

Az ee3-proteincsalád és az azokat kódoló DNS-szekvenciák

Kivonat

5

A találmány tárgyát a következők képezik: ee3-proteineket kódoló DNS-szekvenciák; találmány szerinti DNS-szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok; találmány szerinti expressziós vektorokat hordozó gazdasejtek; a találmány szerinti szekvenciák által kódolt géntermékek; a találmány szerinti szekvenciák vonatkozásában módosított transzgenikus állatok; a találmány szerinti géntermékek elleni antitestek; eljárások találmány szerinti géntermékek expresszáltatására és/vagy izolálására; gyógyászatilag aktív vegyületek és előállítási eljárásaik és alkalmazásuk; valamint a találmány szerinti DNS-szekvenciák és/vagy géntermékek nem terápiás célú alkalmazásai.

10

Az ee3-proteincsalád és az azokat kódoló DNS-szekvenciák

A találmány tárgyát a következők képezik: ee3-proteineket kódoló DNS-szekvenciák; találmány szerinti DNS-szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok; találmány szerinti expressziós vektorokat hordozó gazdasejtek; a találmány szerinti szekvenciák által kódolt géntermékek; a találmány szerinti szekvenciák vonatkozásában módosított transzgenikus állatok; a találmány szerinti géntermékek elleni antitestek; eljárások találmány szerinti géntermékek expresszáltatására és/vagy izolálására; gyógyászati lag aktív vegyületek és előállítási eljárásaik és alkalmazásuk; valamint a találmány szerinti DNS-szekvenciák és/vagy géntermékek nem terápiás célú alkalmazásai.

A G-proteinhez kapcsolt receptorok (GPCR) osztályába tartozó proteinek közül számos ismeretes. A GPCR-proteinek alkotják a szignáltranszdukcióban szerepet játszó sejtfelületi molekulák legnagyobb családját. E receptorokat számos különféle ligandum és egyéb stimulus aktiválja, így például, fény (rodopszin), szagok (illatreceptorok), kalcium, aminosavak vagy biogén aminok, nukleotidok, peptidek, zsírsavak és zsírsav-származékok, valamint különböző polipeptidek. Emlősökben a GPCR-osztály kb. 1500 különféle proteinje létezik, melyek közül hozzávetőleg 1200 szagló-, ízlelő- vagy vomeronazális receptor. Az ún. „árva” GPCR-receptorok (azaz olyan receptorok, melyeket ez idáig semmilyen funkcióval nem sikerült kapcsolatba hozni) száma, becslések szerint, mintegy 200-500-ra tehető [Howard és mtsai.: Trends Pharmacol. Sci. 22, 132 (2001)]. C. elegans-ban a GPCR-szekvenciák a teljes genom kb. 5 %-át teszik ki, és hozzávetőleg 1000 GPCR-proteint kódolnak [Bargmann: Science 282, 2028 (1998); és Bargmann és Kaplan: Annu. Rev. Neurosci. 21, 279 (1998)].

Korábban azt találták, hogy a Drosophila melanogaster-ben kb. 200 GPCR-szekvencia található [Brody és Cravchik: J. Cell. Biol. 150, 83 (2000)]. Az ilyen nagy számú, topológiai lag hasonló molekulák feltehetően konvergens módon, a G-proteinekhez történő kötődés céljából alakultak ki.

A GPCR-molekulák osztályát általában három vagy négy családra osztják. Az „A” családba tartozik messze a legtöbb receptor; például, ide tartoznak, többek között, az illatreceptorok [Buck és Axel: Cell 65, 175 (1991)]. A „B” családba a szekretin, a VIP és a kalcitonin receptorai tartoznak. A „C” csoportba olyan receptorok tartoznak, mint a metabotróp glutamát-receptorok, a kalcium-receptorok, a GABA-B-receptorok, az ízreceptorok és a feromonreceptorok. Mindazonáltal, az „árva” GPCR-szekvenciák gyakorlatilag mindegyike az „A” családba tartozik.

A GPCR-családok egyik jellemzője a G-proteineken keresztül megvalósuló szignáltranszdukció. Egy extracelluláris ligandum kötődése egy G-protein aktiválását indukálja, amely azután átalakítja a szignált. Hozzávetőleg 200 különböző G-protein létezik, melyekből az egyes sejttípusok más-más összetételű készlettel bírnak. Egy G-protein aktív alakja a GTP-kötött alak (a G-protein inaktív alakban GDP-hez van kötődve). Mivel a G-protein GTP-ázként funkcionál, a GTP-hez történő kötődést követően inaktíválja magát, emiatt a G-proteineken keresztül megvalósuló szignáltranszdukció mindig átmeneti esemény. Valamennyi G-protein három alegységből (α , β és γ) áll. Az alfa-alegység a GTP megkötésére, s ezáltal a jelátviteli folyamat következő stádiumában szerepet játszó jeltovábbítók („másodlagos jeltovábbító” rendszer) szabályozására képes. Például, a G_s -protein az adenilát ciklázt aktiválja (stimulálja), ezáltal az intracelluláris jeltovábbító cAMP koncentrációjának növekedését eredményezi. A G_i -protein gátolja az adenilát ciklázt, míg a G_q -protein a foszfolipáz-C-t aktiválja (másodlagos jeltovábbítók: inozitol-trifoszfát és diacilglicerín). A gyakran alkalmazott másodlagos jeltovábbító-rendszerek például a kalcium, K, cGMP és hasonlóak említhetők. Léteznek kiméra G-proteinek is. A $G-\beta$ és $G-\gamma$ alegységek – a három részből álló proteinkomplexről történő lehasításuk után - szintén előidézhethetnek szignáltranszdukciót, például, valószínűleg a MAP-kináz jelátviteli reakciótak aktiválása révén. A G-proteinek adott GPCR-hez történő kapcsolódásának specifikitása gyógyászati szempontból jelentős tulajdonság, amely, többek között, vizsgálati eljárások kifejlesztésére használható ki, melyek jellemzően az ún. másodlagos jeltovábbítók (mint például, kalcium, cAMP vagy inozitol-trifoszfát) koncentrációjának meghatározásán alapulnak. Az utóbbi években, előzetes eredmények alapján, a MAP kináz jelátviteli reakciótak is az érdeklődés középpontjába kerültek, melyek szintén képesek a GPCR-szignálok transzdukciójára [Marinissen és Gutkind: Trends Pharmacol. Sci. 22, 368 (2001)].

