotidových primerů, které odpovídají těm oblastem známé molekuly tyrosinkinázy, které jsou spojeny s účinností tyrosinkinázy, načež se
- ii) amplifikovaná nukleová kyselina klonuje ve vhodné molekule vektoru, například v plasmidu, bakteriofágu a podobně.

Vynález se rovněž týká genu pro tyrosinkinázu a jeho částí, které byly klonovány uvedeným způsobem. Ve zvláštním,

specifickém provedení, které bude podrobněji uvedeno v odstavcích 9 a 10 je možno využít oligonukleotidových primerů, které jsou uvedeny na obr. 12A nebo v dále uvedeně tabulce II.

Pak je možno stanovit řetězec DNA, amplifikované a klonované uvedeným způsobem při použití standardních postupů. Výsledné řetězce je pak možno srovnávat s řetězcí známých molekul tyrosinkinázy tak, aby bylo možno identifikovat zvláště zajímavé klony. Vynález se rovněž týká identifikovaných řetězců klonovaných nukleových kyselin, které byly získány uvedeným způsobem, jak bude dále podrobněji vysvětleno v odstavcích 9 a 10 a peptidů a bílkovin, pro něž je kódem cDNA, která tyto řetězce obsahuje. Vynález se týká také v podstatě čistých rekombinantních molekul nukleových kyselin, které zahrnují řetězce nukleových kyselin

- i) tak jak byly uvedeny na obr. 12C pro Rtk-1, Rtk-6, Rtk-7, Rtk-8 a Rtk-9,
- ii) tak jak jsou uvedeny na obr. 13B pro Rtk-4 a Rtk-5,
- iii) tak jak jsou uvedeny na obr. 14 pro Rtk-2 a
- iv) tak jak jsou uvedeny na obr. 15 pro Rtk-3.

Vynález se rovněž týká částí uvedených molekul, které obsahují alespoň 10 zbytků nukleových kyselin. Vynález zahrnuje také nukleové kyseliny, obsažené v plasmidu pBluescript SK s obsahem Rtk-2 nebo s obsahem Rtk-3, tak jak byly tyto plasmidy uloženy ve veřejné sbírce American Type Culture Collection pod čísly a Vynález se dále týká v podstatě čistých molekul bílkovin, které obsahují řetězec aminokyselin

- i) tak jak byl uveden na obr. 12C pro Rtk-1, Rtk-6, Rtk-7, Rtk-8 a Rtk-9,

- ii) tak jak je uveden na obr. 13B, pro Rtk-4 a Rtk-5,
- iii) tak jak je uveden na obr. 14 pro Rtk-2 a
- iv) tak jak je uveden na obr. 15 pro Rtk-3.

Vynález zahrnuje také části těchto bílkovin, obsahující alespoň šest zbytků aminokyselin nebo funkčně ekvivalentní molekuly. Funkčně ekvivalentními molekulami jsou takové molekuly, v nichž jsou některé zbytky aminokyselin nahrazeny jinými zbytky tak, že vzniká tichá mutace. Je například možno nahradit jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin v řetězci jinou aminokyselinou se stejnou polaritou, která působí jako funkční ekvivalent, takže se změna ve funkci neprojeví. Aminokyseliny pro uvedenou náhradu v řetězci je možno volit z jiných aminokyselin ve stejné skupině, do které nahrazená aminokyselina náleží. Například nepolární hydrofobní aminokyseliny jsou alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. Polární neutrální aminokyseliny jsou glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. Bazické kyseliny s pozitivním nábojem jsou arginin, lysin a histidin. Kyselé aminokyseliny s negativním nábojem jsou kyselina asparagová a kyselina glutamová. Vynález zahrnuje také bílkoviny, jejich fragmenty nebo jejich deriváty, které jsou různě modifikovány v průběhu translace nebo po ukončené translaci například glykosylací, proteolytickým štěpením, vazbou na molekulu protilátky nebo jiné buněčné vazné látky a podobně.

Vynález se rovněž týká buněk a mikroorganismů, které nesou rekombinantní molekuly nukleových kyselin, tak jak byly svrchu popsány, včetně Rtk-1, Rtk-6, Rtk-7, Rtk-8, Rtk-9, Rtk-2, Rtk-3, Rtk-4, a Rtk-5. Ve zvláštním provedení mohou být buňkami, nesoucími rekombinantní nukleovou kyselinu fibroblasty. V jiném provedení může být takovou buňkou také bakterie.

Amplifikované fragmenty nukleových kyselin je pak možno použít k identifikaci klonů cDNA s plnou délkou. Ve výhodných provedeních vynálezu je možno užít amplifikovaný fragment DNA k identifikaci tkáně nebo buněčné linie, u níž dochází k expresi poměrně značného množství odpovídající mRNA, například při použití analýzy Northern blot nebo dot-blot. Taková tkáň nebo buněčná linie může být využita k vytvoření banky cDNA, která může sloužit jako velmi vhodný zdroj cDNA s plnou délkou, obsahující řetězec a amplifikovaný fragment.

Obrácený postup může být použit při molekulárním klonování receptoru pro látku, pro niž receptor dosud není znám, může jít například o neurotrofní bílkovinu, pro niž zatím nebyl izolován příslušný receptor. Fibroblasty, vystavené působení tohoto faktoru by za obvyklých podmínek neměly na přítomnost tohoto faktoru reagovat, avšak po transfekci pomocí banky cDNA, připravené z buněk, u nichž by mohlo docházet k expresi takového receptoru by mohly být získány buňky po transfekci, u nichž by k expresi takového receptoru skutečně docházelo a které by tedy reagovaly na přítomnost uvedeného faktoru. Pak by bylo možno využít účinné mechanismy pro selekci, například schopnosti vytvářet kolonie na definovaných živných prostředích v přítomnosti uvedeného faktoru, čímž by bylo možno identifikovat buňky, u nichž po transfekci dochází k expresi hledaného receptoru. Pak by bylo možno obvyklým způsobem izolovat také gen, který je kódovým řetězcem pro tento receptor.

Příklady provedení vynálezu

6. Příklad: Gen pro trkB je kódem pro funkční receptor pro BDNF a NT-3, avšak nikoliv pro NGF

6.1. Materiály a metody

6.1.1. Buněčné kultury, neurotrofiny a značení neurotrofinů radioaktivním jodem

Buňky COS-M5 byly pěstovány v Eaglově živném prostředí DMEM v Dulbeccově modifikaci, obsahujícím 10 % fetálního séra skotu FBS, 1 % penicilinu i streptomycinu P/S a 2 mM glutaminu v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého. Buňky PC12 byly pěstovány na prostředí DMEM, obsahujícím 6 % FBS, 6 % koňského séra, P/S a 2 mM glutaminu na plotnách Costar pro tkáňové kultury v atmosféře s obsahem 7,5 % oxidu uhličitého. Buňky PC12 (Dr. L. A. Greene's Laboratory) byly použity v pokusech, znázorněných na obr. 2, buňky PC12 (Dr. E. M. Shooter's laboratory) byly použity v pokusech, znázorněných na obr. 5. Buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y (June Biedler, Sloan-Kettering) byly pěstovány na Eaglově minimálním základním prostředí EMEM s 10 % FBS, (P/S) a 2 mM glutaminu.

2,5S myší NGF byl získán od Bioproducts for Science (Indianapolis, IN). Lidský BDNF a NT-3 byly produkovány buňkami CHO a čištěny ze živného prostředí, v němž byly tyto buňky pěstovány až do homogenity a pak byly tyto látky stanoveny na polyakrylamidovém gelu při barvení stříbrem a byly analyzovány řetězce aminokyselin. Pak byly čištěné neurotrofiny NGF, BDNF a NT-3 značeny radioaktivním jodem při použití laktoperoxidázy podle publikace Hempstead a další, 1989, Science, 243, 373 - 375. Jodované neurotrofiny byly odděleny

od nezabudovaného radioaktivního jodu při použití filtrů Centriflo CF50A (Amicon, Beverly, MA). Shluky byly odstraněny filtrací na gelu S200.

6.1.2. Klonování trkB krysy, exprese u savců, konstrukce a přechodná transfekce

Klon cDNA pro trkB krysy s plnou délkou byl získán analýzou banky cDNA krysího mozku ve vektoru lambda ZAP2 (Stratagene) při použití specifických oligonukleotidů pro trkB krysy, odpovídajících většině 5'- a 3'-kódových oblastí trkB. Jak lidský LNGFR podle Johnson a další, 1986, Cell 47, 545 - 554, tak cDNA pro trkB krysy byly subklonovány v savčím vektoru pro expresi, pCMX za vzniku pCMX-LNGFR nebo pCNX-trkB. Plasmid pCMX-trkB(del) byl vytvořen rozštěpením plasmidu pCMX-trkB enzymem Apal, který štěpí těsně za transmembránovou oblastí trkB a enzymem NotI, který štěpí těsně za kódovou oblastí pro trkB v řetězci vektoru, obě zakončení byla vyplněna a plasmid byl znovu navázán, takto vzniklá kódová oblast trkB obsahuje extracelulární i transmembránovou oblast trkB, avšak neobsahuje 320 C-terminálních aminokyselin.

Buňky COS-M5 byly podrobeny přechodné transfekci plasmidem pCMX-LNGFR, pCMX-trkB nebo kontrolním vektorem pCMX transfekcí při použití DEAE-dextranu. Postup byl prováděn tak, že buňky COS-M5 byly naočkovány v množství $1,5 \times 10^6$ buněk na plotny s průměrem 100 mm 24 hodin před transfekcí. Pro provedení transfekce byly buňky pěstovány v prostředí DMEM, prostém séra a obsahující 400 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextranu, 1 μM chlorochinu, 2 mM glutaminu, 20 $\mu\text{g/ml}$ insulinu, 5 $\mu\text{g/ml}$ transferinu, 33 nM selenitu sodného a 5 μg příslušné DNA, v tomto prostředí se směs inkubuje 3 hodiny a 15 minut při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Pak se

prostředí, použité pro transfekci odsaje a nahradí chloridem sodným s fosfátovým pufrem a s 10 % DMSO na 2 minuty. Po tomto DMSO "šoku" se buňky COS-M5 uloží do prostředí DMEM s 10 % FBS a s 1 % penicilinu i streptomycinu a s glutaminem v konečné koncentraci 2mM na 48 hodin.

Buňky PC12 byly podrobeny přechodné transfekci otevřením pórů působením elektrického proudu. Před transfekcí byly buňky propláchnuty ledově chladným roztokem chloridu sodného s fosfátovým pufrem, prostým vápníku a hořčíku a obsahujícím 2 mg/ml glukosy (Dulbecco), pak se buňky znovu uvedou do suspenze v tomtéž pufru při hustotě buněk $1,5 \times 10^7$ buněk na ml v přítomnosti 40 mikrogramů příslušné DNA. Buňky PC12 byly podrobeny transfekci působením plasmidů pCMX, pCMX-trkB nebo pT24-ras popsanych v publikaci Yancopoulos a další 1985 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:5455-5459. Buněčná směs se inkubuje 10 minut v ledu a pak se nechá rychle zteplat na teplotu místnosti a póry se otevrou působením elektrického proudu v celkovém objemu 1 ml při působení 1150 V/cm a 500 μ F. Pak se buňky inkubují v ledu ještě 30 minut. Načež se nanese na plotny s prostředím DMEM se 6 % FBS, 6 % koňského séra, 1 % penicilinu i streptomycinu a 2mM glutaminu. Užijí se plotny Costar z plastické hmoty bez jakéhokoliv předběžného povlaku. 48 hodin po transfekci se na buňky působí 10 ng/ml neurotrofinu nebo BSA, tak jak je uvedeno v popisu k obr. 5 a po dalších 48 hodinách se vyhodnotí růst nervových vláken.

6.1.3 Chemické zesíťení

Buňky se odeberou do roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrem, který dále obsahuje 1 mM EDTA, 1 mg/ml glukosy a 25 mM HEPES (PBS-versene) a pak se buňky znovu uvedou do suspenze při vhodné hustotě, obvykle 1×10^6 buněk/ml v ledově chladném vazném pufru A, jde o PBS s obsahem 1 mg/ml BSA

a glukosy. Plasmidy pCMX-trkB nebo pCMX, užitá k transfekci buněk COS-M5 v množství 4×10^5 buněk byly s buňkami inkubovány v ledu v přítomnosti ^{125}I -značených neurotrofinů, které byly užity v konečné koncentraci v rozmezí 0,1 až 0,25 nM, inkubace byla prováděna 90 minut v nepřítomnosti nebo v přítomnosti neznačeného NGF, BDNF nebo NT-3, jak je znázorněno na obr. 1 a 3. Chemická látka pro zesílení DSS (Pierce, Rockford, IL) byla použita za podmínek, popsaných v publikaci Meakin a Shooter, 1991, Nuron 6, 153 - 163. Reakce pro zesílení byla ukončena po 90 minutách a zastavena přidáním 12 ml 50 mM tris-puftru s obsahem 160 mM chloridu sodného. Buňky byly odstředěny 5 minut při 300 g a pak 2x promyty vždy 12 ml puftru A. Usazenina buněk pak byla rozpuštěna v SDS s obsahem 2 % 2-merkaptoethanolu, směs byla 5 minut povařena a radioaktivně značené zesílené bílkoviny pak byly děleny na 7% polyakrylamidovém gelu a jejich množství bylo odečítáno pomocí autoradiografie po expozici suchého gelu při použití filmu Kodak X-Omat při teplotě -70°C .

6.1.4 ^{125}I -NT-3 kompetiční vazné zkoušky

Vazba ^{125}I -NT-3 na buňky COS-M5 po transfekci plasmidem pCMX-LNGFR, p-CMX-trkB nebo kontrolním vektorem pCMX byla stanovena na buňkách v suspenzi. Buňky pak byly odebrány do PBS-versene a pak znovu uvedeny do suspenze ve vazném puftru A tak, jak bylo popsáno svrchu pro chemické zesílení. Buňky byly inkubovány se ^{125}I -NT-3 v koncentraci 0,1 až 0,25 nM v nepřítomnosti nebo v přítomnosti zvyšujících se koncentrací neznačeného NT-3, BDNF nebo NGF v koncentraci 0,3 až 30 nM v případě NGF a 1 až 100 nM v případě BDNF a NT-3, jak je uvedeno v popisech k obr. 4C a 4D. Vazné reakce byly prováděny 90 minut v ledové lázni. Volný ^{125}I byl oddělen od vázané látky rychlým odstředěním po dobu 30 sekund při použití sacharosového gradientu, vytvořeného ve zkumavce pro mikro-

odstředivku v její prodloužené spodní části. Zkumavky byly okamžitě zmrazeny ve směsi suchého ledu a ethanolu. Spodní část zkumavky byla odříznuta a výsledek byl odečten na počítací gamma-zářením.

6.1.5 Izolace RNA a analýza northern blot

Celková buněčná RNA, izolovaná z buněk SH-SY5Y a ze zpracovaných nebo nezpracovaných buněk PC12 byla frakcionována na agarosovém gelu s 1 % formaldehydu, pak byl materiál přenesen na nylonové membrány a hybridisován při použití sondy v-fos, značené ^{32}P nebo sondy c-jun, značené stejným způsobem, jak bylo popsáno v publikaci Squinto a další, 1990, Neuron 5, 757 - 766. Exprese trkB byla sledována při použití sondy krysího trkB, značeného ^{32}P z oblasti, která je kódovou oblastí pro intracytoplasmatickou tyrosinkinázu.

6.2. Výsledky

6.2.1 Vazba všech tří neurotrofinů na LNGFR, BDNF a NT-3 nepůsobí přes HNGFR

Aby bylo možno stanovit, zda NT-3 se stejně jako NGF a BDNF může vázat na LNGFR, jak bylo popsáno v publikaci Rodriguez-Tebar, 1990, Neuron, 4, 487 - 492, byly všechny tři neurotrofiny zkoumány na svou schopnost chemického zesíťení s bílkovinou LNGFR po její přechodné expresi v buňkách COS. Každý ze tří radioaktivně značených neurotrofinů může být specificky zesíťen s bílkovinou s molekulovou hmotností, jaká je očekávána pro LNGFR, uvádí se, že zesíťený komplex, znázorněný na obr. 1B má velikost přibližně 100 kb podle publikace Hosang a Shooter, J. Biol. Chem., 260, 655 - 662. Zesíťený produkt nebylo možno prokázat v buňkách COS, u nichž

nedocházelo k expresi bílkoviny LNGFR, jak je zřejmé z obr. 1A. Mimoto, jak bylo možno očekávat v případě specifické vazby, bylo možno vzniku zesíťených produktů účinně zabránit kompeticí s přebytkem odpovídajícího neznámeného neurotrofinu, jak je zřejmé z obr. 1B. Kompetitivní zesíťení s polypeptidem odpovídajícího rozměru bylo možno pozorovat také v buněčné linii melanomu A875, o níž je známo, že u ní dochází ke stálé expresi velkých množství LNGFR, jak je zřejmé z obr. 1C.

Jakmile bylo prokázáno, že se všechny tři neurotrofiny mohou vázat na bílkovinu LNGFR, byla zkoumána schopnost BDNF a NT-3 působit přes receptory NGF s nízkou nebo vysokou afinitou. Buňky PC12. u nichž dochází k expresi obou skupin receptorů NGF poskytují význačnou odpověď pokud jde o růst nerovových látek i pokud jde o indukci skupiny tak zvaných "časných genů" po transkripci jako odpovědi na NGF, jak bylo popsáno v publikacích Greene a Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73, 2424 - 2428 a Greenberg a další, 1985, J. Biol. Chem. 260, 14101 - 14110 a jak je také zřejmé z obr. 2A, a 2B. Avšak v případě, že se buňky PC12 inkubují v přítomnosti BDNF nebo NT-3 v koncentraci, která je příliš nízká nebo v koncentraci, která je vyšší než koncentrace nasycení pro odpověď na NGF, nedochází k morfologickým změnám ani za podmínek, které jsou optimální pro růst nerovových látek a nedochází také k indukci exprese časných genů podle obr. 2A a 2B. Z těchto výsledků je možno usuzovat, že receptory s nízkou nebo vysokou afinitou pro NGF nestačí pro funkční odpověď na BDNF a NT-3, pro tuto odpověď je patrně nezbytná alespoň jedna složka receptoru, který se u buněk PC12 obvykle nevyskytuje.

6.2.2 BDNF a NT-3, avšak nikoliv NGF jsou schopné vazby na trk-B s plnou délkou nebo ve zkrácené formě

K expresi trk-B v buňkách PC12 nedochází, jak bylo popsáno v Kaplan a další, 1991, Nature 350, 153 - 160. Buněčné linie, u nichž by docházelo k expresi trk-B ještě nebyly popsány. Byla izolována cDNA pro trkB s plnou délkou a bylo dosaženo její přechodné exprese v buňkách COS a pak byly prováděny pokusy se zesíťením při použití neurotrofinů, značených radioaktivním jodem. Jak je zřejmé z obr. 3A, mohou být BDNF a NT-3, avšak nikoliv NGF zesíťeny s polypeptidem s přibližnou velikostí pro produkt genu trkB. Bylo možno pozorovat určitou heterogenitu zesíťeného materiálu, jak bylo již dříve popsáno pro HNGFR, zesíťený s NGF v publikaci Meakin a Shooter, 1991, Neuron 6, 153 - 163. Zesíťení značeného BDNF nebo NT-3 s předpokládaným produktem genu trkB nebylo možno pozorovat v přítomnosti přebytku neznačené homologní vazné látky, jak je zřejmé na obr. 3A v drahách, označených "+". Aby bylo možno ověřit, že bílkovina, zesíťená BDNF nebo NT-3 skutečně odpovídá produktu genu trkB a aby bylo možno stanovit, zda určité zkrácené formy této bílkoviny jsou rovněž schopné se vázat na vaznou látku, byla zkonstruována mutanta trkB, v níž chybí intracytoplasmatická oblast pro tyrosinkinázu a bylo dosaženo exprese této mutanty v buňkách COS. Jak je znázorněno na obr. 3B, byla radioaktivně značena vazná látka, v tomto případě NT-3 účinně zesíťená s povrchovou složkou buněk, u nichž docházelo k expresi produktu trkB se zkráceným řetězcem. Mimoto výrazný posun v pohyblivosti, který je pozorován mezi zesíťeným materiálem s plnou délkou nebo se zkráceným řetězcem a který odpovídá molekulové hmotnosti přibližně 35 000 je v souladu se známým rozsahem vypuštěné části.

6.2.3 BDNF a NT-3, avšak nikoliv NGF mohou být v kompetici na vazbu trkB a mají vyšší afinitu vazby k trkB než k LNGFR

Spečifičnost a reaktivní afinita vazby neurotrofinů na LNGFR a trkB byla srovnávána v kompetičních zkouškách. Každý ze tří nezačtených neurotrofinů byl účinně schopen specificky blokovat zesíťení radioaktivně značeného NT-3 na LNGFR po jeho expresi v buňkách COS v koncentraci 500 nM, avšak nikoliv v koncentraci 1 až 5 nM, jak je zřejmé z obr. 4A. V souladu s těmito výsledky byla vazba radioaktivně značeného NT-3 na LNGFR po jeho expresi v buňkách COS dovršena obdobným způsobem v případě všech tří nezačtených neurotrofinů, jak je zřejmé z obr. 4C. Kompetiční křivky ukazují, že disociační konstanty by pro všechny tři neurotrofiny měly ležet v oblasti nanomolů, což znamená, že předchozí pozorování platí také pro NGF a BDNF podle publikace Rodriguez-Tebar a další, 1990, Neuron, 4, 487 - 492.

Na rozdíl od poměrně vysokého množství nezačtených vazných látek, jehož je zapotřebí pro specifickou inhibici vazby na LNGFR stačí daleko nižší množství nezačteného BDNF a NT-3 k účinné inhibici vazby radioaktivně značeného NT-3 na trkB, jak je možno prokázat buď pomocí zesíťení podle obr. 4B nebo přímou analýzou vazby podle obr. 4D. NGF není ani v molárním přebytku 500 až 1000 v kompetici na vazbu radioaktivně značeného NT-3 na trkB při žádné z uvedených zkoušek, jak je zřejmé z obr. 4B a 4D. Vzhledem k množství nezačteného BDNF a NT-3, jehož je zapotřebí k úplné inhibici vazby radioaktivně značeného NT-3 na trkB, které je 10 až 100x nižší než množství, jehož je zapotřebí k blokování vazby NT-3 na LNGFR je možno se domnívat, že trkB má podstatně vyšší aktivitu pro BDNF a NT-3, než je afinita LNGFR pro tyto látky.