Végül, elvileg G-proteintől független szignáltranszdukció is lehetséges; például, a β -2-adrenerg receptor és az NHERF-protein közötti közvetlen interakció módosítja egy Na/H-cserélő aktivitását [ld. Hall és mtsai.: Nature 392, 626 (1998)].

Egy másik tulajdonság, amely a legtöbb – ha nem mindegyik – GPCR-receptorra jellemző, az oligomerizáció. Különösen fontosak ebből a szempontból a különböző GPCR-receptorok közötti heterodimerizációk, melyek módosíthatják a gyógyászati sajátságokat és a ligandum-specifikitást [Bouvier: Nat. Rev. Neurosci. 2, 274 (2001)]. Például, a GABA-B-receptor csak a GBR1-ből és a GBR2-ből álló heterodimerként funkcionál [Kuner és mtsai.: Science 283, 74 (1999)]. Az ilyen heterodimerizációt azóta számos GPCR (például, mGluR5, delta-opioid receptor és mások) esetében leírták. Néhány éve, preeclampsias esetben, bizo-

nyitották a GPCR heterodimer-pár egyik tagjának megnövekedett mértékű - rendellenességet okozó – expresszióját. Ebben az esetben a bradikinin-II-receptor fokozott mértékű expressziója a bradikinin-II/angiotenzin-II-receptor-heterodimerek megnövekedett mennyiségben történő kialakulását eredményezi, melyek megváltozott farmakológiai reakciója adhat magyarázatot a hipertóniás fenotípusra [AbdAlla és mtsai.: Nat. Medicine 7, 1003 (2001)].

Végül, a GPCR-osztályba tartozó proteinek előnyös farmakológiai célmolekulák: a 100 legnagyobb forgalmú gyógyszer több, mint 25 %-ának célmolekuláját GPCR-osztályba tartozó protein képezi [Flower és mtsai.: Biochim. Biophys. Acta 1422, 207 (1999)]. Ilyenformán, a következő receptor-csoportok agonistái és antagonistái bírnak a legnagyobb gyógyászati jelentőséggel: adrenoreceptorok, angiotenzin-II-receptor, szerotonin-receptorok, dopamin-receptorok, hisztamin-receptorok és leukotrién/prostaglandin-receptorok. Az ilyen receptorokra ható gyógyszerekkel a betegségek igen széles spektruma fedhető le, a pszichiátriai tünetektől (skizofréniák, depressziók), a magas vérnyomás (hipertenzió) befolyásolásán át a szívleállás elsősegély-kezeléséig. Az említett receptorokra ható, szokásos gyógyszerek ismert példái közé tartoznak, többek között, az alfa-adrenoceptor agonisták (norfenefrin), béta-adrenoceptor agonisták (izoprenalin, fenoterol), alfa-adrenoceptor-blokkolók (prazosin), béta-adrenoceptor-blokkolók (propanolol), 5-HT antagonisták (ciproheptadin), H2-receptor-blokkolók (cimetidin), H1-receptor-blokkolók (terfenadin), dopamin-agonisták (bromocriptin) és hasonló.

Mindazonáltal, az említett receptorok által befolyásolt szignáltranszdukciós reakcióutak - az intenzív kutatások ellenére – továbbra sincsenek kellő részletességgel feltárva. Ezen túlmenően, a különböző GPCR-rendszerek kölcsönös egymásra hatásának komplex rendszere, illetve annak későbbi intracelluláris folyamatokra gyakorolt hatása (különös tekintettel a külső fiziológiai állapotokra) is tisztázásra szorul.

A találmány kidolgozása során célul tűztük ki a GPCR-proteinek osztálya további tagjainak, illetve az azokat kódoló nukleotidszekvenciák azonosítását. További célunk – az azonosított proteinek alapján – terápiás szempontból aktív anyagok kifejlesztését elősegítő eljárások kifejlesztése volt, mely aktív anyagok, például, szabályozatlan expresszió és/vagy működésképtelen változatok expressziója által okozott kóros állapotok terápiaszerű kezelésére alkalmazhatók. További célul tűztük ki az ilyen aktív anyagok feltárását.

Azt találtuk, hogy a találmány kidolgozása során kitűzött céljaink az 1., 5., 6., 8., 11., 12., 15., 16., 17., 20., 23., 26. és 27. igénypontban megfogalmazott megoldásokkal érhetők el, melyek előnyös megvalósítási módjait a megfelelő aligénypontokban adjuk meg.

Ilyenformán, a találmány egyik szempontjának megfelelően, nukleinsav-szekvenciákat – közelebbről, DNS-szekvenciákat - tárunk fel, amelyek a következő aminosav-szekvenciákat tartalmazó polipeptideket kódoló nukleinsav-fragmenst tartalmaznak: a 13. ábrán bemutatott 5. szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 65. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia (az aminosavak számozását minden esetben N-terminális → C-terminális irányban adjuk meg); a 14. ábrán bemutatott 6. szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 75. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; a 15/A ábrán bemutatott 7A-szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 60. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; a 15/B ábrán bemutatott 7B-szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 60. aminosaváig, még előnyösebben, 10. aminosavától 100. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; a 15/C ábrán bemutatott 7C-szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 60. aminosaváig, még előnyösebben, 10. aminosavától 100. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; a 16. ábrán bemutatott 8. szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 60. aminosaváig, még előnyösebben, 10. aminosavától 100. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; vagy a 18. ábrán bemutatott 11. szekvencia 10. aminosavától 45. aminosaváig (előnyösebben annak 10. aminosavától 60. aminosaváig, még előnyösebben, 10. aminosavától 100. aminosaváig) terjedő aminosav-szekvencia; ideértve a szóban forgó nukleinsav-szekvenciák valamennyi funkcionálisan homológ származékát, fragmensét vagy alléljét. Még előnyösebbek azok a nukleinsav-szekvenciák (közelebbről, DNS-szekvenciák), amelyek egy ee3-családba tartozó protein aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptidet kódoló szekvencia-régiót tartalmaznak, amibe egy találmány szerinti protein vagy (előnyösen, legalább 25 aminosavas) fragmense C-terminális (intracelluláris) szakaszát is kiváltképp bele kell érteni. Szintén a találmány tárgyához tartoznak a találmány szerinti szekvenciák bármelyikével hibridizáló nukleinsav-szekvenciák (minden esetben beleértve a kettős szálaban komplementer szekvenciákat is).

A találmány egy következő előnyös megvalósítási módja értelmében DNS-szekvenciákat tárunk fel, amelyek a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrákon bemutatott polipeptideket (5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8., illetve 11. azonosítószámú szekvenciák) kódolnak, ideértve az ilyen DNS-szekvenciák funkcionális szempontból homológ származékait, alléljait vagy fragmenseit, továbbá a DNS-szekvenciák a fiziológiai funkció például, apoptózisos szignál-kaskád) gátlására képes – nem funkcionális – származékait, alléljait, analógjait és fragmenseit (pl.

DNS-változatok). Feltárjuk továbbá a szóban forgó, találmány szerinti DNS-szekvenciákkal hibridizálódó DNS-szekvenciákat is (ideértve a komplementer DNS-szál szekvenciáját). A találmány szerinti aminosav-szekvenciák (5-8. azonosítószámú szekvenciák) vagy az ee3-proteincsalád egyéb natív tagjainak származékai, alléljai, fragmensei vagy analógjai az eredeti protein legalább egy biológiai tulajdonságával bírnak. Az ilyen származékok, analógok, fragmensek vagy allélek standard eljárásokkal állíthatók elő [ld. Sambrook és mtsai.: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1989 és 2001)], melyek során a találmány szerinti – ee3-családba tartozó - DNS-szekvenciákban (például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C és 12. ábrán bemutatott szekvenciákban) egy vagy több kodont inszercióval, delécióval vagy szubsztitúcióval módosítunk, majd – transzkripciót és transzlációt követően – olyan polipeptidekhez jutunk, amelyek legalább egy aminosavban eltérnek a megfelelő, natív ee3-proteinektől (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciáktól).

A találmány értelmében feltárjuk a találmány szerinti natív ee3-szekvenciák (például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C és 12. ábrán bemutatott szekvenciák) részleges DNS-szekvenciáit, amelyek jellemzően a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C és 12. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák fragmensei, melyek legalább 60 nukleotidot, előnyösebben, legalább 150 nukleotidot, még előnyösebben, legalább 250 nukleotidot tartalmaznak. A találmány szerinti, előnyös részleges DNS-szekvenciák olyan polipeptideket kódolnak, amelyek az 5. azonosítószámú szekvencia 20. aminosavától, a 6. azonosítószámú szekvencia 20. aminosavától, a 7/a azonosítószámú szekvencia 20. aminosavától, a 7/b azonosítószámú szekvencia 20. aminosavától, a 7/c azonosítószámú szekvencia 10. aminosavától, illetve a 8. azonosítószámú szekvencia 20. aminosavától C-terminális irányban legalább 20 aminosavat, előnyösen, legalább 40 aminosavat, még előnyösebben, legalább 60 aminosavat, legelőnyösebben a C-terminális aminosavig terjedő valamennyi további aminosavat tartalmazza (a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciák számozásának megfelelően). A legalább 20 aminosavat kódoló részleges DNS-szekvenciák a megadott pozícióktól eltérő kodonoknál is kezdődhetnek. A találmány tárgyához tartozik a fenti részleges DNS-szekvenciák származékai, analógjai, illetve alléljai is. A találmány szerinti részleges DNS-szekvenciák által kódolt aminosav-szekvenciák (akár önmagukban, akár nagyobb méretű rekombináns proteinek részeként) szintén a találmány tárgyat képezik. Ezen túlmenően, a találmány tárgyához tartoznak a találmány szerinti szekvenciák valamennyi lehetséges vagy természetben előforduló „splicing” változata is.

Különösen előnyösek azok a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák (közelebbről, DNS-szekvenciák), amelyek az 5., 6., 7. és 8. azonosítószámú szekvenciákkal legalább 60 %-ban, előnyösen, legalább 80 %-ban, még előnyösebben, legalább 95 %-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó proteint kódolnak. A találmány szerinti nukleotidszekvenciák – például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák – vagy funkcionális vagy nem funkcionális megfelelőik (allélváltozataik vagy izoalakjaik) például, izolálás és szekvenálás után nyerhetők. A találmány értelmében az „allélváltozatok” kifejezésen olyan változatokat értünk, amelyek – aminosav szinten – 60-100 %-ban, előnyösen 70-100 %-ban, még előnyösebben 90-100 %-ban homológok. Közelebbről, szintén az allélváltozatok közé tartoznak azok a funkcionális vagy nem funkcionális változatok, amelyek a natív ee3-nukleotidszekvenciák (például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák) nukleotidjainak deléciójával, inszerciójával vagy szubsztitúciójával hozhatók létre, és továbbra is megtartják a kiindulási nukleinsav legalább egy kulcsfontosságú biológiai tulajdonságát.