6.2.4 trkB může zprostředkovat růst nervových látek u buněk PC12 po působení BDNF a NT-3

Buňky PC12 vyvinou charakteristickou morfologickou odpověď po vystavení působení NGF, tato odpověď spočívá v prodloužení nervových látek a je průkazem diferenciaci na zralejší fenotyp. Jak již bylo svrchu prokázáno, uvedené buňky nereagují na působení BDNF nebo NT-3. Aby bylo možno prokázat, zda trkB může zprostředkovat biologicky relevantní odpověď na BDNF nebo NT-3, byly buňky PC12 podrobeny přechodné transfekci vektorem pro expresi trkB, pCMX-trkB, a pak byly inkubovány s jednotlivými neurotrofiny. Aby bylo možno snížit na co nejmenší míru vliv pozadí, byly buňky po transfekci pěstovány na standardních plotnách pro pěstování tkáňových kultur z plastické hmoty a nikoliv na plotnách, opatřených povlakem kolagenu nebo povlakem Primaria. Za těchto podmínek, které jsou suboptimální pro prodloužení nervových vláken podle publikací Greene a další, 1987, Meth. Enzymol., 147, 207 - 216, Vhem a další, 1990, Cell Growth, 1, 79 - 85, vyvolá NGF růst krátkých neuronů u kontrolních buněk PC12 i u buněk po transfekci trkB, jak je zřejmé z obr. 5B. V případě, že se nepřidá žádný neurotrofinní faktor, nedojde v kulturách po transfekci trkB k růstu nervových vláken, jak je zřejmé z obr. 5C. Avšak celá řada buněk v kulturách buněk PC12 po transfekci trkB vyvine robustní nervová vlákna v přítomnosti NT-3 nebo BDNF, jak je zřejmé z obr. 5D a 5E. Žádné buňky s neurity není možno pozorovat v případě buněk PC12 po přechodné transfekci kontrolními vektory a po působení BDNF nebo NT-3. Aby bylo možno získat pozitivní kontrolu pro odhad účinnosti transfekce, byly buňky PC12 podrobeny transfekci aktivovaným genem H-ras, přičemž se ukázalo, že v přítomnosti tohoto genu dochází k diferenciaci buněk PC12, která je nezávislá na přítomnosti vazných látek. Počet diferencovaných buněk, který je možno

diferencovat v kulturách po transfekci genem H-ras je ukazatelem počtu buněk PC12, u nichž skutečně došlo k přechodné transfekci. Vzhledem k tomu, že počet diferencovaných buněk, které jsou pozorovány po působení BDNF na buňky PC12 po transfekci pCMX-trkB je srovnatelný s počtem diferencovaných buněk, které lze prokázat v buněčné populaci po transfekci genem H-ras, jak je zřejmé z obr. 5A a 5E, je možno se domnívat, že každá buňka PC12, u níž dochází k expresi trkB může reagovat na BDNF avšak menší část těchto buněk může odpovídat také na NT-3, jak je zřejmé z růstu neuritů na obr. 5D. Je zřejmé, že bude zapotřebí pečlivějšího výzkumu závislosti odpovědi na dávce, aby bylo možno vyhodnotit zřejmý rozdíl mezi působením BDNF a NT-3 při těchto pokusech. Jak je znázorněno na obr. 5, je velmi překvapující, že extensivní růst neuritů u buněk PC12 po transfekci H-ras nebo u buněk PC12 po transfekci pCMX-trkB a po působení BDNF nebo NT-3 byl kvalitativně odlišný od růstu neuritů, který je za obvyklých podmínek možno v těchto kulturách pozorovat po působení NGF.

6.2.5 Buňky SH-SH5Y lidského neuroblastomu reagují na BDNF, avšak nikoliv na NT-3 a nedochází u nich k expresi trkB, průkaz dalšího receptoru pro neurotrofin

Indukce exprese časného genu byla použita jako zkouška k vyhledání buněčných linií nádorových buněk nervové tkáně, které by byly schopny reagovat na BDNF, NT-3 a NGF podle Squinto a další, 1990, Neuron, 5, 757 - 766. Bylo prokázáno, že například buněčná linie SH-SY5Y reaguje expresí mRNA c-fos na působení NGF, jak již bylo dříve popsáno, a také na působení BDNF, avšak nikoliv na působení NT-3, jak je zřejmé z obr. 6A. Dalšími pokusy bylo ověřeno, že BDNF, avšak nikoliv NT-3 má na buňky SH-HY5Y ještě další funkční účinky. BDNF na-

příklad chrání tyto buňky před oxidativním poškozením. Přestože bylo prokázáno, že u uvedených buněk dochází k expresi malých množství receptorů NGF s nízkou i vysokou afinitou podle Chem a další, 1990, Cell Growth Diff., 1, 79 - 85 a k expresi zjistitelných množství mRNA trkA, nedochází k expresi zjistitelných množství mRNA pro trkB, jak je zřejmé z obr. 6B. Zřejmý nedostatek exprese trkB u buněčné linie, reagující na BDNF a neschopnost této buněčné linie reagovat na NT-3 vede k předpokladu, že existují další modulátory LNGFR nebo trkA, která umožní reakci na BDNF nebo že existuje ještě další funkční receptor pro neurotrofin, který je specifický pro BDNF.

6.3. Diskuse

Je možno uzavřít, že trkB je kódem pro podstatnou složku funkčního receptoru pro BDNF a NT-3, avšak nikoliv pro třetí látku ze skupiny neurotrofinů, NGF. V současných publikacích se uvádí, že protoonkogen trkA, který je nejpríbuznější trkB, je podobně kódem pro podstatnou složku receptoru s vysokou afinitou pro NGF, například podle publikací Kaplan a další, 1991, Nature, 350, 158 - 160, Klein a další, 1991, EMBO J., 8, 3701 - 3709. Současná pozorování, že buňky PC12 za normálních podmínek nereagují na BDNF nebo NT-3, ukazují na to, že trkA, k jehož expresi v buňkách PC12 dochází, je aktivován pouze jedinou známou látkou ze skupiny neurotrofinů, a to NGF.

Je možno prokázat, že BDNF a NT-3 jsou schopné se vázat na trkB v nepřítomnosti LNGFR a to s vyšší aktivitou než na LNGFR. Podobně v publikaci Klein a další, 1991, Cell, 65, 189 - 197 se popisuje, že NGF se může vázat s vysokou afinitou na trkA v buňkách, u nichž nedochází k expresi LNGFR. Funkce LNGFR zůstává nejasná. Dřívější pozorování, shrnutá v

publikaci Rodriguez-Tebar a další, 1990, Neuron 4, 487 - 492 je možno rozšířit o důkaz, že všechny tři neurotrofiny jsou schopné se vázat na LNGFR s přibližně stejnou, i když poměrně nízkou afinitou. Zachování této vlastnosti je patrně způsobeno důležitou biologickou úlohou. Je možné, že LNGFR mění vazbu každého z neurotrofinů na jeho příslušný receptor typu trk. Je rovněž možné, že LNGFR mění převod signálu přes nezávislý způsob převodu nebo se může přímo účastnit počátku tohoto převodu. Mohl by například lokalizovat, koncentrovat a zachytit neurotrofin na povrchu buněk, u nichž k expresi LNGFR dochází. Z tohoto hlediska by mohlo být zajímavé, že podpůrné nervové buňky, například Schwannovy buňky, které neodpovídají na NGF vykazují expresi LNGFR a mění ji v případě poškození, jak bylo popsáno v publikaci Johnson a další, 1988, TINS 11, 299 - 304, takže je možno, že tyto buňky představují pevnou matrici nebo cestu pro koncentrování a přívod neurotrofinů k regenerujícím nervovým buňkám. Je také možné, že LNGFR působí jako receptor, který snižuje hladinu neurotrofinů, volných nebo obíhajících. Vyskytuje se totiž jak v centrálním nervovém systému, tak na periférii, jak bylo popsáno v Mainsonpierre a další, 1990, Neuron 5, 501 - 509. Vylučované formy LNGFR, popsané v DiStefano a Johnson, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 270 - 274 mohou napomáhat tomuto mechanismu. Pokud jde o některé pravděpodobné úlohy LNGFR, může jít o podobné mechanismy, které jsou specifické pro BDNF a NT-3 tak, jak je možno je prokázat při použití zkrácených forem trkB. Společná lokalizace BDNF a transkriptů zkrácených forem trkB mimo nervový systém, převážně v plicích a v kosterním svalu vyvolává otázky, týkající se úlohy BDNF, trkB a dalších potenciálních receptorů BDNF v jiných než nervových tkáních.

Skutečnost, že BDNF a NT-3 mají společný funkční receptor trkB, je v souladu s dřívějším předpokladem, že

distribuce a překrývající se specifická účinnost BDNF a NT-3 pro neurony spojuje úlohu těchto dvou neurotrofinů alespoň v centrálním nervovém systému. V průběhu zrání různých oblastí mozku dochází ke snižování koncentrace NT-3 a postupnému zvyšování koncentrace BDNF, avšak exprese trkB zůstává poměrně stálá. Avšak identifikace buněčné linie, která reaguje na BDNF, avšak nikoliv na NT-3 a u níž nedochází k prokazatelné expresi trkB napovídá, že tyto dva neurotrofiny není možno úplně zaměnit a že mohou existovat další receptory nebo modulační složky, které dovolují odlišit odpověď na BDNF nebo NT-3. Taková modulace by například mohla vysvětlit odlišné účinky NT-3 a BDNF na buňky PC12 po transfekci trkB, tak jak byly svrchu uvedeny nebo na neurony sympatiku, jak bylo popsáno v publikaci Maisonpi  re a další, 1990, Science, 247, 1446 - 1451. Je známo, že u neuronů sympatiku dochází k expresi trkB, přes- to  e údaje, které jsou k dispozici na základě hybridizace in situ neodli  shuj   p    tost funkčních a nefunkčních trans- kript   trkB v těchto neuronech, jak bylo popsáno v Klein a další, 1989, EMBO, 8, 3701 - 3709. V  vojov   srovnání BDNF a NT-3 vede k předpovědi, že tyto dva neurotrofiny byly pev- n   konzervovány tak, aby si uchovaly sv   specifick   inter- akce s větším p    tem receptorů. Přestože NGF je d  br   v  vo- jov   konzervován ve srovnání s v  t    inou vyl    ovan  ch fakto- r  , jeho konzervace n  n   tak velk   jako konzervace BDNF a NT-3, což pravd  podobn   naznačuje, že tato látka n  n   v in- terakci s takov  m množstvím receptorů jako ostatní dva neuro- trofiny. Uveden   výsledky za  razuj   neurotrofiny do zv  t    ji- c   se skupiny systémů receptorů a vazných látek, v nichž se mnoho  etn   receptory jsou schopn   vázat na několik různých příbuzných vazných látek, údaje jsou shrnuty v publikaci Cross a Dexter, 1991, Cell, 64, 271 - 280.

Vazba a aktivace receptorů pro tyrosinkinázu p  sobe- n  m neurotrofinů prokazuje, že tyto faktory využívají

signální dráhy, které jsou velmi podobné drahám, aktivovaným mitogenními růstovými faktory. Tento poznatek je v souladu s výsledky posledních výzkumů, které uvádějí, že neurotrofní faktory mohou v určitých souvislostech působit jako mitogeny, jak bylo popsáno v publikaci Cattaneo a McKay, 1990, Nature, 347, 762 - 765. Mimoto pak bylo také prokázáno, že signály, které zahajují aktivaci receptoru tyrosinkinázy, jsou za běžných podmínek integrovány do nemitogenních cest pro převod v nervových buňkách. Přes rozdíly v cílovém jevu, kterým je mitogenesa, přežívání nebo diferenciace, jsou alespoň některé z časných meziproduktů v signalizační kaskádě tyrosinkinázy, jako skupina ERK bílkovinných kináz podobným způsobem aktivovány v nervových i jiných buňkách. Dalším příkladem toho, že aktivace tyrosinkinázy v nervových buňkách může vést k nemitogenním důsledkům může být bílkovina z *Frosophila* sevenless, jejíž aktivace je nutná pro diferenciaci buněk fotoreceptorů podle publikace Basler a další, 1991, Cell, 64, 1069 - 1081.

7. Příklad: trk může zprostředkovat přežívání v závislosti na BDNF/NT-3 a proliferaci u fibroblastů, jimž chybí receptor NGF s nízkou afinitou

7.1. Materiály a metody

7.1.1 Buňky, buněčné kultury a transfekce DNA

Buňky NIH3T3 byly pěstovány v Eaglově prostředí DMEM v Dulbeccově modifikaci, obsahujícím 10 % telecího séra, 1 % peniclinu i streptomycinu (P/S) a 2 mM glutaminu v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého. Pro zkoušky na definovaných prostředích byla tato prostředí připravena podle publikace Zhan a další, 1987, Oncogene, 1, 369 - 376.

I když bylo prokázáno, že buňky NIH3T3 ztrácejí svou životnost v prostředích v nepřítomnosti růstového faktoru, jak bylo popsáno v Zhan a další, *Oncogen*, 1, 369 - 376, Zhan a Goldfarb, 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3541 - 3544, je nutno se zmínit o tom, že některé jiné varianty buněk NIH3T3 životnost neztrácejí, avšak ve stejných prostředích zachovávají klidový stav. Transfekce DNA v těchto buňkách při použití konstrukcí pLTR-trkB a pLTR-hyg, popsaných ve Squinto a další, 1991, *Cell*, 65, 1 - 20, byla uskutečněna podle publikace Wigler a další, 1979, *Cell* 16, 777 - 785. Buněčné kultury buněk COS a transfekce pomocí pCMX-LNGFR byly prováděny podle Squinto a další, 1991, *Cell* 65, 1 - 20. Zkoušky na přežívání neuronů při použití neuronů ganglií dorsálních kořenů kuřete byly prováděny podle publikace Rodriguez-Tebar a Barde, 1988, *The Journal of Neuroscience* 8, 3337-3342.

7.1.2 Faktory

Příprava, čištění a radioaktivní značení rekombinantního lidského BDNF a NT-3, produkovaného v buňkách CHO byly popsány v publikaci Squinto a další, 1991, *Cell* 65, 1 - 20. NGF myši byl získán od Bioproducts, Indianapolis, IN. Faktor bFGF byl získán od R a D Systems, Inc., Minneapolis, MN.

7.1.3 Zkoušky na přežívání, proliferaci a příjem thymidinu

Zkoušky na přežívání a proliferaci byly prováděny v podstatě způsobem podle publikací Zhan a další, 1987, *Oncogene* 1, 369 - 376, Zhan a Goldfarb, 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3541 - 3544. Zkoušky na přežívání byly prováděny tak, že buňky byly naneseny na plotny, opatřené povlakem

poly-D-lysinu/fibronectinu, pěstovány až do získání 20% souvislé vrstvy a pak pěstovány 5 dnů v definovaném prostředí v přítomnosti nebo nepřítomnosti faktoru. Stupeň přežívání byl hodnocen mikroskopicky stupnicí "-" v případě, že žádné buňky nepřežily až do "+++" v případě souvislé vrstvy přežívajících buněk. Při zkouškách na proliferaci byly buňky nanесeny na plotny do přibližně 0,5% souvislé vrstvy, byly užity plotny, opatřené povlakem poly-D-lysinu/fibrolactinu a buňky bñlñ pěstovány 8 dnů bez přidání faktoru nebo v přítomnosti faktoru a pak byly buňky počítány po rozrušení vrstvy trypsinem na počítacím zařízení Coulter counter. Při zkouškách syntézy DNA byly buňky nanесeny na plotny v prostředí s obsahem 3 % telecího séra a po dosažení rovnovážného stavu byly na 14 dnů přidány různé faktory. Pak bylo prostředí doplněno ³H-thymidinem v množství 1 mikroCurie na 1 ml na dobu 2 hodiny. Pak bylo stanoveno zařazení radioaktivně značeného materiálu do materiálu, nerozpustného v TCA podle publikace Cavalieri a Goldfarb 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 3544 - 3560.

7.1.4 Izolace RNA a analýza northerm blot

Uvedené zkoušky byly prováděny způsobem, popsaným v publikaci Maisonnier a další, 1990, Neuron, 5, 501 - 509.

7.1.5 Izolace bílkoviny a analýza western blot

Za účelem detekce změn fosforylace tyrosinu v závislosti na přidávání jednotlivých faktorů byly buňky uloženy na 1 hodinu do definovaného prostředí, prostého séra, pak byly na 5 minut přidány označené faktory. Pak byly buňky promyty roztokem chloridu sodného s fosfátovým pufrem (PBS) s 1 mM orthovanadičnanem a rozrušeny v pufru RIPA (PBS s obsahem 1 % NP40, 0,1 % SDS, 0,5 % deoxycholátu, 1 mM PMSF,

1 mM orthovanadičnanu a 0,14 jednotky/ml aprotininu). Při provádění pokusů z obr. 11A byl materiál z rozrušených buněk vysrážen pomocí monoklonální protilátky proti fosfotyrosinu, konjugované s agarosou a označené 4G10 (FOKXNY Sp2-derivát myelomu x slezinné buňky BALB/c), materiál byl získán od Upstate Biotechnologies, Inc. Imunologicky vysrážený materiál byl promyt puforem, v němž byly buňky rozrušeny, pak byl za varu uveden do suspenze v pufru, obsahujícím SDS a v tomto pufru byl nanášen na 6% SDS-akrylamidový gel a podroben imunoblotové analýze při použití protilátky proti fosfotyrosinu 4G10. V případě pokusů podle obr. 11B byl rozrušený buněčný materiál přímo podroben elektroforéze na 8% SDS-akrylamidovém gelu a pak byla prováděna imunoblotová zkouška při použití protilátky 4G10. Zkoušky byly provedeny při použití membrán Immobilon-P. Po aplikaci primární anti-fosfotyrosinové protilátky 4G10 byla k detekci použita kozí polyklonální protilátka proti myším tkáním, značená ^{125}I .

7.2. Výsledky

7.2.1 BDNF a NT-3 jako faktory, nutné pro přežívání buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, v nepřítomnosti LNGFR

Aby bylo možno prozkoumat funkční schopnosti receptoru trk při jeho expresi v buňkách, odlišných od nervových buněk, byla provedena současná transfekce svrchu uvedené varianty buněk NIH3T3 při použití konstrukce trkB pro expresi, pLTR-trkB podle publikace Squinto a další, 1991, Cell, 65, 1 - 20 a značícího genu pro hygromycin k usnadnění selekce, pLTR-hyg podle Murphy a Efstratiadis, 1987, Proc. Natl.Acad.Sci., USA, 84, 8277 - 8281. U uvedené varianty buněk NIH3T3 nedochází k expresi zjištěitelného množství LNGFR, jak je možno prokázat přímým zesílením s radioaktivně značeným faktorem NT-3, jak

získat buňky, které vytvářejí rostoucí kolonie působením BDNF nebo NT-3.

Aby bylo možno stanovit, zda většina buněk po transfekci trkB může odpovídat na BDNF nebo na NT-3 nebo zda svrchu uvedené kolonie jsou tvořeny vzácnými klony buněčné populace po transfekci, byly buňky po transfekci trkB nejprve podrobeny selekci na prostředí, obsahujícím 10 % telecího séra a hygromycin. U těchto buněk dochází k expresi většího množství transkriptů trkB, jak je zřejmé ze spodní části obr. 9B a k expresi prokazatelného množství bílkoviny trkB, jak je možno prokázat chemickým zesíťením s radioaktivně značeným NT-3 a jak je zřejmé z obr. 7A, dráhy 5 a 6. Počet receptorů trkB v těchto buňkách je nízký ve srovnání s počtem molekul LNGFR, k jejichž expresi dochází v buňkách COS po přechodné transfekci konstrukcí pro expresi LNGFR, jak je zřejmé z obr. 7A při srovnání drah 1, 2 a 5, 6. Buňky, u nichž dochází k expresi trkB pak byly zkoumány na přežívání při pokusech, při nichž byly buňky nanášeny na plotny živného prostředí s poměrně vysokou hustotou, do 20% souvislé vrstvy, a to na definovaném prostředí nebo na definovaném prostředí, doplněném 5 nM bFGF nebo jednotlivých neurotrofinů. V průběhu několika dnů bylo možno pozorovat na definovaném nedoplněném prostředí nebo na prostředí, doplněném pouze NGF téměř úplné uhynutí buněk, jak je znázorněno na obr. 9A. Je překvapující, že v případě kultur buněk, u nichž dochází k expresi trkB je možno pozorovat souvislé vrstvy buněk v případě přidání bFGF, BDNF nebo NT-3, což je průkazem poměrně rovnoměrného přežívání buněk, jak je také zřejmé ze spodní části obr. 9A. Přežívání buněk bylo podporováno bFGF, avšak nikoliv ostatními neurotrofiny v kulturách původních buněk NIH3T3, jak je zřejmé z horní části obr. 9A, v kulturách buněk, u nichž byla provedena transfekce pouze s použitím samotného pLTR-hyg a v kulturách buněk, obsahujících vektor pro expresi LNGFR.

je zřejmé z obr. 7A, v němž jsou buňky, u nichž dochází k expresi LNGFR v drahách 1 a 2 srovnány s buňkami NIH3T3 v drahách 3 a 4. Je také možno provést vazbu ^{125}I NGF na neporušených buňkách. Při analýze northern blot rovněž nebylo možno prokázat mRNA pro LNGFR v buňkách NIH3T3, přesto že tuto mRNA bylo možno snadno prokázat v buňkách PC12, kde bylo patrně přítomno 100 000 molekul LNGFR v jedné buňce nebo v buňkách SH-SY5Y, u nichž dochází k expresi sotva prokazatelných množství LNGFR podle publikací Chao a další, 1986, Science 232, 518 - 521, Sonnenfeld a Ishii, 1982, J. Neurosci. Res., 8, 375 - 391, a jak je znázorněno také v horní části na obr. 7B. Po současné transfekci pomocí pLTR-trkB a pLTR-hyg byly buňky NIH3T3 znovu nanесeny na plotny do 20% souvislé vrstvy a pak buď podrobeny selekci na definovaném prostředí, nebo bylo toto prostředí ještě doplněno 5 nM některého z faktorů bFGF, NGF, BDNF nebo NT-3, nebo byly buňky pěstovány v úplném prostředí, obsahujícím hygromycin a telecí serum, jak je znázorněno na obr. 8. Přímá selekce na definovaném prostředí prokázala, že všechny pěstované buňky přežily v případě, že prostředí bylo doplněno faktorem bFGF, jak bylo očekáváno. Mimoto nebylo možno prokázat tvorbu žádných kolonií v případě, že definované prostředí nebylo nikým doplněno nebo bylo doplněno pouze NGF, což ukazuje na to, že přidáním trkB není možno zajistit růstový signál bez jeho stimulace vaznými látkami. Na rozdíl od tohoto pozorování bylo možno prokázat několik kolonií v případě, že buňky po transfekci pLTR-trkB byly pěstovány na definovaném prostředí, doplněném BDNF nebo NT-3. Poněkud větší množství kolonií bylo možno prokázat po přidání BDNF ve srovnání s přidáním NT-3, jak je zřejmé z levé strany obr. 8. Žádné kolonie nebylo možno pozorovat v případě buněk NIH3T3 bez transfekce, u buněk po transfekci pouze s použitím pLTR-hyg nebo u buněk, obsahujících konstrukci pro expresi LNGFR. To znamená, že v případě transfekce buněk NIH3T3 pomocí konstrukce pLTR-trkB bylo možno

Zkoušky na závislost účinku na dávce při přežívání buněk ukázaly, že koncentraci bFGF, BDNF a NT-3 řádu pikomolů byly účinné, přičemž účinnost bFGF a BDNF byla zřejmá v rozmezí 0,5 až 5 pM a účinnost NT-3 byla rozeznatelná při 50 pM, jak je zřejmé z obr. 9B. Avšak NGF nebyl účinný ani při 100 až 1000krát vyšší koncentraci, jak je zřejmé z obr. 9A. To znamená, že BDNF byl téměř stejně účinný jako bFGF při podpoře přežívání buněk NIH3T3 po transfekci trkB, kdežto NT-3 byl při této zkoušce alespoň 10x méně účinný než BDNF.

7.2.2 BDNF a NT-3 jako proliferativní faktory pro buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB

Aby bylo možno stanovit, zda aktivace trkB působením BDNF a/nebo NT-3 má mitogenní účinky nebo zda má nějaký vliv na přežívání buněk NIH3T3, byly obě uvedené látky zkoušeny na svou schopnost vyvolat syntézu DNA u buněk, u nichž dochází k expresi trkB, při zkouškách na příjem thymidinu. Buňky byly pěstovány až do vzniku souvislé vrstvy ve 3% séru, po dosažení souvislé vrstvy již nebylo možno pozorovat mitotické buňky. Za těchto podmínek také nedocházelo k úhynu buněk. Pak byly přímo do prostředí přidávány různé faktory a 12 hodin po jejich přidání byl sledován příjem thymidinu, značeného ^3H . Jak je zřejmé z obr. 10A, pouze faktor bFGF byl schopen vyvolat syntézu DNA u původních buněk NIH3T3, účinná syntéza DNA byla vyvolána také působením pikomolárních koncentrací BDNF a NT-3 u buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, jak je zřejmé z obr. 10B. Závislost dávky na účinku pro BDNF a NT-3 při těchto zkouškách zhruba odpovídá závislosti, pozorované u těchto látek při zkouškách na přežívání, jak je zřejmé ze srovnání obr. 9B a 10B. NGF nevyvolá syntézu DNA ani v původních buňkách ani v buňkách, u nichž dochází k expresi trkB, jak je zřejmé z obr. 10A a 10B.

BDNF a NT-3 byly také zkoušeny na svou schopnost vyvolat dlouhodobou proliferaci buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB. Při těchto zkouškách byly jednotlivé faktory zkoumány na svou schopnost zvýšit rychlost růstu u buněk, u nichž dochází k expresi trkB a které byly velmi řídké nanесeny na plotny s živným prostředím. Na rozdíl od uhynutí buněk, které je možno pozorovat při nanášení těchto buněk s velkou hustotou na definované živné prostředí bez mitogenů je na tomto prostředí při řídké nanесených buňkách možno pozorovat kontinuální proliferaci bez pozorovatelného uhynutí buněk, například při 0,5% vytvoření souvislé vrstvy. Kromě očekávané odpovědi na bFGF je možno u buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB možno pozorovat urychlení růstu v závislosti na působení BDNF a NT-3, jak je zřejmé z obr. 10C. Původní buňky NIH3T3 reagují pouze na přítomnost bFGF. Také v tomto případě je závislost účinku na dávce pro BDNF a NT-3 v případě proliferace obdobná jako závislost, která byla pozorována při zkouškách na přežívání a na příjem thymidinu, jak je zřejmé ze srovnání obr. 9B, 10B a 10C.

7.2.3 U fibroblastů, u nichž dochází k expresi trkB a u primárních neuronů, závislých na BDNF je možno pozorovat pro BDNF obdobné křivky závislosti účinku na dávce

Aby bylo možno stanovit, zda k účinkům BDNF na přežívání a na růst buněk u fibroblastů s expresí trkB dochází v oblasti fyziologicky přijatelných koncentrací neurotrofinu, byla sledována koncentrace BDNF, nutná k dosažení těchto účinků s koncentrací, již je zapotřebí při klasické zkoušce na přežívání nervových buněk při použití neuronů, závislých na BDNF, izolovaných z ganglií dorsálních kořenů DRG. Při použití rekombinantního lidského BDNF byla získána téměř nerozeznatelná křivka závislosti účinku na dávce pro přeží-

vání neuronů (obr. 10B), stejně jako to bylo popsáno pro BDNF, čištění z mozku vepře podle publikace Rodriguez-Tebar a Barde, 1988, The Journal of Neuroscience 8, 3337 - 3342. Tato křivka závislosti odpovědi na dávce je u primárních neuronů velmi podobná svrchu popsané křivce pro přežívání a proliferaci u fibroblastů, jak je zřejmé ze srovnání obr. 10D s obr. 9B, 10B a 10C. To znamená, že u fibroblastů, u nichž dochází k expresi trkB v nepřítomnosti LNGFR je možno předpokládat citlivost k BDNF, která je podobná citlivosti primárních nervových buněk, závislých na BDNF.

7.2.4 BDNF a NT-3 aktivují fosforylaci tyrosinu u buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB

Aby bylo možno sledovat signální dráhy, k jejichž spuštění dojde vazbou neurotrofinů na trkB, byla sledována fosforylace tyrosinu u buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, po působení bFGF nebo neurotrofinů. Na původní buňky NIH3T3 nebo na buňky, u nichž dochází k expresi trkB se při této zkoušce působí 5 minut určitým faktorem, pak se buňky rozruší a provádí se imunoprecipitace při použití protilátky proti fosfotyrosinu. Vysrážené bílkoviny se oddělí elektroforézou na gelu a prokazují imunoblotovou zkouškou při použití protilátek proti fosfotyrosinu. U buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB je po působení BDNF nebo NT-3 možno prokázat hlavní produkt fosforylace tyrosinu s molekulovou hmotností přibližně 145 000, což odpovídá známé velikosti trkB, jak je zřejmé z obr. 11B. Tento produkt není možno pozorovat u původních buněk po působení kteréhokoliv z uvedených faktorů ani u buněk, u nichž dochází k expresi trkB a které byly vystaveny působení bFGF nebo NGF, jak je zřejmé z obr. 11A. Tyto údaje ukazují, že hlavním produktem fosforylace s molekulovou hmotností 145 000, který je možno získat působením BDNF a NT-3, je trkB.

Působením BDNF a NT-3 na buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, dochází také k fosforylaci tyrosinu za vzniku bílkoviny s molekulovou hmotností 41 000, jak je zřejmé z obr. 11B. Působením bFGF dochází také k fosforylaci bílkoviny o molekulové hmotnosti 41 000 jak u původních buněk NIH3T3, tak u buněk s expresí trkB, jak je rovněž zřejmé z obr. 11B. Podle výsledků, popsanych v publikaci Boulton a další, 1991, Cell 65, 663 - 677, může tento fosfoprotein odpovídat ERK2, jde o serin/threonin kinázu, která je aktivována, k fosforylaci tyrosinu u buněk PC12 dochází působením NGF. Tyto údaje jsou v souladu s pozorováním, že neurotrofin a receptory růstového faktoru fosforylují některé stejné cílové látky v nervových buňkách i v buňkách odlišného původu.

7.3. Diskuse

Bylo prokázáno, že trkB po expresi v buňkách PC12, pozitivních na LNGFR může zprostředkovat růst nervových vláken jako odpověď na působení BDNF a NT-3 podle publikace Squinto a další, 1991, Cell 65, 1 - 20. Jak bylo svrchu uvedeno, je nyní možno prokázat, že látka ze skupiny trk může zprostředkovat biologickou odpověď na neurotrofiny bez současného působení LNGFR. BDNF a NT-3 mohou působit na přežívání a růst buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB, avšak nikoliv k prokazatelné produkci LNGFR. Tyto vlivy na přežívání a růst buněk je možno pozorovat se závislostí účinku na dávce, která je velmi podobná závislostem, pozorovaným při přežívání primárních neuronů v kultuře. Mimoto je také působení BDNF a NT-3 na fibroblasty, u nichž dochází k expresi trkB biologicky i biochemicky analogické působení známého růstového faktoru, bFGF.

Uvedené poznatky potvrzují, že receptory pro neurotrofiny nejsou neobvyklým jevem mezi receptory pro tyrosinkiná-

zu, a to jak pokud jde o jejich požadavky na interakce s ostatními složkami receptorů, tak pokud jde o typy signálů, které jsou schopné převádět. To znamená, že zjevně jedinečné působení neurotrofinů, kterým je podpora přežívání nervových buněk a jejich diferenciace je pravděpodobně možno připsat poměrně omezené distribuci receptorů trk u nervových buněk po mitose, spíše než vyjímečným vlastnostem receptorového systému. Na druhé straně je možno ze získaných informací usoudit, že zjevné neurotrofní účinky tradičních růstových faktorů včetně látek ze skupiny FGF jsou zprostředkovány převodem signálu, který se překrývá s převodem, využívaným v případě neurotrofinů.

Identifikace receptorů, využívaných neurotrofinů a vytvoření neneuronových buněčných linií, rovněž reagujících přežíváním a růstem na tyto faktory by mělo zlepšit porozumění situaci, při níž tytéž signály mohou být nakonec v neuronech a neneuronových buňkách interpretovány odlišným způsobem. Je nutno uvést, že buňky NIH3T3, u nichž dochází k expresi trkB jsou prvním příkladem immortalizované buněčné linie, která je schopna reagovat na neurotrofiny v koncentraci, podobné fyziologickým koncentracím. U buněk PC12 je k odpovědi zapotřebí přibližně stonásobného množství NGF, než jakého je zapotřebí k vyvolání odpovědi u primárních neuronů. Tyto studie ukazují, že zkoušky na proliferaci a přežívání buněk NIH3T3, u nichž dochází k expresi nového receptoru tyrosinkinázy je možno využít jako velmi vhodného systému pro molekulární klonování vazných látek pro tyto receptory. Mimoto může systém s použitím těchto buněk také podat informaci o tom, jak mohou neurotrofní faktory zabránit uhynutí nervových buněk. Nyní je tedy možno prokázat, zda jsou v případě neurotrofinů využívány tytéž nebo odlišné cesty k zábraně uhynutí nervových buněk a buněk odlišného původu.

Důležitá informace, která vyplývá ze získaných údajů se týká úlohy LNGFR s vazným místem s nízkou afinitou pro všechny známé neurotrofiny. Řada studií ukazuje, že při zavádění LNGFR do buněk, odlišných od nervových buněk nedochází k reakci na neurotrofiny u těchto buněk, jak bylo popsáno v publikacích Hempstead a další, 1989, Science, 243, 373 - 375, Sehgal a další, 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2242 - 2246. Najprímějšší důkaz, týkající se funkční úlohy LNGFR při zprostředkování převodu signálu byl získán v pokusu, v němž byl LNGFR znovu zaváděn do mutanty buněk PC12, která zjevně ztratila veškerou schopnost vázat NGF a odpovědět na přítomnost tohoto faktoru, jak bylo popsáno v Hempstead a další, 1989, Science 243, 373 - 375, Sehgal a další, 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2242 - 2246. Výsledné buňky po transfekci obsahovaly vazná místa s vysokou i nízkou afinitou pro NGF a byly také poněkud schopné reagovat na přítomnost NGF. Bylo předpokládáno, že tento pokus prokazuje, že LNGFR je jedinou vaznou molekulou pro NGF, k jejíž expresi dochází v buňkách PC12 a že tato molekula spolupracuje s další částí bez vazné schopnosti pro NGF ale se schopností převádět LNGFR na receptor s vysokou afinitou, schopný převádět signál. Pozorování, že bílkoviny trk jsou schopné vázat neurotrofiny a že u buněk PC12 za běžných podmínek dochází k expresi trkA tedy vyžaduje reinterpretaci uvedeného pokusu. Publikace, vydávané v současné době se neshodují v názoru, zda trkA vyžaduje LNGFR pro vznik vazných míst pro NGF s vysokou afinitou. Je nutno zdůraznit, že pouze jedinou bílkovinu, o níž je nyní známo, že odpovídá trkA je možno zesíťovat s NGF za vysoce afinitních podmínek vazby, jak bylo popsáno v Hosang a Shooter, 1985, J. Biol. Chem., 260, 655 - 662. Mimoto protilátka, která účinně brání vazbě NGF na LNGFR blokuje veškerou nízkoafinitní vazbu, avšak nikoliv veškerou vysoce afinitní vazbu NGF a nebrání odpovědi buněk PC12, vyvolané NGF, jak bylo popsáno v Weskamp a Reichardt, 1991, Neuron, 6, 649 - 663. Svrchu uvedené funkční

8. Příklad: Klonování molekul receptoru pro tyrosinkinázu

8.1. Materiály a metody

Na obr. 12E označují římské číslice oblasti homologie tyrosinkinázy, tak jak byly popsány v publikaci Hanks a další, 1988, Science, 241, 42 - 52. Prokázané oblasti homologie řetězce na obr. 12E, které jsou podtrženy a které jsou uloženy v katalytické oblasti těchto bílkovin byly užity při konstrukci degenerovaných oligonukleotidových primerů, které pak byly užity při PCR-reakci při použití cDNA z mozku krysy, a to buď dospělé krysy nebo v embryonálním stadiu E13. Výsledné amplifikované fragmenty DNA byly klonovány po uložení do plasmidů, byl analyzován jejich řetězec a takto získané řetězce DNA pak byly srovnávány s řetězcem všech dosud známých tyrosinkináz.

Matrice cDNA byly připraveny reversní transkripcí RNA z mozku krysy, a to dospělé krysy i krysy ve stádiu E13 při použití oligo-d(T)-primerů. Kombinační PCR-reakce s oběma skupinami cDNA byly prováděny při použití šesti kombinací primerů po směru řetězce i v opačném směru, jak je uvedeno v následující tabulce I a na obr. 12A, primery byly navazovány při teplotě 40 a 45 °C. Podíly materiálu z PCR-reakcí byly podrobeny elektroforéze na agarosovém gelu, pak byly naneseny na nylonovou membránu a jako sondy byly užity "vnitřní" radioaktivně značené degenerované oligonukleotidy, homologní k oblasti VII homologie. V závislosti na relativní intensitě získaných hybridizačních signálů bylo pro další analýzu vybráno pět PCR-reakcí, které se vyznačovaly uvedenými vlastnostmi.

údaje tedy přesvědčivě prokazují, že LNGFR zřejmě není nezbytný pro odpověď na fyziologické dávky BDNF a NT-3, zprostředkovanou trkB. Je však možno, že LNGFR poněkud mění odpovědi, zprostředkované trkA nebo trkB. LNGFR by také mohl hrát signální úlohu při přenosu, v němž nejsou zahrnuty faktory typu trk, přestože zjevná neschopnost BDNF nebo NT-3 vyvolat odpověď u buněk PC12 činí tuto možnost méně pravděpodobnou, jak bylo popsáno v Squinto a další, 1991, Cell 65, 1 - 20. Zjištění, že LNGFR má širší distribuci než faktory trk podle Bothwell, 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 165, 63 - 70, zvláště v případě cílových tkání pro inervaci, které produkují neurotrofiny, avšak o nichž není známo, že by na ně reagovaly, patrně podporuje spíše "imunomobilisační" nebo podobnou úlohu než signální úlohu LNGFR.

Svrchu uvedené výsledky přiřazují neurotrofiny a bílkoviny ze skupiny trk ke zvětšující se skupině systémů faktoru a receptoru, v nichž na tentýž receptor může působit celá skupina příbuzných vazných látek, jak bylo popsáno v Cross a Dexter, 1991, Cell, 64, 271 - 281. K expresi NT-3 a BDNF dochází v průběhu vývoje dramaticky recipročním způsobem, jak bylo popsáno v Maisonpierre a další, 1990a, Neuron, 5, 501 - 509. K expresi genu pro NT-3 dochází v časném vývoji na daleko vyšší úrovni než k expresi genu pro BDNF a pak se tato exprese snižuje, kdežto exprese genu pro BDNF se zvyšuje. Tento reciproční vztah mezi expresí NT-3 a BDNF je zvláště zajímavý v případě, že se bere v úvahu zjištění, že trkB může působit jako receptor BDNF a v menší míře také jako receptor NT-3. Vyšší množství NT-3 v časném vývoji může umožnit jeho obecnější působení na receptor trkB a po poklesu exprese pak patrně pouze na neidentifikované receptory, specifické pro NT-3.

T a b u l k a I

PCR č.	teplota °C	zdroj cDNA	primery
1	40	El3	DLATRN-DVWSLG
2	40	dospělá	DLATRN-DVWSYG
3	40	El3	DLATRN-DVWSYG
4	40	dospělá	DLAARN-DVWSLG
5	40	El3	DLAARN-DVWSLG

Amplifikované fragmenty DNA z těchto PCR-reakcí, rozdělené podle velikosti byly klonovány v plasmidech následujícím způsobem: každý z pěti spojených vzorků PCR byl rozštěpen pomocí enzymů XhoI a SstI k rozštěpení míst na zakončení primerů, tak jak bude dále uvedeno a pak byla provedena elektroforéza na 6% polyakrylamidovém gelu. DNA o 225 bp $\pm$ 25 bp po štěpení XhoI/SstI a po barvení ethidium-bromidem byla čištěna elucí z příslušných vyříznutých fragmentů polyakrylamidového gelu. DNA po eluci byla klonována v kompatibilním místě působení enzymů XhoI/SstI v plasmidu Bluescript II KS(-), uloženém do DH5alfa E. coli pomocí otevření pórů působením elektrického proudu, pak byl mikroorganismus nanesen na plotny agaru pro selekci. Přibližně 200 bakteriálních kolonií, odolných proti ampicilinu bylo z každé transformace PCR naočkováno na mikrotitrační plotny, obsahující 96 vyhloubení a byly skladovány v glycerolu při teplotě -80 °C. Jednotlivé kolonie ze svrchu uvedených pěti vzorků PCR klonů byly analyzovány analýzou řetězce DNA plasmidu po čištění běžnými postupy.

8.2. Výsledky a diskuse

Oligonukleotidové primery, odpovídající konzervovaným oblastem známých molekul tyrosinkinázy byly užity k amplifikaci a klonování kódových řetězců DNA pro nové molekuly receptoru tyrosinkinázy. Řetězce aminokyselin, vybrané ze skupiny tyrosinkináz a popsané v publikaci Hanks a další, 1988, *Science*, 241, 42 - 52, byly srovnány, jak je zřejmé z obr. 12E a byly identifikovány oblasti homologie v katalytické oblasti těchto bílkovin a použity ke konstrukci degenerovaných oligonukleotidových primerů, tak jak bylo svrchu uvedeno v tabulce I a na obr. 12A. Pak byly primery použity k uskutečnění PCR-reakce, jako matrice byla užita cDNA z mozku dospělých krys nebo z mozku krys v embryonálním stadiu E13. Výsledné amplifikované fragmenty DNA pak byly klonovány v plasmidu Bluescript II KS(-), byl analyzován jejich řetězec a řetězce DNA byly srovnávány s řetězcí známých tyrosinkináz.

Na obr. 12B je znázorněn řetězec aminokyselin, pro něž jsou kódem uvedené klony, řetězce jsou homologní řadě řetězců známých tyrosinkináz. Pět klonovaných molekul z obr. 12B má homologii s trk, sestavou CSFlr/PDGFT, ret, eck(alfa), a eck(beta), tyto řetězce byly označeny Rtk-1, Rtk-6, Rtk-7, Rtk-8 a Rtk-9. Na obr. 12C jsou uvedeny řetězce DNA pro každý z těchto pěti klonů tyrosinkinázy a jsou uvedeny také informace o zdroji cDNA a primery, užité k amplifikaci každého klonu. Uvedeno je také srovnání těchto řetězců DNA a jejich aminokyselinových řetězců, zřejmá je příbuznost různých řetězců tyrosinkináz.

Na obr. 12B jsou uvedeny řetězce aminokyselin, získané při použití cDNA krysího mozku po jejím získání při použití sondy cDNA Rtk-1, tak jak je znázorněno na obr. 12C.

Klon cDNA obsahuje řetězec, totožné s Rtk-1 a další segment genu pro řetězec 1440 aminokyselin, který je založen na srovnání trkA a trkB, tento řetězec může odpovídat karboxyterminálnímu zakončení produktu genu Rtk-1.

9. Příklad: Klonování molekuly receptoru, podobné trk

9.1. Materiály a metody

Klonování pomocí PCR bylo provedeno v podstatě stejně jako svrchu, avšak byla užita cDNA z buněčné linie lidského neuroblastomu SY5Y jako matrice a dále byly užity oligonukleotidové primery z tabulky II.