A homológ vagy rokon szekvenciájú DNS-szekvenciák tetszőleges emlősfajokból vagy más fajokból (ideértve az embert is), jól ismert eljárásokkal izolálhatók, mint például, találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák vagy részleteik mintájával végzett hibridizációs homológia-szkrínéléssel. A funkcionális megfelelők közé tartoznak a natív ee3-szekvenciák (például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák) homológjai, például, azok más emlősfajokból származó homológjai, lerövidített szekvenciái, illetve a kódoló vagy nemkódoló DNS-szekvencia egyszeres DNS- vagy RNS-szála. A funkcionális megfelelők - például, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott DNS-szekvenciákból vagy azok részleteiből kiindulva – más gerincesfajokból (például, emlősökből) izolálhatók. A találmány szerinti megoldás értelmében a funkcionális megfelelők közé tartozik minden olyan szekvencia, amely képes hibridizálódni a találmány szerinti ee3-szekvenciákkal (különösen a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott DNS-szekvenciákkal). Ezek a DNS-szekvenciák standard feltételek mellett hibridizálódnak. A hibridizáltatásra előnyösen – szakember számára jól ismert módszerekkel meghatározható - konzervált régiókat magukban foglaló, rövid oligonukleotidokat alkalmazunk, azonban lehetőség van a találmány szerinti nukleinsavak hosszabb fragmenseinek (vagy akár a teljes szekvenciák) alkalmazására is.

Az említett standard hibridizációs feltételek az alkalmazott nukleinsav-szekvenciától (oligonukleotid, hosszabb fragmens vagy teljes szekvencia) és/vagy a hibridizáltatásra alkalmazott nukleinsav típusától (DNS vagy RNS) függően változóak lehetnek. Például, a

DNS:DNS hibridek olvadási hőmérséklete kb. 10 °C-kal kisebb, mint az azonos hosszúságú DNS:RNS hibrideké. A standard feltételek - az alkalmazott nukleinsavtól függően -, például, a következők lehetnek: 42-58 °C-on, 0,1-5-szeres koncentrációjú SSC-pufferben (1 x SSC = 0,15 M NaCl; 15 mM nátrium-citrát; pH = 7,2) vagy - a puffer mellett - 50 % formamid jelenlétében végzett hibridizáció (például, 42 °C-on 5 x SSC-pufferben, 50 % formamid jelenlétében végzett hibridizáció). A DNS:DNS hibridek hibridizációs feltételei, előnyösen, a következők: 0,1 x SSC-pufferben, kb. 20-45 °C-on, előnyösen kb. 30-45 °C-on végzett hibridizáció. DNS:RNS hibridek esetében a hibridizációt, előnyösen, 0,1 x SSC-pufferben, kb. 30-55 °C-on, előnyösen kb. 45-55 °C-on végezzük. Ezek a hibridizációs hőmérsékletek olyan olvadáspont értékek, melyek, például, hozzávetőleg 100 nukleotidból álló és 50 % G+C-tartalmú nukleinsavra (formamid hiányában) vannak kiszámítva. A DNS-hibridizáció kísérleti feltételeit speciális genetikai szakkönyvekben részletesen leírták [ld. pl., Sambrook és mtsai.: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)], illetve, szakember számára jól ismert képletek alapján (például, a nukleinsavak hosszúsága, a hibridek típusa és a G+C-tartalom függvényében) kiszámíthatók. A nukleinsavak hibridizáltatásával kapcsolatos további tudnivalókat illetően ld. „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., John Wiley & Sons, New York (1985); „Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach”, szerk.: Hames és Higgins, IRL Press at Oxford University Press, Oxford (1985); „Essential Molecular Biology: A Practical Approach”, szerk.: Brown, IRL Press at Oxford University Press, Oxford (1991).

A találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák egyenértékű megfelelői közé tartoznak a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott szekvenciák származékai (pl., promóterváltozatai) is. A nukleotidszekvenciáktól 5'-irányban (együtt vagy külön-külön) elhelyezkedő promóterek egy vagy több nukleotidot érintő szubsztitúcióval, inszercióval és/vagy delécióval módosíthatók, miáltal a promóterek funkcionalitása vagy hatékonysága megtartható vagy megváltoztatható. Ennek megfelelően, a promóterek hatékonyságát szekvenciájuk módosításával vagy hatékonyabb (akár más fajokból származó) promóterekkel történő helyettesítésével növelhetjük. A találmány értelmében a nukleinsav-származékok közé tartoznak azok a változatok is, amelyek nukleotidszekvenciája a kezdőkodontól 5'-irányban 1-1000 nukleotid távolságra úgy van módosítva, hogy a gén expressziója és/vagy az által kódolt protein termelődése megváltozzon (előnyösen, fokozódjon).

Ezen túlmenően, a származékok közé tartoznak a 3'-végükön módosított változatok is.

A szakirodalomból ismert „jelzőtoldalékok” példái közé tartoznak a hexahisztidines „horgonyok”, illetve a különböző antitestek által antigénként felismert epitópok [példaként említhető az ún. „jelzőzászló” („flag tag”) is; Studier és mtsai.: Meth. Enzymol. 185, 60 (1990); „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., John Wiley & Sons, New York (1985)] és/vagy a transzláció eredményeként létrejött protein (például, sejtorganelumba vagy extracelluláris térbe történő) szállításában szerepet játszó legalább egy szignálszekvencia.