9.2. Výsledky a diskuse

Cílem této práce byla identifikace řetězců DNA, blíže příbuzných genům trk a trkB pomocí PCR. Z tohoto důvodu byly zkonstruovány oligodeoxynukleotidové primery, odpovídající bílkovinným oblastem, silně konzervovaným u všech proteinkináz, avšak tak, aby současně došlo k amplifikační reakci ve smyslu řetězců, podobných trk. Například primer trk-10r na obr. 13A odpovídá řetězci -PIRWWMPPE-, který je totožný pro trk a trkB, avšak i nejbližší příbuzné látky, to znamená insulin a insulinu podobné receptory růstových faktorů již v tomto místě obsahují dvě substituce aminokyselin. Na obr. 13A je znázorněno srovnání oblastí tyrosinkinázy u členů skupiny insulinových receptorů, u nichž již byly identifikovány konzervované oblasti řetězce a je uvedeno uložení všech primerů, které byly užity.

Při použití cDNA z buněčné linie lidského neuroblastomu SY5Y jako matrice byla provedena PCR-reakce s různými kombinacemi primerů. Produkty DNA pak byly rozštěpeny res-

trikčními enzymy, schopnými štěpit řetězce trk a trkB a odolný materiál byl znovu amplifikován a klonován. Řetězce jednotlivých klonů pak byly analyzovány. Řetězce aminokyselin, odvozené od těchto řetězců DNA prokázaly přítomnost fragmentů čtyř nových potenciálních receptorů. Tyto fragmenty, které byly označeny Rtk-2, Rtk-3, Rtk-4 a Rtk-5 byly znázorněny na obr. 13B (Rtk-4 a Rtk-5), na obr. 14 (Rtk-2) a na obr. 15 (Rtk-3) a byly srovnány s odpovídajícími oblastmi lidského trk na obr. 13C. Rtk-2 je znázorněn pro srovnání spolu s lidským trk, trkB krysy, receptorem pro růstový faktor insulinového typu a insulinovým receptorem na obr. 13D.

Oligodeoxynukleotidové primery, uvedené v následující tabulce II byly užity při přípravě PCR-fragmentů (zakončení místa restrikčního působení, které bylo užito pro klonování je znázorněno velkými písmeny a degenerace v určité poloze je znázorněna tak, že příslušná písmena jsou uvedena v závorce):

T a b u l k a II

Rtk-2 and Rtk-3

TRK-9 ACGTCTCGAG-GC(TCAG) -GG(TCAG) -ATG-GT(TCAG) -
TA(TC) - (TC)T
TRK-10r CATGTCTAGA-GGC-ATC-CA(TCAG) -C(GT) (AGT) -
AT (TCAG) - GG

Rtk-4

TRK-5 ACGTCTCGAG-AA(AG) -AT(TCA) -GG(TCAG) -GA(TC) -
TT(TC) -GG
TRK-10r CATGTCTAGA-GGC-ATC-CA(TCAG) -C(GT) (AGT) - AT
(TCAG) - GG

Rtk-5

TRK-9 ACGTCTCGAG-GC(TCAG) -GG(TCAG) -ATG-GT(TCAG) -
 TA(TC) - (TC) T
TRK-6r CATGTCTAGA-CC- (GA)AA- (GA)TC- (CTGA)CC-
 (TGA)AT- (CT)TT .

Zvláště zajímavé jsou Rtk-2 a Rtk-3. V případě, že odvozené řetězce aminokyselin byly použity při analýze genové knihovny, byly získány hodnoty 67,0 (03/91) a modifikovaná hodnota EMBL 26,0 (02/91) při použití TFASTA, nejvyšší hodnoty pro homologii byly získány pro trkB a pro ostatní řetězce typu trk. Rtk-2 a Rtk-3 obsahují řetězec YxxDYY, který je charakteristický pro podskupinu trk/insulin-R. Oba řetězce mají substituci L místo F ve skupině DFG, která je velmi silně konzervovaná u všech kináz.

V případě, že byly sondy Rtk-2 a Rtk-3 hybridizovány metodou northern blot, nebyl získán při použití RNA SY5Y žádný signál. Řetězec Rtk-2 hybridisoval s pásem o 6 až 7 kb z RNA z jiných linií, zejména z buněk CHPL00, SKES a LAN5. Řetězec Rtk-3 hybridisoval s pásem o 5 kb z RNA z buněk SKN-SH a LAN5. Při vyšetření $1,5 \times 10^6$ klonů z baňky cDNA SY5Y v lambda ZPA II při použití sondy Rtk-2 bylo získáno pět pozitivních klonů s uloženými řetězci v rozmezí 1,4 až 3 kb.

Údaje o řetězci Rtk-2, tak jak jsou znázorněny na obr. 14 ukazují, že nukleotidy 801 až 875 jsou zřejmě kódovými řetězci pro transmembránovou oblast, nukleotidy 1002 až 1850 obsahují oblast pro tyrosinkinázu a nukleotidy 1 až 800 jsou kódovým řetězcem pro kontinuální otevření čtecí rámec, zahrnující oblast pro vazbu vazných látek. Za oblastí pro tyrosinkinázu následuje prodloužení, obsahují-

cí 180 aminokyselin na rozdíl od látek typu trk, které končí krátce za oblastí pro tyrosinkinázu.

Částečný řetězec aminokyselin pro Rtk-3 je znázorněn na obr. 15, kde je také znázorněna přítomnost uvedeného podloužení za oblastí pro tyrosinkinázu, zjevná je silná homologie s Rtk-2.

Srovnání řetězce Rtk-3 s řetězcem pro Rtk-2, sloučeniny ze skupiny trk, IGFR a receptor insulinu, tak jak je uvedeno na obr. 16 ukazuje, že řetězce Rtk-2 a Rtk-3 vykazují nejvyšší homologii a jde tedy patrně o novou podskupinu receptorů tyrosinkinázy.

10. Funkční spojení trk s neurotrofiny v gangliích dorsálních kořenů u krysího embrya

10.1. Materiály a metody

Ganglia dorsálních kořenů DRG krysího embrya E14 byla vyňata a uložena do prostředí F14, doplněného 5 % koňského séra podle publikace Lindsay a další, 1985, Dev. Biol., 112, 319. Pro zkoušky na explantátech byla ganglia uložena na misky s průměrem 35 mm, předem opatřené povlakem polyornithinu 1 mg/ml a lamininu 50 mikrogramů/ml. Ganglia byla pěstována v přítomnosti nebo v nepřítomnosti neurotrofinů při teplotě 37 °C při vysoké vlhkosti v atmosféře s obsahem 3 % oxidu uhličitého. Růst nervových vláken byl hodnocen stupnicí 0 až 5. Na konci pěstování byla ganglia opláchnuta PBS a pak byla připravena RNA při použití guanidiniumthiokyanátu podle publikace Chomczynski a Sacchi 1987, Analytical Biochem. 162, 156. Při zkouškách na disociovaných buňkách byla ganglia inkubována 30 minut s 0,1% trypsinem při teplotě 37 °C, pak byla ganglia rozetřena a znovu nanesena na 2,5 hodin na živné

prostředí. Pak byly nervové buňky odděleny a rozděleny do vyhloubení s průměrem 16 mm, předem opatřených povlakem 100 mikrogramů/ml polyornithinu a 50 mikrogramů/ml lamininu. Nervové buňky bñlñ pěstovány 24 hodin v přítomnosti nebo nepřítomnosti neurotrofinů a byl zaznamenán počet buněk. RNA z tkání byla připravena při použití běžných postupů.

10.2. Výsledky

Při inkubaci DRG s NGF v různých koncentracích došlo k masivnímu růstu nervových vláken z explantátů, účinek byl závislý na dávce, jak je zřejmé z obr. 17. Podobné výsledky byly získány při použití NT-3. K nasycení koncentrace pro tuto odpověď dochází přibližně při 5 ng/ml pro NGF nebo NT-3. Na druhé straně BDNF vyvolává slabší, avšak homogennější odpověď u explantátů DRG, jak je zřejmé z obr. 17.

U ganglií, pěstovaných v přítomnosti nebo v nepřítomnosti různých neurotrofinů byla také sledována úroveň mRNA pro trkA, B a C. U kontrolních DRG, odebraných z krysíh embryí E14 je možno prokázat mRNA pro trkA, B a C, jak je zřejmé z obr. 18a a 19. Jak je znázorněno na obr. 18A, bylo u ganglií, inkubovaných v přítomnosti 50 ng/ml NGF možno prokázat značnou úroveň mRNA pro trkA, avšak nebylo možno prokázat mRNA pro trkB, jak je zřejmé z obr. 18B. Na druhé straně u ganglií, inkubovaných v přítomnosti 50 ng/ml BDNF bylo možno prokázat značné množství mRNA pro trkB, jak je zřejmé z obr. 19B, avšak velmi malé množství tohoto materiálu pro trkA, jak je zřejmé z obr. 19A a žádný materiál pro trkC, jak je zřejmé z obr. 19C. Konečně po působení 50 ng/ml NT-3 bylo možno v gangliích prokázat značné množství mRNA pro trkC a trkA, avšak velmi nízké množství tohoto materiálu pro trkB. Tyto výsledky prokazují, že populace nervových buněk, která v přítomnosti těchto neurotrofinů přežívá obsahuje specifické

ké receptory pro každý z uvedených neurotrofinů. Znamená to, že po inkubaci s BDNF přežívají pouze neurony, obsahující trkB, kdežto po působení NGF přežívají pouze neurony, obsahující trkA. Po působení NT-3 patrně přežívají jak neurony, obsahující trkC, tak ty, které obsahují trkA. Skutečnost, že v určitých buněčných typech se nacházejí specifické receptory pro určité neurotrofiny ukazuje na to, že tyto neurotrofiny je možno užít k podpoře přežití určitých skupin buněk v periferním nervovém systému.

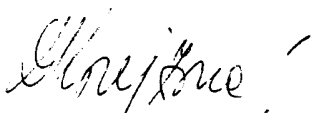
11. Uložení mikroorganismů

Ve veřejné sbírce kultur American Type Culture Collection, ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, byly uloženy následující mikroorganismy:

	<u>číslo</u>
pBluescript SK, obsahující Rtk-2	75052
pBluescript SK, obsahující Rtk-3	75053

Vynález nemá být omezen na popsaná specifická provedení. Je zřejmé, že by bylo možno uskutečnit ještě řadu modifikací rovněž spadajících do rozsahu vynálezu.

Zastupuje:


Dr. EDVINA KOZLOVÁ

P A T E N T O V É N Á R O K Y

8. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se specifická vazba zkoumané látky na trkB prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením schopnosti kompetice se značeným neurotrofinem o vazbu na trkB.

9. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se specifická vazba zkoumané látky na trkB prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením sekundárních biologických účinků vazby neurotrofinu na trkB.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je růst nervových vláken.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je indukce časného genu.

12. Způsob identifikace látky s účinkem neurotrofinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- i) buňka, u níž dochází k expresi trkB vystaví působení zkoumané látky a
- ii) prokazuje se specifická vazba zkoumané látky na trkB, která je v pozitivní korelaci s účinkem typu neurotrofinu.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňka obsahuje rekombinantní gen s kódovým řetězcem pro trkB.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňka dále obsahuje referenční gen pod řízením časného promotoru genu.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňka jako časný promotor obsahuje promotor fos.

16. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňka jako časný promotor obsahuje promotor jun.

17. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se specifická vazba zkoumané látky na trkB prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením vazby zkoumané látky na buněčný povrch.

18. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se specifická vazba zkoumané látky na trkB prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením schopnosti této látky zesílit bílkovinu trkB.

19. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že specifická vazba zkoumané látky na trkB se prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením schopnosti kompetice této látky se značeným neurotrofinem o vazbu na trkB.

20. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se specifická vazba zkoumané látky na trkB prokazuje nebo měří průkazem nebo měřením sekundárního biologického účinku vazby neurotrofinu na trkB.

21. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je tvorba nervových vláken.

22. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je indukce časného genu.

23. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je přežívání buněk.

24. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je proliferace buněk.

25. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je transformace buněk.

26. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekundárním biologickým účinkem je fosforylace trkB.

27. Způsob detekce nebo měření účinnosti neurotrofinu v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- i) zkoumaná látka uvede in vitro do styku s bílkovinou trkB za podmínek, při nichž může dojít k vazbě a
- ii) prokáže se vazba zkoumané látky na bílkovinu trkB, která je v pozitivní korelaci s neurotrofinovým nebo podobným účinkem.

28. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se zkoumaná látka uvede do styku s bílkovinou trkB, vázanou na pevný nosič.

29. Způsob identifikace látky s neurotrofinovým účinkem, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- i) zkoumaná látka uvede in vitro do styku s bílkovinou trkB za podmínek, při nichž může dojít k vazbě a
- ii) prokáže se vazba zkoumané látky na bílkovinu trkB,

kteřá je v pozitivní korelaci s neurotrofinovým nebo podobným účinkem.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se zkoumaná látka uvádí do styku s bílkovinou trkB, vázanou na pevný nosič.

31. Buňka, která

- i) je schopna exprese rekombinantní bílkoviny trkB a
- ii) obsahuje rekombinantní nukleovou kyselinu s obsahem časného promotoru genu.

32. Buňka podle nároku 31, v níž promotorem časného genu je promotor fos.

33. Buňka podle nároku 31, v níž promotorem časného genu je promotor jun.

34. Buňka podle nároků 31, 32 nebo 33, odvozená od buněčné linie PC12.

35. Buňka podle nároků 31, 32 nebo 33, odvozená od buněčné linie NIH3T3.

36. Buněčná linie podle nároku 27, dále obsahující kódový gen pro rozlišitelné označení, schopný exprese pod řízením časného promotoru genu.

37. Buněčná linie fibroblastů, závislá v prostředí, prostém séra na přítomnosti růstového faktoru a obsahující kódovou rekombinantní nukleovou kyselinu pro trkB.

38. TrkB deficientní buňka, získaná inaktivací endogenního genu pro trkB homologní rekombinací.

39. Účinná látka, tvořená v podstatě čistou molekulou, čištěnou způsobem podle nároku 12.

40. Způsob klonování alespoň části genu pro receptor tyrosinkinázy, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- i) amplifikuje kódový řetězec nukleové kyseliny pro tyrosinkinázu pomocí PCR-reakce při použití směsi cDNA molekul jako matrice a při použití oligonukleotidových primerů, odpovídajících oblastem ve známé molekule tyrosinkinázy, přičemž tyto oblasti jsou spojeny s účinností tyrosinkinázy, načež se
- ii) amplifikovaná nukleová kyselina klonuje při použití příslušného vektoru.

41. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeden z oligonukleotidových primerů obsahuje po směru exprese genu primer s řetězcem, uvedeným pro primer 1 na obr. 12A.

42. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeden z oligonukleotidových primerů obsahuje po směru exprese genu primer s řetězcem, uvedeným pro primer 2 na obr. 12A.

43. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeden z oligonukleotidových primerů obsahuje proti směru exprese genu primer s řetězcem, uvedeným pro primer 3 na obr. 12A.

44. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeden z oligonukleotidových primerů obsahuje proti směru exprese genu primer s řetězcem, uvedeným pro primer 4 na obr. 12A.

45. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jeden z oligonukleotidových primerů obsahuje proti směru exprese genu primer s řetězcem, uvedeným pro primer 5 na obr. 12A.

46. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že oligonukleotidové primery jsou tvořeny párem primerů trk-9 a trk-10r z tabulky II.

47. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že oligonukleotidové primery jsou tvořeny párem primerů trk-5 a trk-10r z tabulky II.

48. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že oligonukleotidové primery jsou tvořeny párem primerů trk-9 a trk-6r z tabulky II.

49. V podstatě čištěná nukleová kyselina, klonovaná způsobem podle nároku 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 nebo 48.

50. V podstatě čištěná rekombinantní molekula nukleové kyseliny, tvořená řetězcem nukleové kyseliny, klonovaným způsobem podle nároku 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48.

51. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 12C uveden pro Rtk-1 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

52. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 12C uveden pro Rtk-6 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

53. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 12C uveden pro Rtk-7 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

54. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 12C uveden pro Rtk-8 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

55. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 12C uveden pro Rtk-9 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

56. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 14 uveden pro Rtk-2 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleových kyselin.

57. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 15 uveden pro Rtk-3 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleové kyseliny.

58. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 13B uveden pro Rtk-4 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleové kyseliny.

59. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, obsahující řetězec nukleové kyseliny, tak jak je na obr. 13B uveden pro Rtk-5 nebo jeho část, obsahující alespoň deset zbytků nukleové kyseliny.

60. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 12C pro Rtk-1 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

61. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 12C pro Rtk-6 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

62. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 12C pro Rtk-7 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

63. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 12C pro Rtk-3 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

64. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 12C pro Rtk-9 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

65. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 14 pro Rtk-2 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

66. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 15 pro Rtk-3 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

67. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 13B pro Rtk-4 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

68. V podstatě čištěná bílkovina, obsahující řetězec aminokyselin, tak jak je uveden na obr. 138 pro Rtk-5 nebo fragment s obsahem alespoň šesti aminokyselin nebo jeho funkční ekvivalent.

69. Buňka, obsahující molekulu nukleové kyseliny podle některého z nároků 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 nebo 59.

70. Mikroorganismus, obsahující molekulu nukleové kyseliny podle některého z nároků 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 nebo 59,

71. V podstatě čištěná molekula nukleové kyseliny, tvořená kódovým řetězcem pro bílkovinu podle některého z nároků 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 nebo 68.

Zastupuje:

2257-93

WO 92/18149

PCT/US92/03376

1/64

COS

NGF		BDNF		NT3	
-	+	-	+	-	+

200

106

80

49.5

1 2 3 4 5 6

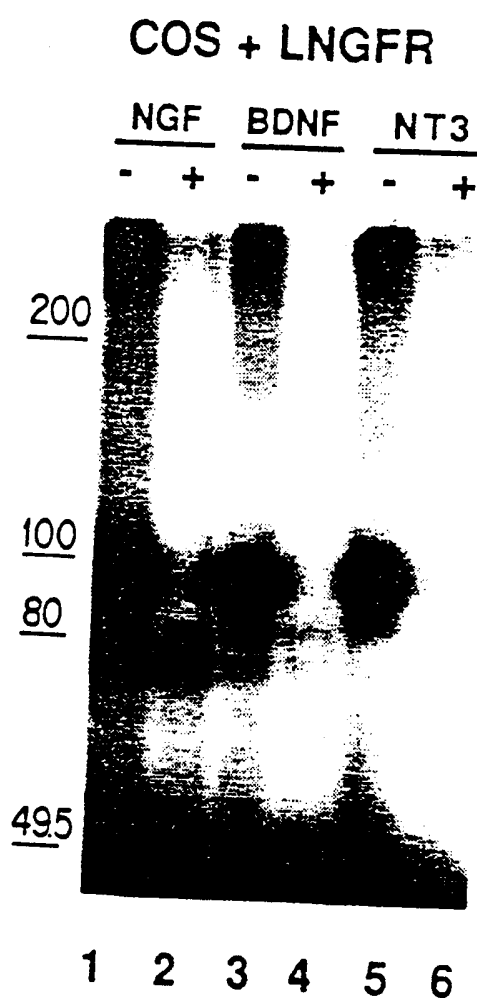
OBR. 1A

PRIL.
VLASTNOSTI
PRŮMYSLU
URAD
06 V 90
00500
11 25 16 1
2.1

PRIL.
VLASTNOSTI
PRŮMYSLU
URAD
06 V 90
00500
11 25 16 1
2.1

Zdenka Korejzová
Dr. ZDENKA KOREJZOVÁ

2/64



OBR. 1B

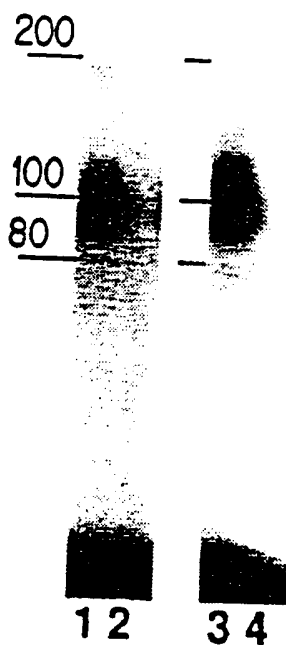
PRIL.
VLASTNOSTI
PRŮMYSLU
URAD
06 V 90
00510
025161
2.2

Dr. ZDENKA KOPECKOVÁ

3/64

**COS+LNGFR
vs. A875**

COS+		A875	
LNGFR		LNGFR	
-	+	-	+

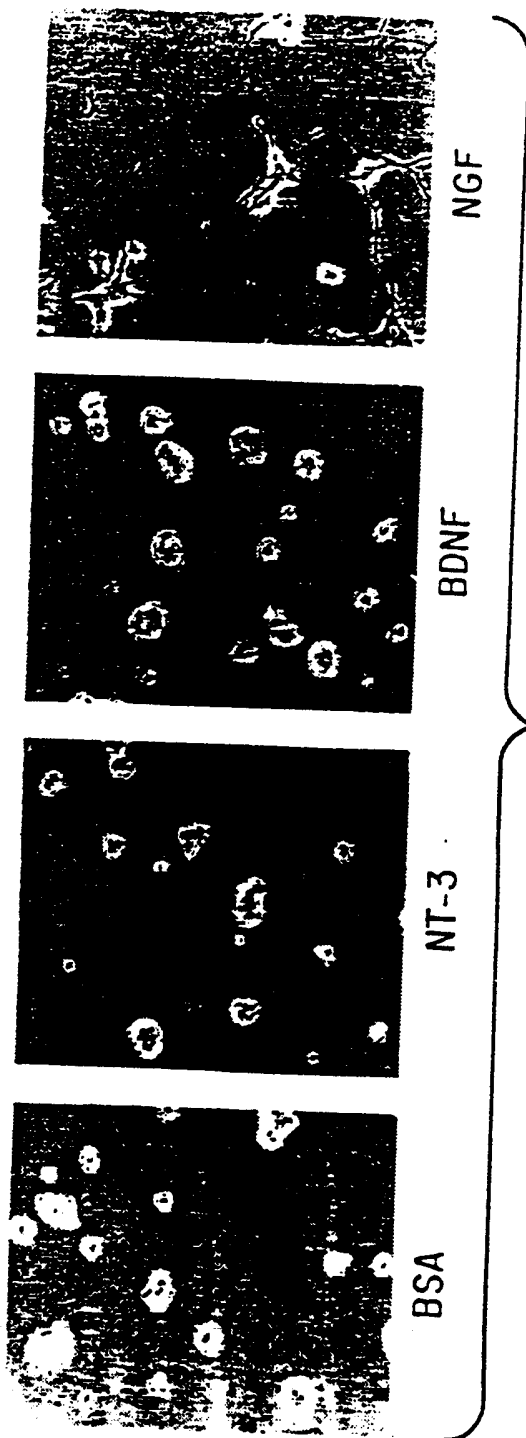


OBR. 1C

PRIL.
VEAŠTIV
PRŮMYŠLOVÉHO
UŘAD
0 6 1 9 0
DOŠLO
1 9 1 5 0
2. J.

Zdenka Korejšová
Dr. ZDENKA KOREJŠOVÁ

4/64

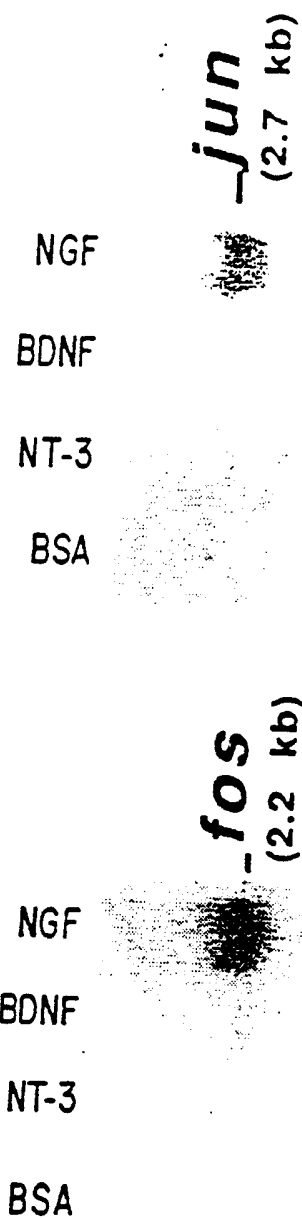


OBR .2A

PRIL.
VLASTNICTVÍ
PRŮMYSL. ÚČELO
U RAD
0 6 V 9 0
00\$10
2 5 1 6 1
2.1.

L. Korejzová
 DR. IZENKA KOREJZOVÁ

5/64



PRIL.
VLASTNÍ OTVĚR
PRŮMYSLOVÉHO
GRAD
0 6 1 9 0
7 6 1 9 4
00510
1 2 5 1 6 1
2.1.

Dr. Zdenka Korezová
Dr. ZDENKA KOREZOVÁ

6/64

PCT/US92/03376

1992-07-07
09:00:00
0740

7 6 A 9 0

01900

1 9 1 5 2 0

172

trkB(del)

NT3
- +

200

}*

106

80



1 2

OBR 3B

trkB

NGF BDNF NT3
- + - + - +

200

}*

106

80



1 2 3 4 5 6

OBR 3A

Zdenka Korzicová
Dr. ZDENKA KORZICOVÁ

7/64

kompetitivní látka

NGF			BDNF			NT3		
1	5	500	1	5	500	1	5	500

200

106

80

49.5

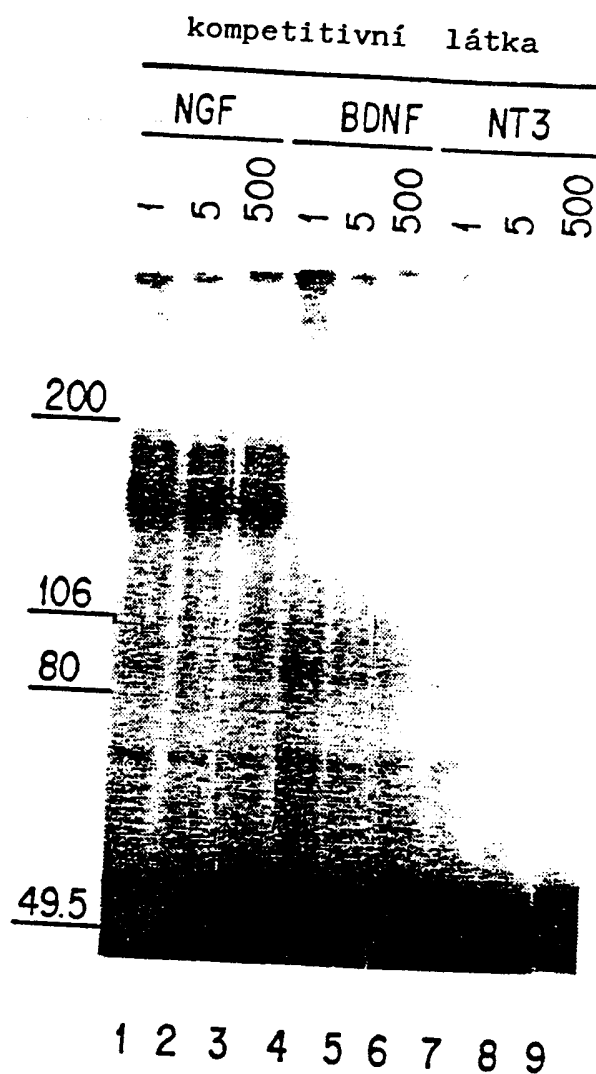
1 2 3 4 5 6 7 8 9

OBR. 4A

PRIL.
PRŮMYŠLOVÉHO VÝSTAVIŠTĚ
URAD
0 6 V 9 4
00510
0 2 5 1 6 1
8.1.

Dr. Zdenka Kozelová
DR. ZDENKA KOZELOVÁ

8/64

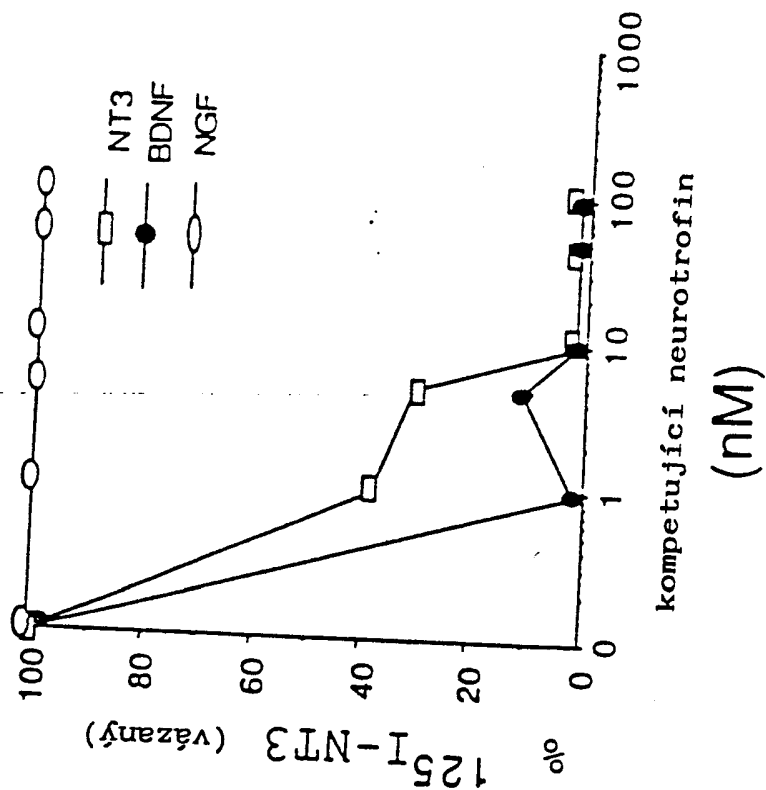


PRIL.
VLASTNOSTI
PRŮMYSLOVÉHO
ORIGIN
0 6 1 9 0
00510
0 2 5 1 6 1
0.1

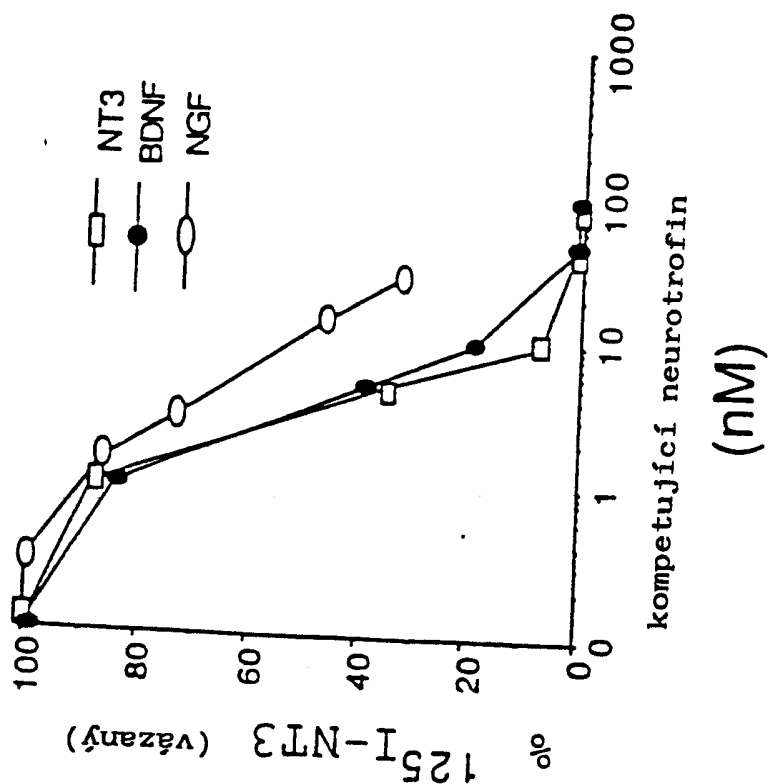
OBR. 4B

Dr. J. Kozánek
Dr. J. Kozánek

9/64



4D



4C

PRIL.	
VLASTNOSTI	
PRŮMYŠLOVÉHO	
URAD	
0 6 1 9 0	0 6 1 9 0
0 2 5 1 6 1	0 2 5 1 6 1
0 0 3 1 0	0 0 3 1 0
0 2 5 1 6 1	0 2 5 1 6 1
0 6 1 9 0	0 6 1 9 0

Zdenka Kozelová
Dr. ZDENKA KOZELOVÁ

10/64

OBR. 5B



trk B + NGF
(ND)

OBR. 5A



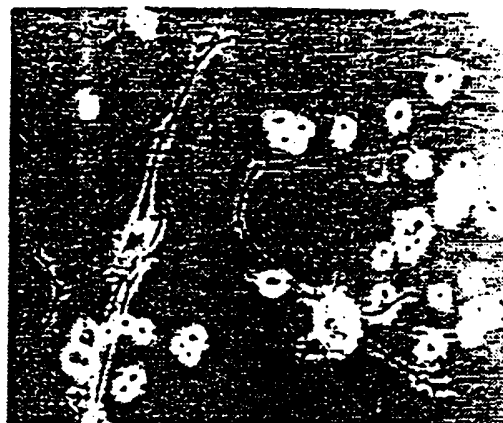
T24-ras + BSA
(6500)

PRIL.
VLASTNICTV
PRGMYSLOVEHO
U RAD
0 6 1 9 0
00\$10
0 2 5 1 6 1
g. J.

Dr. Zdenka Kozencova
Dr. ZDENKA KOZENCOVA

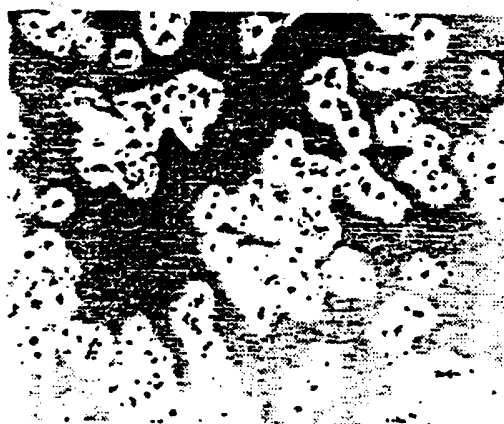
11/64

OBR. 5D



TrkB+NT-3
(1200)

OBR. 5C



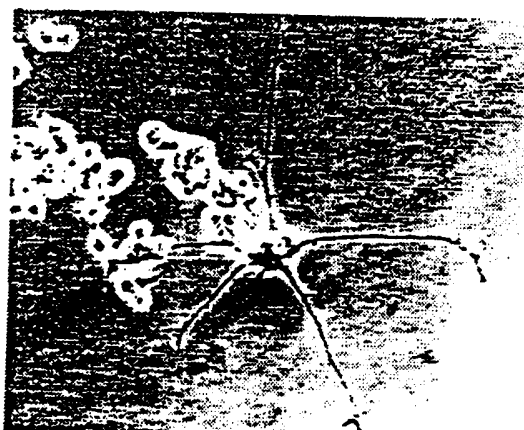
TrkB+BSA
(0)

g.j.	0 2 5 1 6 1	00810	0 6 V 9 4	U RAD	PRŮMYŠLOVÉHO	VLAŠTIVOSTI	PRIL.
------	-------------	-------	-----------	-------	--------------	-------------	-------

L. Krýžová
Dr. ZDENKA KRÝŽOVÁ

12/64

OBR. 5E



trkB + BDNF
(8700)

PRIL.
VLASTNICTV
PRŮMYSLUVÉHO
URAD
0 6 V 9 4
00\$10
11 2 5 1 6 1
2. J.

Dr. Zdenka Kocouřová
Dr. ZDENKA KOCOUŘOVÁ

13/64

BSA
NGF
NT-3
BDNF

fos
(2.2 kb)

OBR. 6A

CB
SY5Y

28S

18S

trk B

OBR. 6B

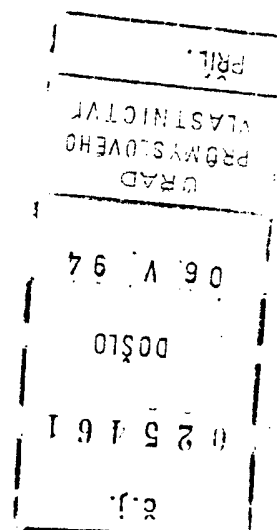
PRIL.
VLASTNOSTI
PRIMYSLUHO
URAD
06 V 94
00510
025161
2.2

L. Hajtner
Dr. JOSEFA KORNUSOVA

14/64

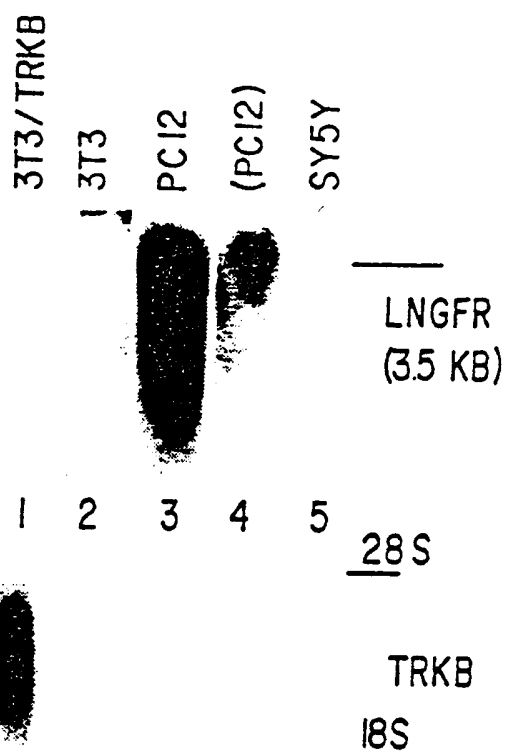


OBR. 7A



Skřípová
DR. JIŘENKA KŘÍPŮVÁ

15/64

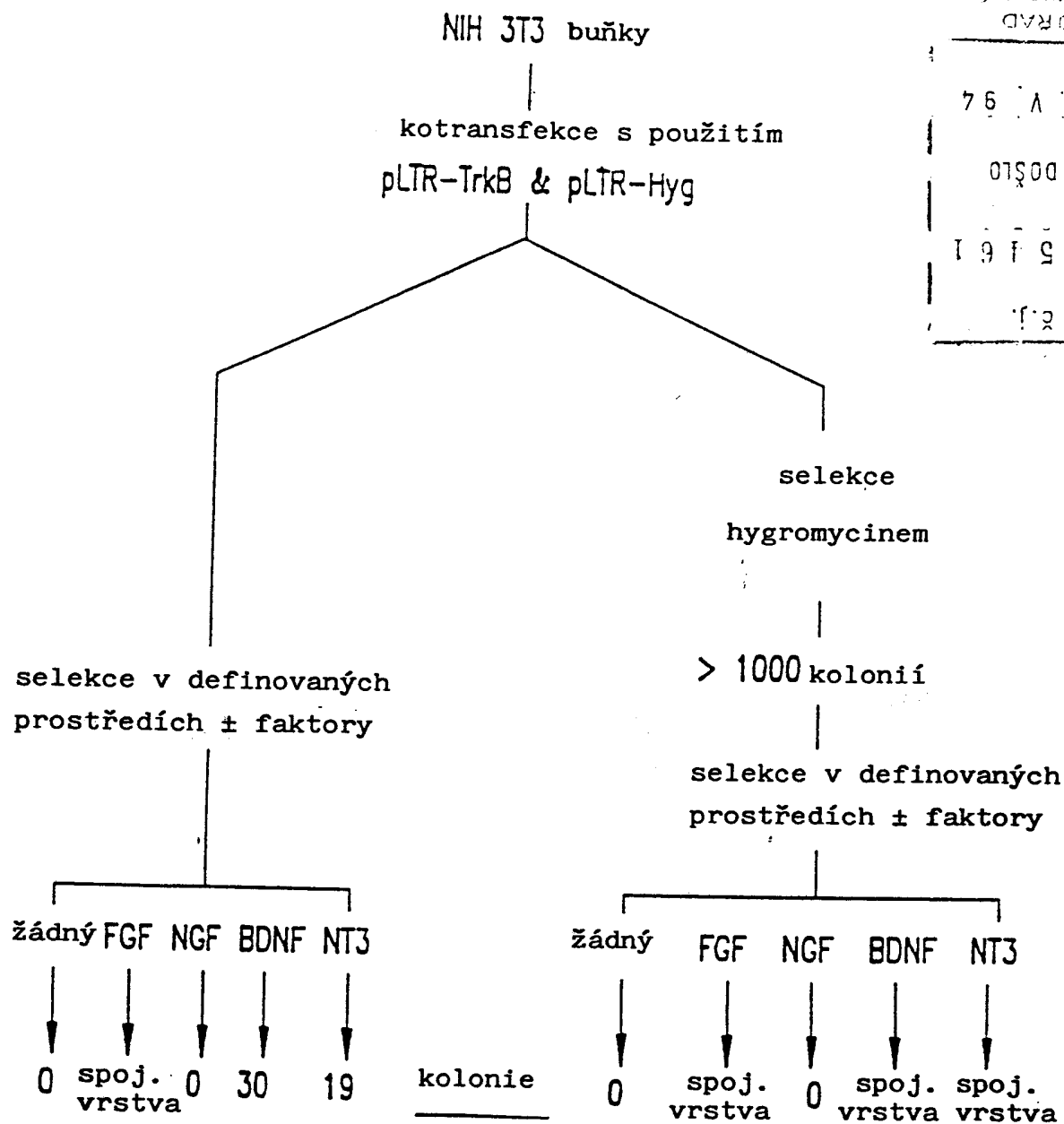


OBR. 7B

PRIL.
VLASTNOSTI
PRONOSLOVHO
URAD
0 6 1 9 0
00500
0 2 5 4 6 1
8.1.