Ezenfelül, a találmány szerinti nukleinsav-konstrukciók vagy nukleinsavak (például, 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott szekvenciák), illetve származékaik, változataik, homológjaik vagy fragmenseik terápiás vagy diagnosztikai szempontból megfelelő alakban is expresszáltathatók. A rekombináns protein vektorrendszerek vagy – a nukleinsavat vagy a nukleinsav-konstrukciót adott nukleotidszekvenciákkal meghosszabbító, és ezáltal (például, egyszerű tisztítást lehetővé tevő) módosított polipeptideket (ideértve a fentebb említett jelölőszekvenciákat) kódoló – oligonukleotidok alkalmazásával hozhatók létre.

A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyösek azok a DNS-szekvenciák is, amelyek találmány szerinti genomi DNS-szekvenciák (c)DNS-szekvenciáinak felelnek meg vagy azokat tartalmazzák.

A találmány tárgyához tartozik valamennyi olyan DNS-szekvencia, amely a találmány szerinti, 5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8. és 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteinek aminosav-szekvenciájának lényegében megfelelő proteint kódol. Az ilyen DNS-szekvenciák a fentebb említett ábrákon bemutatott szekvenciákhoz képest csak kevés módosítást tartalmaznak (és, például, izoalakok lehetnek). A szekvencia-módosítások száma rendszerint legfeljebb tíz lehet. Az ilyen DNS-szekvenciák (amelyek lényegében megfelelnek az 5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8. és 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteinek kódoló DNS-szekvenciáknak, s amelyek hasonlóan biológiailag aktív proteint kódolnak), jól ismert mutagenizálási módszerekkel állíthatók elő, és az ilyen mutánsok által kódolt proteinek biológiai aktivitása szkrínelési eljárásokkal azonosítható; például, kötési tesztekkel vagy a biológiai funkció kifejeződésének meghatározása alapján (például, neuronális folyamatokkal vagy apoptózissal összefüggésben). A megfelelő mutagenizálási eljárások közé tartozik a „helyspecifikus” mutagenézis, amely legalább egy módosított bázist tartalmazó láncindító oligonukleotid automatizált szintézisét foglalja magában. A polimerizációs reakciót követően a heteroduplex vektort megfelelő gazdasejt-rendszerbe (pl., E. coli sejtekbe) juttatjuk be, és megfelelően transzformált klónokat izolálunk.

A találmány szerinti szekvenciák funkcionalitása, többek között, közvetlenül kapcsolódik a jelátviteli reakcióút - találmány szerinti proteinek által aktivált - távolabbi elemeinek azonosításával. A találmány kidolgozása során azt találtuk, hogy a találmány szerinti receptorok MAP kinázokat stimulálnak. Az ilyen MAP kinázok azonosítására alkalmazott riporter-tesztek (ld. a példákat) mellett, erre a célra előregyártott reagenskészletek (pl., „Mercury” in vivo kináz-tesztelő reagenskészlet; Clontech) alkalmazhatók. A tesztek egy foszforilációs célmolekula (transzkripciós faktorok, pl., „jun”) transzaktivátor doménjéhez fuzionált tet-represszor expresszálatását foglalják magukban. A tet-represszor elem szabályozása alatt a luciferáz-konstrukció aktiválása csak akkor következik be, ha egy kináz specifikusa foszforilálja a transzaktivátor domént. A találmány szerinti megoldás értelmében, ezen a módon, lehetséges van egy találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptor vagy annak találmány szerinti változata aktivitásának celluláris szignáltranszdukciós reakcióhoz történő kijelölésére.

A találmány szerinti szekvenciák azonosítása, többek között, azon a funkcionális felismerésen alapul, hogy állatmodellben az egéredetű ee3_1_m serkentő szabályozása – megnövekedett mértékű EPO-expresszió mellett – azt jelzi, hogy a szóban forgó receptor szerepet játszik a sejtek túlélését és a sejtek ilyen állapothoz történő alkalmazkodását befolyásoló folyamatokban. Ennek megfelelően, a találmány szerinti receptorok a csökkent oxigénellátással (közelebbről, csökkent agyi oxigénellátással) járó betegségek esetében különösen nagy gyógyászati jelentőséggel bírnak.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti DNS-szekvenciák előállítására, módosítására és/vagy detektálására a szakember számára jól ismert eljárások bármelyike alkalmazható, amely in vivo, in situ vagy in vitro kivitelezhető [mint például, a polimeráz-láncreakció (PCR); ld. Innis és mtsai.: „PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications”, valamint a kémiai szintézis]. Az ilyen célra megfelelő PCR-láncindítók a találmány szerinti DNS-szekvenciákba új funkciók (például, a restriktációs hasítási helyek és terminációs kodonok) beépítését teszik lehetővé, elősegítve ezáltal a klónozóvektorokba inszertálható találmány szerinti szekvenciák tervezését.

A fentiekén túlmenően, találmány szerinti nukleinsav-szekvenciát (jellemzően DNS-szekvenciát) tartalmazó expressziós vektorokat vagy rekombináns nukleinsav-konstrukciókat tárunk fel. Az ilyen vektorokban, illetve nukleinsav-konstrukciókban a nukleinsav-szekvenciák, előnyösen, legalább egy genetikai szabályozóelemhez (például, transzkripciós vagy transzlációs szignálokhoz) működőképesen van kapcsolva. Ez a kapcsolat – a kívánt alkalmazástól függően – az expresszió természetes szintjét vagy a natív génexpresszió fokozását vagy csökkentését.

kentését eredményezi. Az így előállított expressziós vektorok gazdaszervezetek vagy gazdas sejtek (például, emlőseredetű sejtek tenyészteteinek) transzformálására alkalmazhatók.