Dr. J. Krizova
Dr. JELKA KOCHEVA

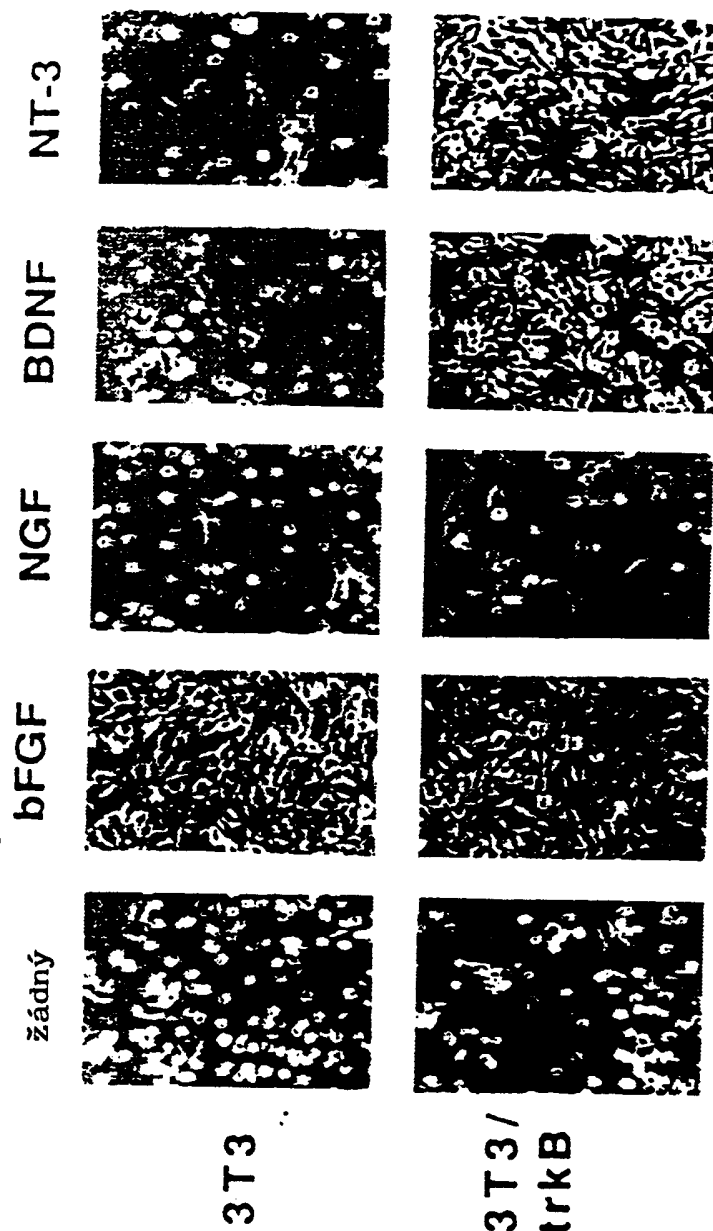
16/64



OBR .8

L. Králová
Dr. JIŘENKA KROKOVÁ

17/64



OBR. 9A

PRIL.
VLASTNICTVÍ
PRŮMYSLOVÉHO
ÚRAD
25.1.92
00510
06.1.90

Dr. Zdenka Kozelová
Dr. ZDENKA KOZELOVÁ

18/64

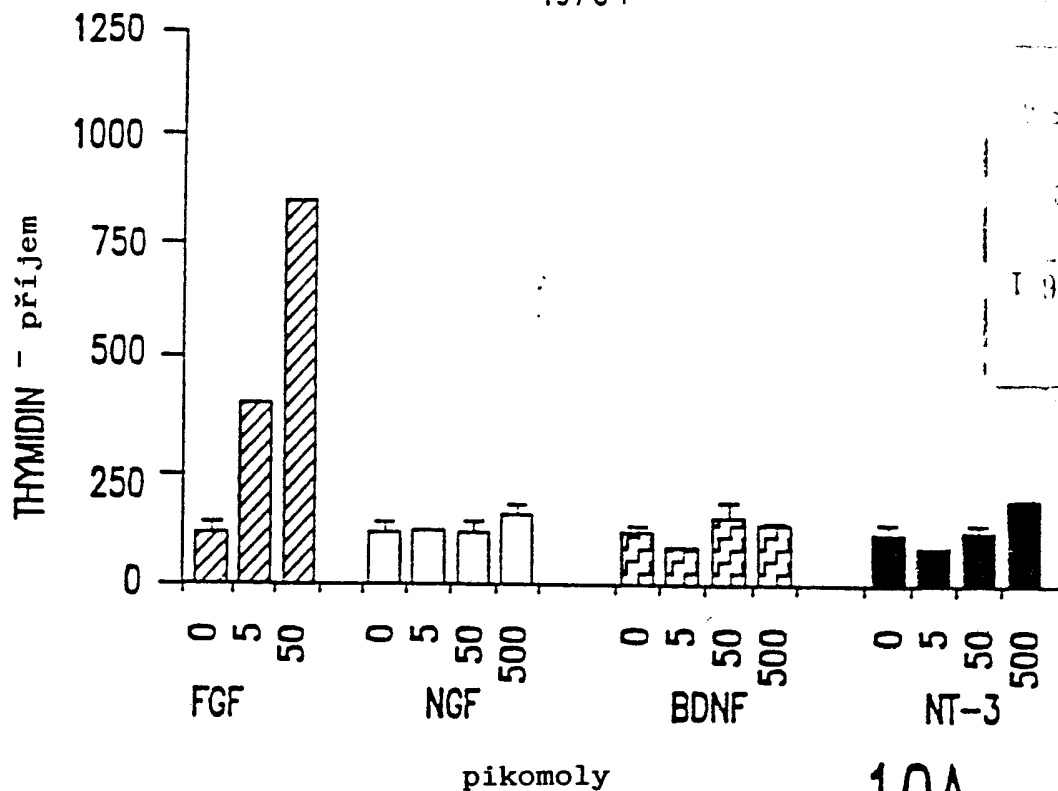
	0.05	0.5	5	50	500	5000
BDNF	-	-/+	+	++	+++	+++
NT-3	-	-	-	+	++	+++
bFGF	-	+	++	+++	+++	+++

OBR. 9B

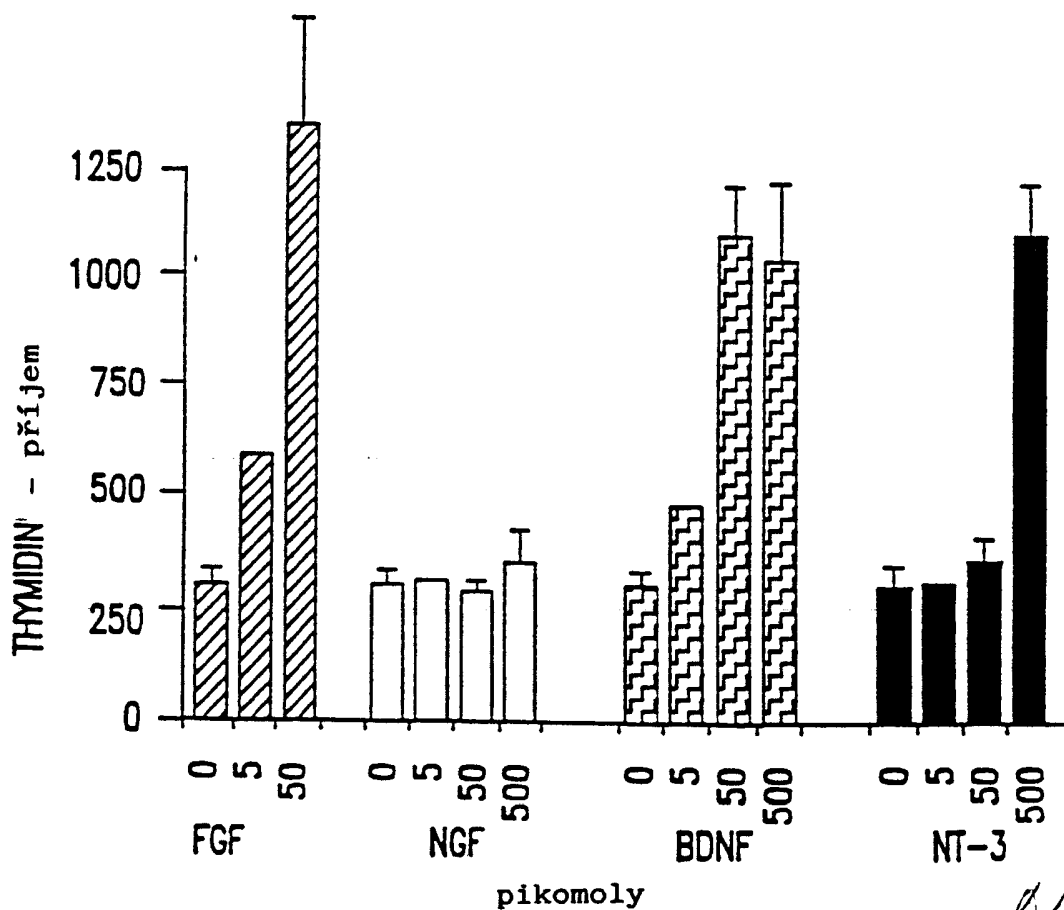
25.1.91
00510
06. V. 97
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLAŠTNIČTÍ
PŘÍL.

Dr. Edénka Hrdá
Dr. EDÉNKA HRDÁ

19/64



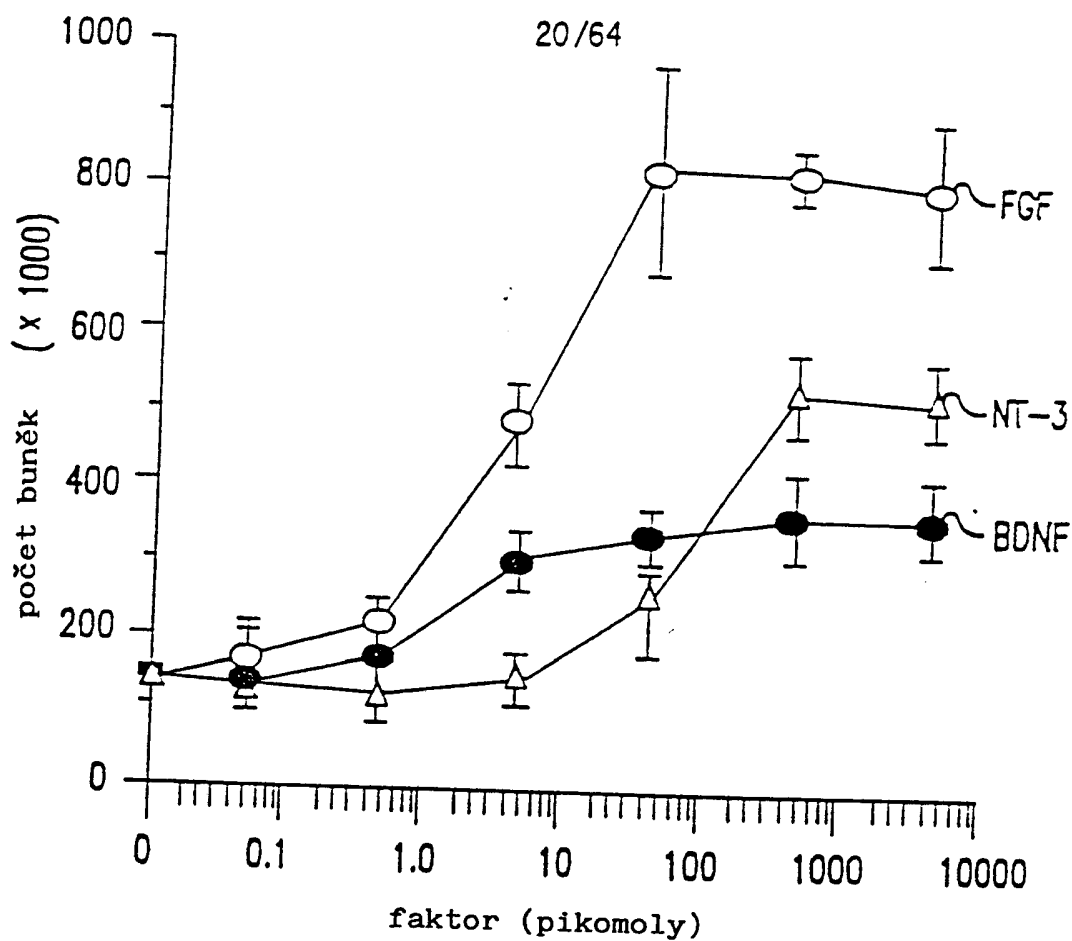
OBR. 10A



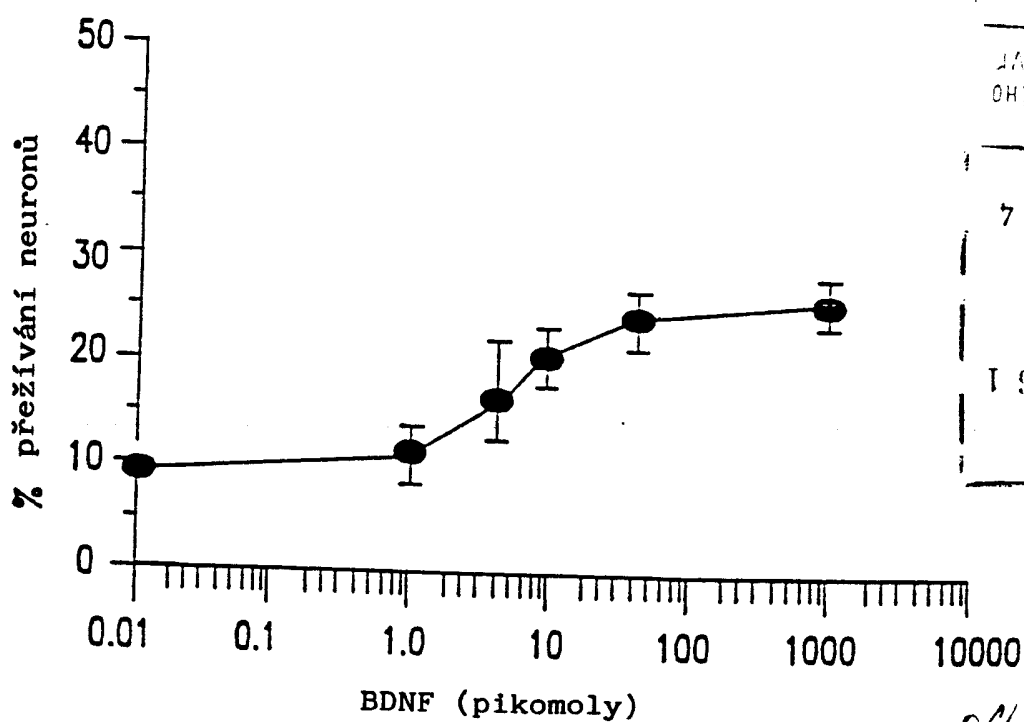
OBR

.10B

L. Krizova
LENA KRIZOVA



OBR .10C

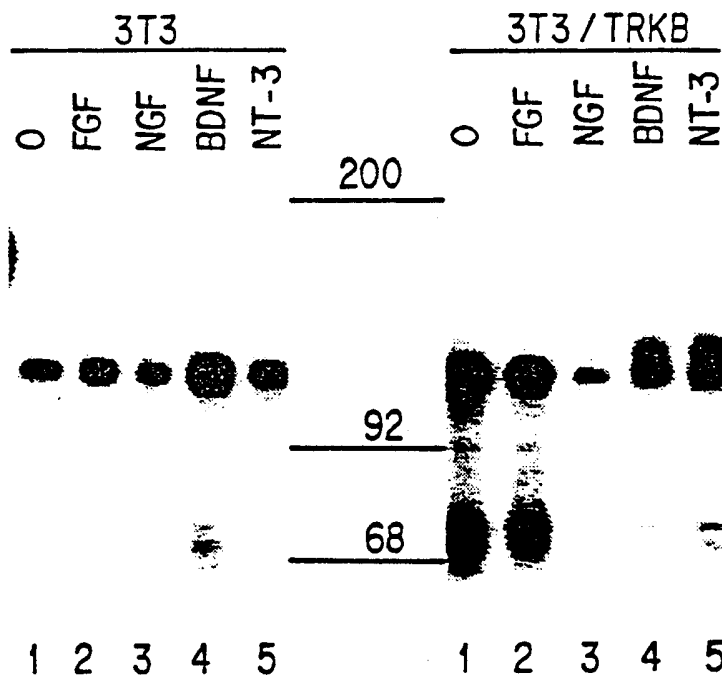


OBR

.10D

PRIL.
VLASTNOSTI
PROJEKTUJEHO
GRAD
7 6 1 9 0
00510
1 9 1 5 2 0
1.2

21/64



OBR .11A

L. Kozlová
Dr. EDENKA KOZLOVÁ

22/64

<u>3T3</u>					<u>3T3/TRKB</u>				
O	FGF	NT-3	BDNF	NGF	O	FGF	NT-3	BDNF	NGF
				41					
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

OBR. 11B

APRIL 1961
WALLINGFORD
PROGRESSIVE
WALLINGFORD
1961
1961
1961

Dr. IDENNA NORRIS

5' (DOWNSTREAM)

- 1) DLATRN 5' -TCT-TGA-CTC-GAG-A(T,C)(T,C)-T(N)G-C(N)G-C(N)(C,A)-G(N)A-A-3'
Xho I
- 2) DLAARN 5' -TCT-TGA-CTC-GAG-A(T,C)(T,C)-T(N)G-C(N)A-C(N)(C,A)-G(N)A-A-3'
Xho I

3' (UPSTREAM)

- 3) DVWSLG 3'-CT-(G,A)CA-(N)AC-C(T,A)(C,G)-(N)AT-(A,G)CC-CTC-GAG-CTT-AAG-5'
SstI
- 4) DVWSFG 3'-CT-(G,A)CA-(N)AC-C(T,A)(C,G)-(N)AA-(A,G)CC-CTC-GAG-CTT-AAG-5'
SstI
- 5) DVWSYG 3'-CT-(G,A)CA-(N)AC-C(T,A)(C,G)-(N)(A,G)A-(N)CC-CTC-GAG-CTT-AAG-5'
SstI

23/64

OBR.12A

Dr. Barbara H. Hargrave

6.1	25161	00510	06.V.94	URAD PRÓMYSLUVEHO VLASTNOSTI	PRIL.
-----	-------	-------	---------	------------------------------------	-------

24/64

1) trk-like (RTK-1)

CLVGANLLYKIGDFGMSRDVYST.DYYRVG...GHTM...LPIRWPPESIMYRKFTTES

2) CSF1R/PDGFR/kit-like (RTK-6)

VLVTHGKVVKICDFGLARDILSD.SSYVVR...GNAR...LPVKWMAPESLFEGITYIKS

3) ret-like (RTK-7)

ILVGENYLAKIADFGLSRGQE....VYVKK....TMGRLPVRWMAIESLNYSVYTTNS

4) a. eck-like (alpha) (RTK-8)

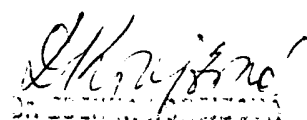
ILVNSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPEAAYYTTGGK....IPIRWTAPEAIAYRKFSAS

5) b. eck-like (beta) (RTK-9)

ILINSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPEAAYYTRGGK....IPIRWTAPEAIARFKTSAS

OBR .12B

25161	00510	06194	U RAD	PROCESSED	REACTIVITY	PRIL
-------	-------	-------	-------	-----------	------------	------



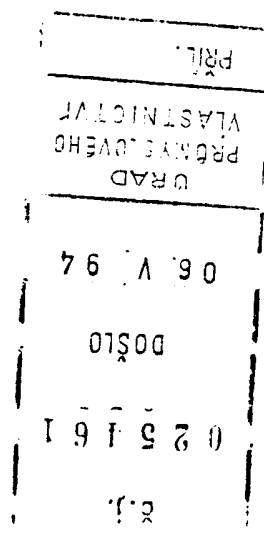
25/64

[illegible]

						80							100						120	
			X			X			X			X			X			X		
RTK-1	TAC	AGT	ACT	GAT	TAC	TAC	AGG	GTG	GGA	GGA	CAC	ACC	ATG	CTC	CCC	ATC	CGC	TGG	ATG	CCA
r trkB	Y	S	T	D	Y	Y	R	V	G	G	H	T	M	L	P	I	R	W	M	P
m trkB	...	..c	..c	..c	...	...	c..	..t	..t	..c	...	..a	...	t.g	...	...	..a	...	...	..t
h trkA	...	..c	..c	..c	...	..t	c..	..c	..t	..c	...	..a	...	t.g	...	...	..a	...	...	..t
	...	..c	..c	..c	..t	...	c.t.	...	...	..c	.g.	...	...	..g	...	..t	...	...	...	..g
											P									

						140							159
			X			X			X				X
RTK-1	CCT	GAA	AGC	ATC	ATG	TAC	CGG	AAG	TTT	ACC	ACA	GAG	AGT
	P	E	S	I	M	Y	R	K	F	T	T	E	S
r trkB	..a	..g	...	...	...	...	a..	..a	..c	...	..c	...	...
m trkB	..a	..g	...	...	...	..t	a..	..a	..c	...	..c	...	..c
h trkA	..c	..g	...	...	c..	...	..t	...	..c	...	..c	...	..c

OBR .12C(i)



L. Krijžna

26/64

20 40 60
 X X X X X
 GTA CTG GTC ACC CAC GGG AAG GTG GTG AAG ATC TGT GAC TTT GGA CTG GCC CGA GAC ATC
 Y L V T H G K V V K I C D F G L A R D I
 80 100 120
 X X X X X
 CTG AGT GAC TCC AGC TAC GTC GTC AGG GGC AAC GCA CGG CTG CCA GTG AAG TGG ATG GCA
 L S D S S Y V V R G N A R L P V K W H A
 140 159
 X X X X
 CCT GAG AGC TTG TTT GAA GGG ATC TAT ACA ATC AAG AGT
 P E S L F E G I Y T I K S

20 40
 X X X X
 RTK-6 VLVTHGKYVKICDFGLARDILSDSSYYVRGNARLPVKVMAPESLFEGIYTIKS
 h kit
 h CSFIR i.l...rit.....kn..n...k.....l.ncv..fe.
 h PDGFaR ..l.n.h.a..g.....nn..n..l.k.....i.dcv..vq.
 m CSFIR ..laq..l.....mh..n..sk.stf.....l.dhl..tl.
 ..l.s.h.a..g.....nn..n...k...-.....i.dcvl.vq.

PRIO.
LASTING
PROBING
ORAD
76 190
01500
191920
1.2

OBR. 12C(ii)

Elkrijac
 Dr. J. J. J. J. J.

27/64

20 40 60
 ATT TTA GTT GGC GAA AAC TAC TTA GCC AAA ATA GCA GAT TTT GGA TTG TCA CGA GGT CAA
 I L V G E N Y L A K I A D F G L S R G Q
 80 100 120
 GAA GTG TAT GTG AAA AAG ACA ATG GGA AGG CTT CCA GTG CGC TGG ATG GCA ATT GAG TCT
 E V Y V K K T M G R L P V R V H A I E S
 140 150
 CTG AAC TAT AGT GTC TAT ACA ACC AAC AGT
 L N Y S V Y T T N S

20 40
 RTK-7 ILVGENYLAKIADFGLSRGQEVYVKKTHGRLPVRVMAIESLNYSVYTTNS
 h ret vye
 ...a.grkn..s.....deds...rsq..l..k.....fdhl...q.

OBR.12C(iii)

PRIL
VLASTNICTV
PRBNYSUVEHO
URAD
7-6 1 9-0
01\$00
1 9 1 5 2
1.2

Dr. Edemir Kordžević
 Dr. EDEMIR KORDŽEVIĆ

29/64

		20		40		60		80
RTK-1		×	×	×	×	×	×	×
	GPDAMILVDGQPRQAKGELGLSQMLHIASQIASGMVYLASGHFVHRDLATRNCLVGANLLVKIGDFGMRGVYSTDYRY							
r trkB	vlnae.n.--p-t..tq.....q...a.....e.....							
n trkB	vlnae.n.--p-t..tq.....q...a.....e.....							
h trkA	kl.ag.e-dv.p.p...g.l.av...v.a.....gl.....qg.v.....l.....							
		100		120		140		160
RTK-1		×	×	×	×	×	×	×
	GGHTMLPIRVMPPEIIMYRKFTTESDVVSFGVILYEIFTYKQPVFQLSNTVEIECITQGRYLERPRVCPKEVYDVMLGC							
r trkB	l..v.....y....n.....q...t..q...el....							
n trkB	l..v.....y....n.....q...t..q...el....							
h trkA	..r.....l.....v.....y.....a.d.....e.....a..p...al.r..							
		180						
RTK-1		×	×	×				
	WQREPQQRNLNIKEIYKILHALGKATPIYLDILG*							
r trkB	ht.k...n.htl.qn.a..s.v.....							
n trkB	ht.k...s.htl.qn.a..s.v.....							
h trkA	hs..dvhar.q..aq.p.v...v..							