A találmány szerinti expressziós vektorokban rendszerint natív szabályozóelem(ek)et alkalmazunk, például, egy ee3-családba tartozó, találmány szerinti proteint (közelebbről, az 5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8. vagy 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteint) kódoló gén promóter- és/vagy erősítőszekvenciáját, amely, például, emlőseredetű, közelebbről, humán szabályozószekvenciáknak megfelelő szekvencia lehet. Az ilyen natív szabályozószekvenciák, alkalmas esetben, szintén alávethetők genetikai módosításnak, amelynek célja az expresszió intenzitásának megváltoztatása. A natív szabályozószekvenciák mellett – vagy azok helyett –, más gének esetében lehetőség van arra, hogy a találmány szerinti DNS-szekvenciáktól 5'- vagy 3'-irányban tartalmazzanak natív szabályozóelemeket, (5'- vagy 3'-oldali szabályozószekvenciák) amelyek, alkalmas módon, szintén hordozhatnak genetikai módosításokat, miáltal a fentebb említett, natív szabályozószekvenciák által biztosított természetes szabályozás kikapcsolt állapotba kerül, lehetővé téve ezáltal az említett gének fokozott vagy csökkentett mértékű expresszióját.

A találmány szerinti eljárás gyakorlati kivitelezésére előnyösen alkalmazható szabályozószekvenciák, például, az olyan promóterekben található, mint a cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, l-PR vagy l-PL (mely promóterek Gram-negatív baktériumokban alkalmazhatók előnyösen). További előnyösen alkalmazható szabályozószekvenciák található, például, a Gram-pozitív promóterekben (mint például, amy és SPO2), élesztőeredetű promóterekben (például, ADC1, Mfa, AC, P-60, CYC1, GAPDH) vagy emlőseredetű promóterekben (pl., CaM KinázII, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, β -globin, GFAP, GAP43, tirozin hidroxiláz, kainát-receptor 1. alegység, glutamát-receptor B-alegység). A találmány szerinti expressziós vektorokban elvileg bármely természetes promóter alkalmazható (mint például, a fentebb említettek).

A fentiekén túlmenően, lehetséges és előnyös lehet szintetikus promóterek alkalmazása is. Az ilyen szabályozószekvenciák felhasználásának célja a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák célzott expresszáltatása. Ez - az alkalmazott gazdaszervezettől függően –, például, azt jelentheti, hogy a gén expressziója vagy túlzott mértékű expressziója csak indukciót követően következik be, vagy más módon, a gén expressziója és/vagy túlzott mértékű expressziója azonnal bekövetkezhet. A szabályozószekvenciák vagy faktorok előnyösen jótékony hatást gyakorolnak az expresszióra, s ezáltal növelik annak mértékét. Ilyenformán, az expresszió transzkripció szinten erős transzkripció szignálok (például, promóterek és/vagy erősítőszek-

venciák) alkalmazásával erősíthető. Mindazonáltal, az expresszió transzlációs szinten is serkenthető, például, az mRNS stabilitásának javításával.

A szabályozószekvenciák közé tartozik valamennyi olyan - szakember számára jól ismert - elem, amely képes a találmány szerinti szekvenciák expressziójának transzkripció és/vagy transzlációs szintű befolyásolására. A promóterszekvenciák mellett különösen jelentős az ún. „erősítőszekvenciák” is, amelyek az RNS-polimeráz és a DNS közötti interakció javítása révén képesek az expresszió mértékének növelésére. A szabályozóelemek további példáiként említhetők a „lokusz-szabályozó régiók”, a „silencer”-ek, illetve ezek részleges szekvenciái. Az ilyen szabályozószekvenciák szövetspecifikus expresszáltatásra alkalmazhatók előnyösen. A találmány szerinti expressziós vektorok tartalmazhatnak „terminációs szekvenciákat” is, amelyeket a találmány leírásában szintén a „szabályozószekvencia” kifejezés jelentésébe tartozónak tekintünk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti nukleinsav-szekvencia egy promóterhez van kapcsolva, mely promóter jellemzően a találmány szerinti DNS-szekvenciától 5'-irányban helyezkedik el. Az expressziós vektor további szabályozószignálokat is tartalmazhat, így például, 3'-oldali terminációs szekvenciákat, poliadenilációs szignálokat vagy erősítőszekvenciákat. Egy találmány szerinti génkonstrukcióban – vagy, alkalmas esetben, külön génkonstrukciókban – a találmány szerinti nukleinsavak (közelebbről, a 9., 10., 11/A, 11/B, 11/C vagy 12. ábrán bemutatott szekvenciák) egy vagy több kópiája helyezhető el.

Az „expressziós vektor” kifejezésen fentebb említett rekombináns nukleinsav-konstrukciókat vagy génkonstrukciókat, illetve komplett vektorkonstrukciókat értünk, amelyek a találmány szerinti DNS-szekvenciákon és a lehetséges szabályozószekvenciákon kívül további elemeket is tartalmaznak. Az ilyen vektorkonstrukciókat vagy vektorokat megfelelő gazdaszervezetben történő expresszáltatásra alkalmazzuk. Egy gazdasajt-specifikus vektorba (amely lehetővé teszi a benne foglalt gének kiválasztott gazdaszervezetben történő optimális expresszáltatását) legalább egy találmány szerinti DNS-szekvenciát (például, ee3-családba tartozó humán gént, közelebbről, ee3_1- vagy ee3_2-gént; vagy e gének részleges szekvenciáját) inszertálunk. A vektorok szakember számára jól ismertek; leírásukat illetően ld. pl., „Cloning Vectors”, szerk.: Pouwels és mtsai., Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford, ISBN 0 444 904018 (1985). A vektorok közé tartoznak – a plazmidok mellett – az olyan, szakember számára jól ismert vektorok is, mint például, a fágok, vírusok (pl. SV40, CMV, baculovírus, adenovírus, Sindbis-vírus), transzpozonok, IS-elemek, fágemidek, kozmidok, illetve lineáris

vagy cirkuláris DNS-ek. Ezek a vektorok a gazdaszervezetben önállóan vagy kromoszómába integrálódva képesek replikálódni. Az emlősök kromoszómaiba történő integrációra jellemzően lineáris DNS-t alkalmazunk.

A találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák expressziója a génkópiák számának növelésével és/vagy - a génexpresszióra jótékony hatást gyakorló - szabályozófaktorok erősítésével fokozható. Ennek megfelelően, a szabályozóelemek erősítését - transzkripció szinten - erősebb transzkripció szignálok (például, promóterek és erősítőszekvenciák) alkalmazásával valósíthatjuk meg. Ezen túlmenően, a translációt, például, az mRNA stabilitásának javításával vagy az mRNA riboszómák általi leolvasási hatékonyságának fokozásával is erősíthetjük.

A génkópiák számának növelése, például, oly módon valósítható meg, hogy a nukleinsav-szekvenciákat vagy homológ géneket, például, olyan nukleinsav-fragmentsbe vagy vektorba foglaljuk, amely, előnyösen, tartalmazza a szóban forgó génekhez szükséges szabályozószekvenciákat vagy promótereket. Elsősorban olyan szabályozószekvenciákat alkalmazhatunk előnyösen, amelyek fokozzák a génexpressziót.

A találmány szerinti nukleinsav-szekvenciákat kölcsönható vagy potenciálisan kölcsönható proteinek kódoló szekvenciákkal együtt azonos vektorba klónozzhatjuk, majd egy gazdaszervezetben in vitro vagy egy gazdaszervezetben in vivo expresszáltatjuk. Más módon, a potenciálisan kölcsönható nukleinsav-szekvenciákat és a találmány szerinti, ee3-családba tartozó kódolószekvenciákat külön vektorokba inszertálhatjuk, és az egyes vektorokat - szokványos eljárásokkal, például, transzformációval, transzfekcióval, transzdukcióval, elektroporációval vagy részecskebombázással - külön-külön juttatjuk a kívánt gazdaszervezetbe.

Egy további előnyös megvalósítási mód szerint, a találmány szerinti vektor (közelebből, komplett vektorkonstrukció) legalább egy markergént (például, antibiotikum-rezisztencia gént és/vagy fluoreszcens proteint, pl. GFP-t kódoló gént) is tartalmaz.

A találmány egy további szempontja értelmében találmány szerinti DNS-szekvenciával és/vagy találmány szerinti expressziós vektorral (közelebből, vektorkonstrukcióval) transzformált gazdaszervezetet tárunk fel. Gazdasejtként lényegében bármely sejt alkalmazható, melyek lehetővé teszik a találmány szerinti DNS-szekvenciák (ideértve, következésképp, például származékokként, alléljaikat és funkcionális megfelelőiket is) önmagukban vagy más szekvenciákkal (közelebből, szabályozószekvenciákkal) együtt történő expresszióját. A találmány céljaira alkalmas gazdasejtek prokarióta és eukarióta sejtek lehetnek, mint például, baktériumsejtek, gombasejtek, élesztősejtek, növényi sejtek és állati eredetű sejtek. Gazdasejtként, előnyösen, baktériumsejteket (pl. E. coli-t, Streptomyces, Bacillus vagy Pseudomonas fajokat), illet-

ve eukarióta mikroorganizmusokat (például, *Aspergillus* fajokat vagy *Saccharomyces cerevisiae*-t [közönséges sütőélesztő; ld. Stinchcomb és mtsai.: *nature* 282, 39 (1997)]) alkalmazhatunk. A találmány szerinti proteinek viszonylag nagy mennyiségben történő termeltetésére különösen előnyösek a metilotrop élesztők, mint pl., a *Pichia pastoris*. Termeltetésük céljából a receptorokat megfelelő expressziós vektorokba klónozzuk, mely vektorok, például, egy tisztítást elősegítő jelölőt tartalmazó fúziós protein expresszióját is lehetővé teszik; végül, az élesztősejtek elektroporációját követően, stabil klónokat szelektálunk. Az Invitrogen társaság ezen eljárás részletes leírását kínálja, illetve a végrehajtásához szükséges valamennyi eszközt forgalmazza. Az expressziós termékek funkcionális karakterizálásnak vethetők alá, és felhasználhatók a találmány szerinti szkrínelési eljárásokban.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti DNS-szekvenciák expresszáltatására többsejtű organizmusból származó sejteket alkalmazunk. Ez a kódolt proteinek esetlegesen szükséges (N- és/vagy O-kötésű) glikozilációjának háttérével szemben megy végbe. A magasabb rendű eukarióta sejtek – a prokariótákkal ellentétben – képesek a glikoziláció megfelelő módon történő végrehajtására. Gazdasejtként elvileg bármely magasabb rendű eukarióta sejtenyészet alkalmazható, melyek közül különösen előnyösen az emlősökből (például, majmokból, patkányokból, hörcsögökből vagy emberekből) származó sejtek. Szakember számára számos elfogadott sejtvonal ismeretes, melyek példáuliként a következők említhetők: 293T [embrionális vesesejtvonal; Graham és mtsai.: *J. Gen. Virol.* 36, 59 (1997)]; BHK (újszülött hörcsög vesesejtek); CHO [hörcsög petefészeksejtek; Urlaub és Chasin: *P.N.A.S. (USA)* 77, 4216 (1980)]; HeLa (humán méhnyakkarcinoma-sejtek); valamint egyéb sejtvonalak, különösen a laboratóriumi felhasználásra létrehozott vonalak, mint például, a CHO-, HeLa-, HEK293-, Sf9- vagy COS-sejtek. A találmány céljaira különösen előnyösek a humán sejtek, közelebbről, az immunrendszer sejtjei, illetve a felnőtt őssejtek, például, a vérképzési rendszer őssejtjei (csontvelőből származó őssejtek). A találmány szerinti DNS-szekvenciákkal vagy expressziós vektorokkal végzett (elsősorban *ex vivo*) transzformációt követően a találmány szerinti transzformált humán sejtek (közelebbről, egy páciens autológ sejtjei) különösen előnyösen alkalmazhatók, például, génterápiás hatóanyagokként (azaz a sejtek eltávolítása után, alkalmas esetben, *ex vivo* szaporítás, transzformáció, szelektálás, végül visszaültetés).