OBR .12D

PRIL
VLASTNICTV
PRGMSVCHG
URAD
7 6 1 9 0
00500
1 9 1 2 7
112

L. Krizane
Dr. CRISTINA DE OLIVEIRA

30/64

---VI---VII---VIII---IX---

>>>>>

c-Src YVHRDLRAANILVGENLVCKVADFGLARLIED..NEYTAR..QGAK..FPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTT
c-Yes YIHRDLRAANILVGENLVCKIADFGLARLIED..NEYTAR..QGAK..FPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILQTELVT
HCK YIHRDLRAANILVSASLVCKIADFGLARVIED..NEYTAR..EGAK..FPIKWTAPEAINFGSFTIKSDVWSFGILLMEIVT
c-Fes CIHRDLAARNCLVTEKNVLKISDFGMSREEAD..GIYAAC..SGLRQ.VPVKWTAPEALNYGRYSSESDDVWSFGILLWETFS
c-AbI FIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTG..DTYTAH..AGAK..FPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIAT
EGFR LVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHA...EGGK..VPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMT
Neu LVHRDLAARNVLVKSPMHVKITDFGLARLLDIDETEYHA...DGGK..VPKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMT
CSFIR CVHRDVAARNVLLTSGHVAKIGDFGLARDIMND.SNYVVK..GNA...LPNKWMAPESEIFDCVITVQSDVWSYGILLWEIFS
PDGER CVHRDLAARNVLICEGKLVKICDFGLARDIMRD.SNYISK..GSTY..LPLKWMAPESEIFNSLYTTLSDVWSFGILLWEIFT
IR FVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGMDTRDIYET.DYYRKG..GKGL..LPVRWMAPESEIKDGVFTTSSDMWSFGVVLWEITS
IGFIR FVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGMDTRDIYET.DYYRKG..GKGL..LPVRWMSPESEIKDGVFTTSSDMWSFGVVLWEIAT
c-Met FVHRDLAARNCMMLDEKFTVKVADFGLARMDYDK.EYYSVHNKIGAK..LPVKWMALESLOTKQFTTKSDVWSFGVVLWEIAT
c-Trk FVHRDLATRNCVLVGQGLVKIGDFGMSRDIYST.DYYRVG..GRTM..LPIRWMPPESEILYRKFTTESDDVWSFGVVLWEIFT

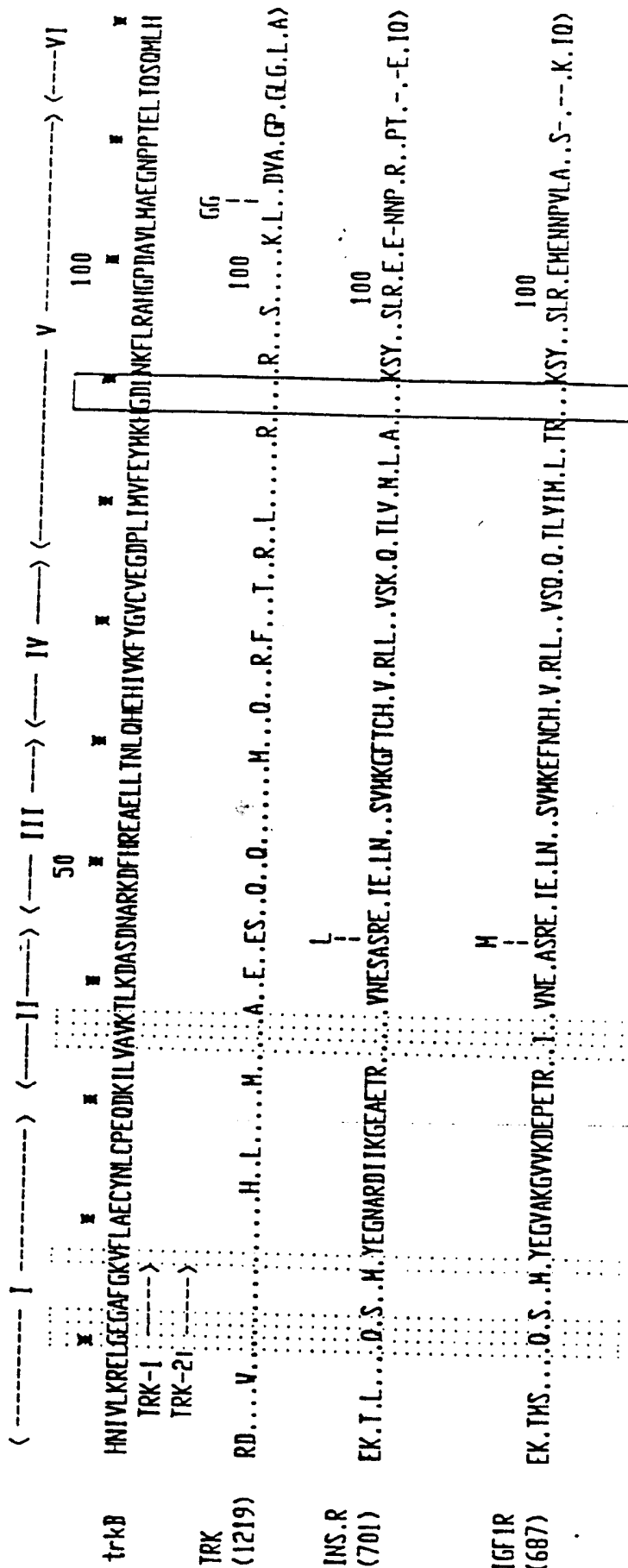
<<<<<

OBR .12E

025161	00310	06 A 97	U RAD	PROGRAMS LOVED	PLASTICITY	PRIL
--------	-------	---------	-------	----------------	------------	------

L. Kojima

31/64



OBR .13A(i)

76	190
06	97
00	10
1	16
2	16
3	16
4	16
5	16
6	16
7	16
8	16
9	16

32/64

Ros
(620) EKL.T.RLL.S...E.YEGTAVD.GVGSGE.K.....GST.OEKIE.LK..H.HSKFN.PN.L.OL...LLME.QYITL.L.EG...ITY...-KARM.TFY---L-.LVDLVD>
100

DILR
(609) E..IOLAP..O.S..H.YEGILKSFP.NGVDRGEC..I..VNE.T.RE.TN.LS...SVHKEFDY.V.RLL....SR.O.AL.V.M.L..KVE.KSY....R.RSGHRPDDGHNVOPP.YGRITYQ>
100
VSLIAVHT

7less
(604) SOLK.L.F..S...E.YEG-QLKTEDSEEPOR..I.S.RKG-ASEFAELQ..Q.HS.FK..N..RLV.I.FDIESISLIH.H.EA...SY..-AARAT-STQ.PQ.TAG.SL.EL.A>
100

HET
(544) VHFNEVI.R.H..C.YHGT-L-.DNDCG..HC...S.NRIT.GEVSO.IT.GIHKDGS.PNVLSELL.I.L..S..V-.LP.....RN.I.-N-E-----TH-...-V-K-DLIG>
100

OBR .13A(ii)

06.1	025161	00000	06.1
06.1	025161	00000	06.1
06.1	025161	00000	06.1
06.1	025161	00000	06.1

Dr. K. Rajendra Prasad
DR. K. RAJENDRA PRASAD

33/64

	VI	VII	VIII	IX	X
trkB	IAQOIAAGHYLASQHFVHRDLATRNLVGENLLVKIGDFGHSRDVYSTDRYRGGHTLPIRUMPPESHWYRKFTTESDVVSLGVLVEIFTYKQDPVYDL SNNEVIECTITQIRV Q3				
TRK-9	----->				
		TRK-5 ----->			
		TRK-6r			
		TRK-7 ----->			
		TRK-8r			
TRK					
(1219)	V.S.V.....GL.....QG.V.....I.....R.....L.....F.....T.A.D.....E.E.				
INS.R					
(701)	H.AE..D..A..NAKK.....A...H.AHDT.....T..I.E.....K..KQ..V...A...LKQGV...S...H..F.....TSLAE.....EQ.LKFMVH.GY.DA.				
IGFIR					
(687)	H.GE..D..A..NANK.....A...H.A.DFT.....T..I.E.....K..KQ..V...S...LKQGV...Y.....F.....A.LAE.....EQ.LRFVHE.GI.DK.				

OBR.13A(iii)

El Krizine
Dr. Krizine

1992	0000	06	06
1992	0000	06	06
1992	0000	06	06
1992	0000	06	06

34/64

RDS
(620) LCDV.SK.C...ERM...I...A...SSPRI...LA..I.KN...KR.EQ...V...A...L.DGI...Q...F...ILI...L.L.H...YPWH...LD.LNYVQT...GR.EF...
DILR
(609) V.IE..D..A...AKK...A...H.ADD..I...I..I.E...K.TKGL..V...LRDGVYSSA...F.F...NA.LAA...EQ.LRYVID..G..ME...
71ess
(604) HCIDV.N.CS..EDM...C...TDRRT...LA..I.KS...KE.EQ...V...S...LVDGL...Q...AF...LC...L.L.Q...P...HAR.F...LAHWKE...GR...D...
MET
(544) FGL.V.KA.K...KK...A...MLD.KFT..VA...LA..M.DKE...S.HNK.K...VK..AL..LOTO...K...F...LM.R.AP..YPDYNTFDITVYLL...R..ID...
VKDYT
VTSTGS
GA

OBR .13A(iv)

0.1	0 2 5 1 6 1	00500	0 6 V 9 4	0 RAD	PROBMS SLOVERO	VLAST NICT 17	PRBL
-----	-------------	-------	-----------	-------	----------------	---------------	------

Krejsne
DA: 12.01.1992

35/64

-X-----XI----->

250

trkB RTCPQEWELMLCCWOREPHTRKNIKNIHTLLMLAKAS

TRK (1219) .A..P...AI.R.....QQ.HS..DV.AR..A..Q.P

INS.R (701) DN..ER.TD..RM.....FN.KM.PTFLE.VN..KD

IGFIR (687) DN..DMLF...RM.....YN.KM.PSFLE.

Ros (620) .N..DDL.VN..TD..AQ..DD.PTFIR.QDD..

DILR (609) EN..DFLIK..OR..HRSSA.PSFLD.IAY.E

7less (604) PH.TEKL.S.L.L..RTD.VE.PSFRCYNT.HAI

MET (544) EY..DPL...V..K..HPKAEM.PSFSEL

OBR .13A(v)

7 6	A 19 0
00\$10	
1 9 5 4 6 1	
9.1	
0 RALD	
0000000000	
0000000000	
0000000000	
0000000000	

Shrijne

Rtk-2

* TCT AGT CAC TTC TTT GTC CAC AAG GAC CTT GCA GCT CGC AAT ATT TTA ATC GGA GAG CAA CTT CAT GTA AAG
 Ser Ser His Phe Val Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly Glu Gln Leu His Val Lys
 * 50
 * 100
 ATT TCA GAC TTG GGG CTT TCC AGA GAA ATT TAC TCC GCT GAT TAC TAC AGG GTC CAG AGT AAG TCC TTG CTG
 Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu

Rtk-3

* TCC AGC CAC GTG GTT CAC AAG GAC CTG GCC ACC CGC AAT GTG CTA GTG TAC GAC AAG CTG AAC GTG AAG
 Ser Ser His His Val Val Val His Lys Asp Leu Ala Thr Arg Asn Val Leu Val Tyr Asp Lys Leu Asn Val Lys
 * 50
 * 100
 ATC TCA GAC TTG GGC CTC TTC CGA GAG GTG TAT GCC GCC GAT TAC TAC AAG CTG CTG GGG AAC TCG CTG CTG
 Ile Ser Asp Leu Gly Leu Phe Arg Glu Val Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Lys Leu Leu Gly Asn Ser Leu Leu

36/64

OBR. 13B

0 2 5 1 6 1	00\$10	0 6 1 9 0	0 6 1 9 0
PRIL 1992			

Chizone

37/64

Rtk-4

CTC TCC AGG AAC ATC TAC TCA GCA GAC TAC TAC AAA GCT AAT GAA AAC GAC GCT ATC CCC ATT AGT TGG ATG CCT
 Leu Ser Arg Asn Ile Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Lys Ala Asn Glu Asn Asp Ala Ile Pro Ile Ser Trp Met Pro

Rtk-5

AAG CGC TTT ATT CAC CGT GAC CTG GCT GCC CGC AAT CTG CTG TTG GCT ACC CGC GAC CTG GTC AAA ATC GGT
 Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Leu Leu Ala Thr Arg Asp Leu Val Lys Ile Gly

GAC TTT GGT
 Asp Phe Gly

OBR .13B

06194	00510	025161	0.1
URAD			
PRGMYSSUVEHO			
LASTINICTIV			
PRIL			

Alkneizne

38/64

human trk * AGMVYLAGLH FVHRDLATRN CLVGQGLVVK IGDEGMSRDI YSTDYRVRGG RTMLPIRWMP * 50 *
 TK subdomains -----VI-----VII-----VIII-----

Rtk-2 SSHF ...K...A.. I.I.EQ.H.. .S.L.L..E. ...A....QS KSL.
 Rtk-3 SSHH V..K..... V..YDK.N.. .S.L.LF.EV .AA...KLL. NSL.
 Rtk-4 L..N. .A...KANE NDAI
 Rtk-5 KR .I.....A.. L.LATRD.L.

OBR. 13C

0 2 5 1 6 1	0 6 1 9 0	URAD	PRGMSLOVENC	VLASTNICITV	PRIL
-------------	-----------	------	-------------	-------------	------

Khajone

Rtk-2

Rtk-2

150

* * * *

VLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNST *

Rtk-2

200

GVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTL

39/64

Rtk-2	250	*	*	*	*	*	300
		DENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYLVP	SVAIPLAIALLEFFICVCRNNQKSSSA				*

h trk

779]

GRAD
PROBMS SOVERHO
PLASTINICITY

OBR.

13D(i)

76 190

07500
9 7 5 7

1.

ST.

h IGF-R
[646]

h Ins-R
[638]

200
.I.AL.--VL.IVGG.VIMLY.--FHR.RNNS>
200
.I-.IGP.IFVFLFSV.GSIYL.LRKQPDGPGPL>

Rtk-2
* * * * *
PVQRQPKHVRGQNVEMSMILNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGM
350 * *

r trkB
[783]
500
..DTFVQHIKRHNIVLKR...G....VFLAEC..CPE>
40/64
N
|
|

h trk
[779]
.TEGKSGGLQ.HII.-N--PQ.FSDACVHHIKRRDIVLKW...G....VFEC.NL...EQ>
LA
|
|
h IGF-R
[646]
RLGNGVLYASVNPEYF.AADV.V.--DEW.VAREKITMSR...QGS..MV.E.VAKGVVK>

OBR. 13D(ii)

0 2 5 1 6 1	00510	0 6 V 9 4	URAD	PRIMY SLOVEHO	VLASTNICTVI	PRIL.
-------------	-------	-----------	------	---------------	-------------	-------

L. Kozelj

RD
-
-
YASSN.EYLSASD.-FPC-SV.V.--DEW.VSREKITLLR...QGS..MV.E.NAIK.E>

h Ins-R [638]

Rtk-2
r trkB

```
[ 783 ] QDKI...V.....-ASDNARKD.HR..E.LTN.Q.EH..KFY.VCVEGD.LI.V...MKH>
h trk 500
[ 779 ] .K-M...V.A..EASES-ARQD...R..E.LTM.Q.QH..RFF.VC.EGR.LL.V...MRH>
```

R - -

h IGF-R [646]

300

..EPET.....VNEAASMRERI..LN...V.K.FNCHHV.R...V.S.G..TLVIM.LMTR>

h Ins-R [638]

300

AE TR-..V..VNESASLRERI..LN...V.KGFTCHHV.R...V.SKG...TLVVM.LMAH>

OBR .13D(iii)

025161
DOŠIO
06 V 94
PRIL. 1
PROJEKAT
ALASTINGOVA

Rtk-2 450
 * * * * *
 GDLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDTGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLA *
 r trkB 600
 [783] ...NK..RAHG.DA--LMA.--NPTE.TQSOM....Q.....V..A.QH...R...>
 h trk
 [779] ...NR..RSHG.DAKLL-AGG..-VAPGP.GL.QL.AV.S.V....V..AGLH...R...>
 h IGF-R 600
 [646] ...KSY.---LRPEM---ENNPVLAPP...--SKMIQM.GE..D..A..NANK...R...>
 h Ins-R
 [638] ...KSY.---LRPE---AENNP.RPPPT.-Q-EMIQM.AE..D..A..NAKK...R...>

42/64

500
 * * * * *
 ARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYRVQSKSLPIRWMPPEAIMYGKFSDDSDIWS *
 r trkB
 [783] T..C.V..N.L...G.F.M..DV..T.....GGHTM.....S...R..TTE..V...>
 h trk 700
 [779] T..C.V.QG.V...G.F.M..D...T.....GGRM.....S.L.R..TTE..V...>

OBR. 13D(iv)

Handwritten signature

2516
 00500
 06 V 90
 URAD
 PR0MYSL0V
 VLASTNICT
 PRIL.

43/64

h IGF-R 400
[646] ...CMVA.DFT...G.F.MT.D..ET...KGG.G...V...S..SLKD.V.TTY..V..>

h Ins-R 400
[638] ...CMVAHFT...G.F.MT.D..ET...KGG.G...V...A..SLKD.V.TTS..M..>

550
* * * * *
Rtk-2 FGVWLWEIFSGLQPYYGFSNQEVEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRP 600
* * * * *

r trkB
[783] L.....TY.K..W.QL..N.....CITQGRV.QRPRT...QEV.E..LG...QRE.HT.K>

h trk
[779]TY.K..W.QL..T.A.DCITQGRE.ERPRA...EV.AI.RG...QRE.QQ.H> 700

h IGF-R 500
[646]ATLAE...Q.L..EQ.LRF.MEGG...DKPDN...DMLFE...RM...QYN.KM..>

h Ins-R 500
[638]T.LAE...Q.L..EQ.LKF.MDGGY.DQPDN...E.VTD...RM...QFN.NM..>

OBR .13D(v)

75	1	90
01000		
1	0	1
1	0	1

L. H. 24/80

44/64

Rtk-2 * RFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSSTTPSGGNATTQTSLASPVSNLSNRPYNMFPSQGIT * 650
 r trkB [783] NI.N..TL.QN>
 h trk [779] SI..V.A..QA>
 h IGF-R [646] S.LE..ISSIK>
 h Ins-R [638] T.LE.-.N.LK-DD.>

Rtk-2 * PQQIAGFIGPPIPNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPS * 700
 * 750
 SASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQA *
 * 800
 SLLGDANIHGHTESMISAEI *
 Rtk-2

025101	07500	75	190
191010	07500	75	190
025101	07500	75	190

OBR 13D(vi)

45/64

[illegible]

OBR. 14A

76 A 19
00500
25152
12

Ek. rezjane

* * * * * 350 *
 AAATTCATCCGTCCTCCAAAGCCCGTGACTGTGTCCGGATGAATGTGAAATCCTGGAGA
 E T S S V P K P R D L C R D E C E I L E>

* * * * * 400 *
 ATGTCCTGTGTCAACAGAGTACATTTTGCAAGATCAAAATCCCATGATTCTGATGAGGC
 N V L C Q T E Y I F A R S N P M I L M R>

* * * * * 450 *
 TGAAACTGCCAAACTGTGAAGATCTCCCCCAGCCAGAGAGCCAGAGCTGCCAACTGTA
 L K L P N C E D L P Q P E S P E A A N C>

* * * * * 500 *
 TCCGGATTGGAAATTCCTCATGGCAGATCCTATAAAATAAAATCACAAGTGTATACAGCA
 I R I G I P M A D P I N K N H K C Y N S>

* * * * * 550 *
 CAGGTGTGGACTACCGGGGACCGTCAGTGTGACCAATCAGGGCGCCAGTGCCAGCCAT
 T G V D Y R G T V S V T K S G R Q C Q P>

600

06. V. 94	00\$00	19122	12	12
06. V. 94	00\$00	19122	12	12
06. V. 94	00\$00	19122	12	12
06. V. 94	00\$00	19122	12	12
06. V. 94	00\$00	19122	12	12

OBR. 14B

R. K. K. K. K. K.

47/64

* * * * * 650
 GGAATCCAGTATCCCCACACACACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCAGAGCTGAATG *
 W N S Q Y P H T H T F T A L R F P E L N>

 * * * * * 700
 GAGGCATTCCTACTGCCGCAACCCAGGGAATCAAAGGAAGCTCCCTGGTGCTCACCT *
 G G H S Y C R N P G N Q K E A P W C F T>

 * * * * * 750
 TGGATGAAACTTTAAGTCTGTGATCTGTGTGACATCCAGCTTGCGATTCAAAGGATTCCA *
 L D E N F K S D L C D I P A C D S K D S>

 * * * * * 800
 AGGAGAAGATAAATGGAATCCTGTACATACTAGTGCCCAAGTGTGGCCATTCCCTGG *
 K E K N K M E I L Y I L V P S V A I P L>

 * * * * * 850
 CCATTGCTTACTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCGTGTGCGGAATAACCAAGATCATCGTCGG *
 A I A L L F F F I C V C R N N Q K S S S>

 * * * * * 900

Shirley

1	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

OBR. 14C

48/64

* * * * * 950
 CACCAGTCCAGAGGCAACCAAAACACGTACAGAGGTCAAATGTGGAGATGTCAATGCTGA *
 A P V Q R Q P K H V R G Q N V E M S M L>

 * * * * * 1000
 ATGCATATAACCAAGAGCAAGGCTAAAGAGCTACCTCTTTCTGCTGTACGCTTTATGG *
 N A Y K P K S K A K E L P L S A V R F M>

 * * * * * 1050
 AAGAATTGGGTGAGTGTGCCTTTGGAAATACTATAAAGGCCATCTCTATCTCCAGGCA *
 E E L G E C A F G K I Y K G H L Y L P G>

 * * * * * 1100
 TGGACCATGCTCAGCTGCTGTGCTATCAAGACCTTGAAGACTATAACAACCCAGCAAT *
 M D H A Q L V A I K T L K D Y N N P Q Q>

 * * * * * 1150
 GGATGGAATTTCACAAGAAGCCCTCCCTAATGGCAGAACTGCACCCCAATATTGTCT *
 W M E F Q Q E A S L M A E L H H P N I V>

 * * * * * 1200

Khajone

76	A	19
00810		
1919		
19		

OBR. 14D

49/64

1250
 * * * * *
 GCCTTCTAGGTGCCGTCACCTCAGGAACAACCTGTGTGCATGCTTTTGGAGTATTAATC
 C L L G A V T Q E Q P V C M L F E Y I N>
 * * * * *
 1300
 * * * * *
 AGGGGATCTCCATGAGTTCCTCATCATGAGATCCCACTCTGATGTTGGCTGCAGCA
 Q G D L H E F L I M R S P H S D V G C S>
 * * * * *
 1350
 * * * * *
 GTGATGAAGATGGGACTGTGAATCCAGCCTGGACCACGGAGATTTCTGCACATTGCAA
 S D E D G T V K S S L D H G D F L H I A>
 * * * * *
 1400
 * * * * *
 TTCAGATTGCAGCTGGCATGGAATACCTGTCTAGTCACCTTCTTGCCACAGGACCTTG
 I Q I A A G M E Y L S S H F F V H K D L>
 * * * * *
 1450
 * * * * *
 CAGCTCGCAATATTTAATCGGAGAGCAACTTCATGTAAAGATTTCAGACTTGGGGCCTT
 A A R N I L I G E Q L H V K I S D L G L>
 * * * * *
 1500
 * * * * *

1992	1990
1991	1989
1990	1988
1989	1987
1988	1986
1987	1985
1986	1984
1985	1983
1984	1982
1983	1981
1982	1980
1981	1979
1980	1978
1979	1977
1978	1976
1977	1975
1976	1974
1975	1973
1974	1972
1973	1971
1972	1970
1971	1969
1970	1968
1969	1967
1968	1966
1967	1965
1966	1964
1965	1963
1964	1962
1963	1961
1962	1960
1961	1959
1960	1958
1959	1957
1958	1956
1957	1955
1956	1954
1955	1953
1954	1952
1953	1951
1952	1950
1951	1949
1950	1948
1949	1947
1948	1946
1947	1945
1946	1944
1945	1943
1944	1942
1943	1941
1942	1940
1941	1939
1940	1938
1939	1937
1938	1936
1937	1935
1936	1934
1935	1933
1934	1932
1933	1931
1932	1930
1931	1929
1930	1928
1929	1927
1928	1926
1927	1925
1926	1924
1925	1923
1924	1922
1923	1921
1922	1920
1921	1919
1920	1918
1919	1917
1918	1916
1917	1915
1916	1914
1915	1913
1914	1912
1913	1911
1912	1910
1911	1909
1910	1908
1909	1907
1908	1906
1907	1905
1906	1904
1905	1903
1904	1902
1903	1901
1902	1900
1901	1899
1900	1898
1899	1897
1898	1896
1897	1895
1896	1894
1895	1893
1894	1892
1893	1891
1892	1890
1891	1889
1890	1888
1889	1887
1888	1886
1887	1885
1886	1884
1885	1883
1884	1882
1883	1881
1882	1880
1881	1879
1880	1878
1879	1877
1878	1876
1877	1875
1876	1874
1875	1873
1874	1872
1873	1871
1872	1870
1871	1869
1870	1868
1869	1867
1868	1866
1867	1865
1866	1864
1865	1863
1864	1862
1863	1861
1862	1860
1861	1859
1860	1858
1859	1857
1858	1856
1857	1855
1856	1854
1855	1853
1854	1852
1853	1851
1852	1850
1851	1849
1850	1848
1849	1847
1848	1846
1847	1845
1846	1844
1845	1843
1844	1842
1843	1841
1842	1840
1841	1839
1840	1838
1839	1837
1838	1836
1837	1835
1836	1834
1835	1833
1834	1832
1833	1831
1832	1830
1831	1829
1830	1828
1829	1827
1828	1826
1827	1825
1826	1824
1825	1823
1824	1822
1823	1821
1822	1820
1821	1819
1820	1818
1819	1817
1818	1816
1817	1815
1816	1814
1815	1813
1814	1812
1813	1811
1812	1810
1811	1809
1810	1808
1809	1807
1808	1806
1807	1805
1806	1804
1805	1803
1804	1802
1803	1801
1802	1800
1801	1799
1800	1798
1799	1797
1798	1796
1797	1795
1796	1794
1795	1793
1794	1792
1793	1791
1792	1790
1791	1789
1790	1788
1789	1787
1788	1786
1787	1785
1786	1784
1785	1783
1784	1782
1783	1781
1782	1780
1781	1779
1780	1778
1779	1777
1778	1776
1777	1775
1776	1774
1775	1773
1774	1772
1773	1771
1772	1770
1771	1769
1770	1768
1769	1767
1768	1766
1767	1765
1766	1764
1765	1763
1764	1762
1763	1761
1762	1760
1761	1759
1760	1758
1759	1757
1758	1756
1757	1755
1756	1754
1755	1753
1754	1752
1753	1751
1752	1750
1751	1749
1750	1748
1749	1747
1748	1746
1747	1745
1746	1744
1745	1743
1744	1742
1743	1741
1742	1740
1741	1739
1740	1738
1739	1737
1738	1736
1737	1735
1736	1734
1735	1733
1734	1732
1733	1731
1732	1730
1731	1729
1730	1728
1729	1727
1728	1726
1727	1725
1726	1724
1725	1723
1724	1722
1723	1721
1722	1720
1721	1719
1720	1718
1719	1717
1718	1716
1717	1715
1716	1714
1715	1713
1714	1712
1713	1711
1712	1710
1711	1709
1710	1708
1709	1707
1708	1706
1707	1705
1706	1704
1705	1703
1704	1702
1703	1701
1702	1700
1701	1699
1700	1698
1699	1697
1698	1696
1697	1695
1696	1694
1695	1693
1694	1692
1693	1691
1692	1690
1691	1689
1690	1688
1689	1687
1688	1686
1687	1685
1686	1684
1685	1683
1684	1682
1683	1681
1682	1680
1681	1679
1680	1678
1679	1677
1678	1676
1677	1675
1676	1674
1675	1673
1674	1672
1673	1671
1672	1670
1671	1669
1670	1668
1669	1667
1668	1666
1667	1665
1666	1664
1665	1663
1664	1662
1663	1661
1662	1660
1661	1659
1660	1658
1659	1657
1658	1656
1657	1655
1656	1654
1655	1653
1654	1652
1653	1651
1652	1650
1651	1649
1650	1648
1649	1647
1648	1646
1647	1645
1646	1644
1645	1643
1644	1642
1643	1641
1642	1640
1641	1639
1640	1638
1639	1637
1638	1636
1637	1635
1636	1634
1635	1633
1634	1632
1633	1631
1632	1630
1631	1629
1630	1628
1629	1627
1628	1626
1627	1625
1626	1624
1625	1623
1624	1622
1623	1621
1622	1620
1621	1619
1620	1618
1619	1617
1618	1616
1617	1615
1616	1614
1615	1613
1614	1612
1613	1611
1612	1610
1611	1609
1610	1608
1609	1607
1608	1606
1607	1605
1606	1604
1605	1603
1604	1602
1603	1601
1602	1600
1601	1599
1600	1598
1599	1597
1598	1596
1597	1595
1596	1594
1595	1593
1594	1592
1593	1591
1592	1590
1591	1589
1590	1588
1589	1587
1588	1586
1587	1585
1586	1584
1585	1583
1584	1582
1583	1581
1582	1580
1581	1579
1580	1578
1579	1577
1578	1576
1577	1575
1576	1574
1575	1573
1574	1572
1573	1571
1572	1570
1571	1569
1570	1568
1569	1567
1568	1566
1567	1565
1566	1564
1565	1563
1564	1562
1563	1561
1562	1560
1561	1559
1560	1558
1559	1557
1558	

50/64

* * * * * 1550
 CCAGAGAAATTTACTCCGCTGATTACTACAGGGTCCAGAGTAAGTCCTTGCTGCCCATTC
 S R E I Y S A D Y Y R V Q S K S L L P I>
 * * * * *
 * * * * * 1600
 GCTGGATGCCCCCTGAAGCCCATCATGTATGGCAAAATCTCTTCTGATTCAGATATCTGGT
 R W M P P E A I M Y G K F S S D S D I W>
 * * * * *
 * * * * * 1650
 CCTTTGGGTTGCTTGTGGGAGATTTTCAGTTTGGACTCCAGCCATATTTATGGATTCA
 S F G V V L W E I F S F G L Q P Y Y G F>
 * * * * * 1700
 GTAACAGGAAGTGTGAGATGGTGAGAAACGGCAGCTCTTACCATGCTCTGAAGACT
 S N Q E V I E M V R K R Q L L P C S E D>
 * * * * * 1750
 GCCCACCAGAAATGTACAGCCCTCATGACAGAGTGTGGAATGAGATTCTCTTAGGAGAC
 C P P R M Y S L M T E C W N E I P S R R>
 * * * * * 1800

OBR.14F

76	97
191	97
191	97

L. Krupnik

51/64

1850
 * * * * *
 CAAGATTAAAGATATTCACGTCGGGCTTCGGTCTGGGAGGACTCTCAAGTCACACAA
 P R F K D I H V R L R S W E G L S S H T>
 * * * * *

1900
 * * * * *
 GCTCTACTCCTTCAGGGGGAATGCCACCACACAGACAACCTCCCTCAGTGCCAGCC
 S S T T P S G G N A T T Q T T S L S A S>
 * * * * *

1950
 * * * * *
 CAGTGAGTAATCTCAGTAAACCCAGATATCCTAATTACATGTTCCCGAGCCAGGGTATTA
 P V S N L S N P R Y P N Y M F P S Q G I>
 * * * * *

2000
 * * * * *
 CACCACAGGGCCAGATTGCTGGTTTCATGGCCCGCCCAATACCTCAGAACCCAGCGATTCA
 T P Q G Q I A G F I G P P I P Q N Q R F>
 * * * * *

2050
 * * * * *
 TTCCCATCAATGGATACCCAATACCTCCTGGATATGCAGCGGTTTCCAGCTGCCCACTACC
 I P I N G Y P I P P G Y A A F P A A H Y>
 * * * * *

2100
 * * * * *

25161	00510	36 V 94	ORAD	FORM 5000	10/10/77	178
-------	-------	---------	------	-----------	----------	-----

OBR .14G

L. Kojima

52/64

* * * * * 2150
AGCCAACAGGTCCTCCAGAGTGATTCAGCACTGCCACCTCCCAAGAGTCGGTCCCCAA
Q P T G P P R V I Q H C P P P K S R S P>

* * * * * 2200
GCAGTGCCAGTGGGTCGACTAGCACTGGCCATGTGACTAGCTTGCCCTCATCAGGATCCA
S S A S G S T S T G H V T S L P S S G S>

* * * * * 2250
ATCAGGAAGCAAAATATTCCTTTACTACCACACATGTCAATTCCAAATCATCCTGGTGAA
N Q E A N I P L L P H M S I P N H P G G>

* * * * * 2300
TGGGTATCACCGTTTGGCAACAATCTCAAAACCCTACAAATTGACTCAAGCAAG
M G I T V F G N K S Q K P Y K I D S K Q>

* * * * * 2350
CATCTTTACTAGGACGCCAAATATTCATGGACACACCGAATCTATGATTTCTGCAGAAC
A S L L G D A N I H G H T E S M I S A E>

Dr. H. H. H. H.
Dr. H. H. H. H.

1	9	1	9	6
0	1	0	0	0
7	6	1	9	0
0	1	0	0	0
1	9	1	9	6

OBR. 14H

53/64

2450 * * * * *
TGTAATAATGCACAACCTTTTGTAATGTGGTATACAGGACAAACTAGACGGCCGTAGAAAA
L>

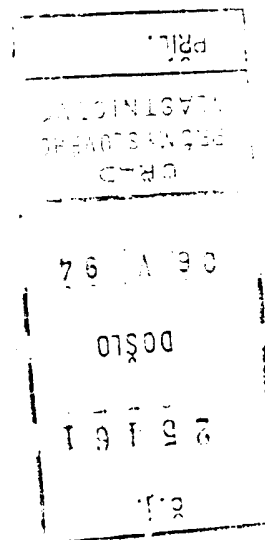
2500 * * * * *
GATTATATTCAAAATGTTTTTATTAAAGTAAGGTTCTCATTAGCAGACATCGCAACAAG

2550 * * * * *
TACCTTCTGTGAAGTTTCACACTGTGTCTTTACCAAGCAGGACAGACACTCGGCCAGAAAAAA

*
GAAAAAATAAAAAAA

OBR .14I

Skriptor
24.10.1992 10:10:10



54/64

* * * * * 50
 TCGCCGCACTCGGACGTGGGGAGCACCGATGATGACCGCAGGTGAAGTCCGCCCTGGAG
 S P H S D V G S T D D D R T V K S A L E>
 * * * * *
 * * * * * 100
 CCCCCGACTTCGTGCACCTTGTGGCACAGATCGCGGGGGATGGAGTACCTATCCAGC
 P P D F V H L V A Q I A A G M E Y L S>
 * * * * *
 * * * * * 150
 CACCACGTGGTTCACAAGGACCTGGGCCACCCGCAATGTGCTAGTGTACGACAAGCTGAAC
 H H V V H K D L A T R N V L V Y D K L N>
 * * * * *
 * * * * * 200
 GTGAAGATCTCAGACTTGGGCCTCTTCCGAGAGGTGTATGCCCGCGATTACTACAAGCTG
 V K I S D L G L F R E V Y A A D Y Y K L>

OBR. 15A

25461	00810	06 V 84	0000	PREVIOUS	FRIL
-------	-------	---------	------	----------	------

Dr. K. J. Zuo
 1992

55/64

[illegible][illegible]

450

*	*	*	*	*	*	*
CAGGTGCTGCCCTTGCCCCGATGACTGTCCCGCTGGGTGTATGCCCTCATGATCGAGTGC						
Q V L P C P D D C P A W V Y A L M I E C >						

OBR .158

Shrine

500 *
 * TGGAACGAGTTCCCGAGCCGGGGCCCGCTTCAAGGACATCCACAGCCGGCTCCGAGCC
 W N E F P S R R P R F K D I H S R L R A>
 550

* TGGGGCAACCTTCCAACTACAACAGCTCGGGCGAGACCTCGGGGCCAGCAACACCACG
 W G N L S N Y N S S A Q T S G A S N T T>
 600

* CAGACCAGCTCCCTGAGCACCGCCAGTGAGCAATGTGAGCAACGCCCGCTACGTGGGG
 Q T S S L S T S P V S N V S N A R Y V G>
 650

* CCCAAGCAGTTGGCCCCCGCCCTTCCCACAGCCCCAGTTCATCCCATGAAGGCCAGATC
 P K Q L A P P F P Q P Q F I P M K G Q I>
 700

* AGACCCATGGTGGCGCGCGGAGCTCTACATCCC
 R P M V P A P Q L Y I>
 750

1991	1991	1991	1991
1991	1991	1991	1991
1991	1991	1991	1991
1991	1991	1991	1991

OBR .15C

Dr. Krijne

025461
D.D.
03A97
00510
PRINCE GEORGE
BRITISH COLUMBIA
CANADA

OBR. 16A

L. Krizner

OBR. 16B

24.000

150
 * * * * *
 Rtk-3 GLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPCPDCCPAWVYALMIECWNEFPSRRPFKDIHSRLRA *
 Rtk-2
 [891]Y.F...E.I..V.K..L...SE...PRM.S..T.....I.....V...S> 600
 r trkB
 [525] .K..WYQL..NE.I.C.TQGR..QR.RT..QE..E..LG..QRE..HT.KNI.N..TL.Q>
 h trk 700
 [516] .K..WYQL..TEAIDC.TQGRE.ER.RA..PE...I.RG..QRE.QQ.HSI..V.A..Q.>
 h IGF-R 500
 [466] AE...Q.L..EQ.LRFVMEGGL.DK..N..DMLFE..RM..QYN.KM..S.LE.I.SIKE>
 N
 |
 |
 h Ins-R 500
 [457] AE...Q.L..EQ.LKFVMDGGY.DQ..N..ER.TD..RM..-Q..NM..T.LE.VNL.K>

59/64

OBR. 16C

1992	10	16	1	0
DOŠLO				
16 A 92				
GRAD				
PROGRAMIJEHO				
LASTNOSTI				
FRL				

Skrijano
 2. 10. 1992

60/64

200 * * * * *

Rtk-3 * * * * *

WG NLSNYNSSAQTSGASNTTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGP KQLAPFPQPQFI PMKGGQI *

Rtk-2 * * * * *

[891] .EG...SHT...TTP...GNA...T...A...L...P...PN-YMFPSQGIT...-GQIA.F.>

F

|

|

h IGF-R

[466] -EMEPGFREVSYY.EENKLPEPEE.DLE.-E.MESVP-LD.SASSSSL.L.D--RHS.HK>

250 * * * * *

Rtk-3 RPMVPAPQLYI

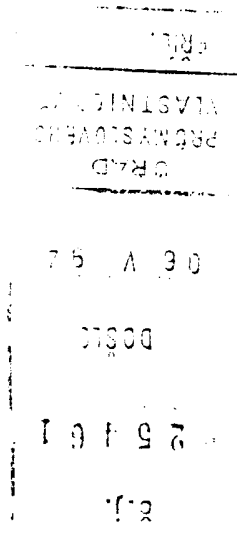
Rtk-2 G.PI.QN.RF.>

[891]

h IGF-R

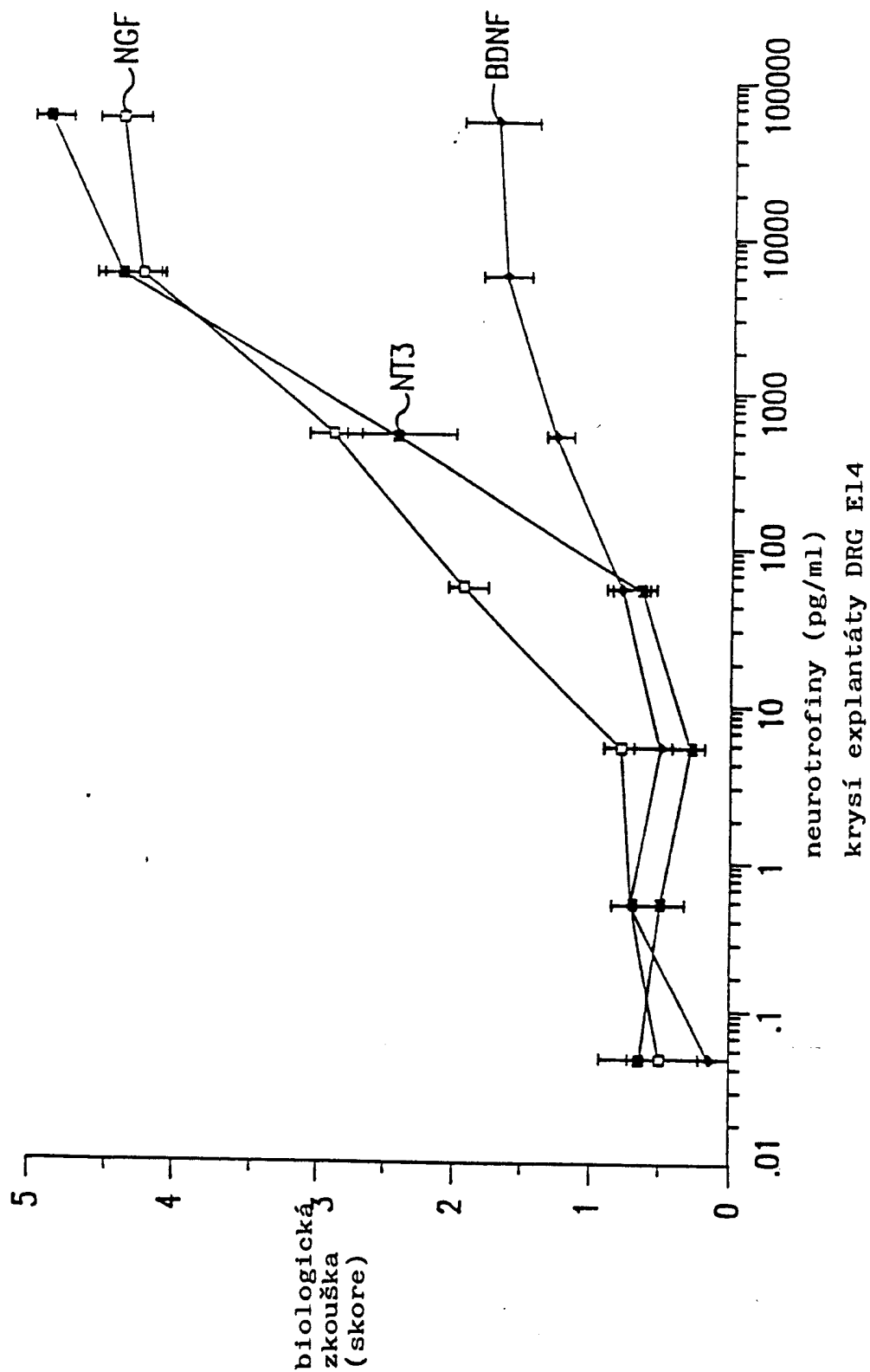
[466] AENG.G.GVLV>

OBR. 16D



Handwritten signature

61/64



178
LASTINIA
ORAD
06 V 92
00810
191 92 0
1.2

OBR .17

L. Kozicová

62/64

NOV 1994
1994
1994

7 2 A 9 8

01500

1 9 1 3 2 0

112

TrkB
↓

NGF

kontrola



OBR. 18B

TrkA
↓

NGF

kontrola



OBR. 18A

Handwritten signature

63/64

ventrální
E14
mícha
mediodorsální

NT-3

BDNF

kontrola

dospělý mozek

PRIL.
114671107
PRONOS. JUVEN.
GRAD
7 6 A 19 0
00500
1 0 1 0 1 0
11



← TrkA

OBR .19A

Elkrijzené

WO 92/18149

PCT/US92/03376

64/64

OBE. 19B

ventrální
mediodorsální } mícha

NT3
BDNF
kontrola
dospělý mozek

← TrkB

OBR. 19C

ventrální
mediodorsální } E14
mícha

NT3
BDNF
kontrola
mozek celkem

← TrkC

76	190
00800	
191520	
2.1	
00800	
191520	
2.1	

L. Kozajda