A találmány értelmében – funkcionális karakterizálás, illetve találmány szerinti szkrínelési eljárásokban történő alkalmazás céljára – különösen előnyös a találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek rovarsejtekben történő heterológ termeltetése. Mivel rovarsejtekben

az endogén G-proteinek koncentrációja viszonylag alacsony (ami azt jelenti, hogy, például, a Gi-proteinek western-blot analízissel nem detektálhatók), és mivel a rovarsejtek normális esetben nem expresszálják a vizsgálandó receptort, az ilyen sejtek különösen alkalmasak a találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorok szignáltranszdukciós reakcióútjainak in vivo rekonstruálására. Ilyen esetben a az ee3-családba tartozó receptorokat különféle rovarsejtvonalakban (pl., Sf9, Sf21, Tn368, Tn High Five vagy MB) baculovírus expressziós rendszer alkalmazásával expresszáltatjuk. Erre a célra - például, „BaculoGold” reagenskészlet (Pharmingen) alkalmazásával - rekombináns baculovírusokat állítunk elő, és azokat a fentebb említett rovarsejtvonalak megfertőzésére alkalmazzuk. A receptorok G-proteinekhez történő kapcsolódásának tanulmányozása céljából együttes fertőzési kísérleteket végezhetünk, melyek során a sejteket a receptort expresszáló vírussal és a három G-protein-alegységet expresszáló vírusokkal fertőzzük, és megfelelő tesztek (például, cAMP-teszteket) végzünk. Ezen a módon megállapítható a különböző G-protein-alegységek receptoraktivitásra gyakorolt hatása. A receptorokat membránjukon expresszáló rovarsejtek hasonlóan alkalmazhatók a szkrínelési eljárásokban. A rovarsejtek fermentorokban vagy rázólabdikokban nagy mennyiségben szaporíthatók, így megfelelő kiindulási anyagot szolgáltatnak a szkrínelési eljárásokban, illetve a receptorok tisztítási eljárásaiban alkalmazható rekombináns sejtek vagy sejtmembránanyag előállításához.

Egy gazdasejt és az ahhoz alkalmas, találmány szerinti expressziós vektor, például, plazmid, vírus vagy fág (pl., RNS-polimeráz/promóter rendszert és/vagy egyéb előnyös szabályozószekvenciákat tartalmazó plazmid, l-fág, mu vagy egyéb temperált fág vagy traszpozon) kombinálásával olyan, találmány szerinti gazdasejt hozható létre, amely expressziós rendszerként funkcionál. A találmány szerinti gazdasejteken alapuló, találmány szerinti expressziós rendszerek előnyös példái az emlőseredetű sejtek (pl., CHO-sejtek) és az olyan vektorok, mint a pcDNA3neo-vektor kombinációja, illetve, a HEK293-sejtek és a CMV-vektor kombinációja.

A találmány egy további szempontjának megfelelően, feltárjuk a találmány szerinti DNS-szekvenciák géntermékeit. Ahogy a találmány leírásában használjuk, a „géntermék” kifejezés egyaránt vonatkozik az elsődleges transzkriptumokra, azaz RNS-ekre (előnyösen mRNS-ekre), illetve a proteinekre és/vagy polipeptidekre (különösen azok tisztított alakjaira). Ezek a proteinek apoptózis vagy nekrotikus, illetve gyulladásos szignálokat vagy sejtszaporodással vagy sejtplaszticitással összefüggő szignálokat szabályoznak vagy szállítanak. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyösek a tisztított géntermékek, amennyiben e szekvencia funkcionális szempontból homológ vagy funkciógátló (nem funkcionális) alléljét,

fragmensét, analógiát vagy származékát tartalmazza, vagy jellemzően ilyen aminosav-szekvenciából áll. A találmány értelmében a funkcionális homológot úgy definiáljuk, mint a 13-16. és/vagy 19. ábrákon bemutatott – 5., 6., 7/a (illetve 7/b és 7/c), 8. és 11. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó - protein kulcsfontosságú funkcionális tulajdonságainak legalább egyikét megtartó homológ protein. A találmány szerinti, funkcionálisan homológ proteinek a találmány szerinti proteinek biológiailag funkcionális szakaszaival (például, protein-kölcsönhatási doménjeivel) legalább 60 %-ban, előnyösen legalább 80 %-ban azonos szekvenciákat tartalmaznak. A találmány értelmében idetartoznak a 3., 5., 8. illetve X-kromoszómán elhelyezkedő homológ szekvenciák (ld. a 6. példát), valamint azok változatai.

A származékok közé tartoznak azok az aminosav-szekvenciák is, amelyek oldalláncukban vannak módosítva (például, egy antitest, enzim vagy receptor találmány szerinti aminosav-szekvenciához történő konjugálásával). Ezenfelül, a származékok a találmány szerinti oligo- vagy polipeptid oldalláncához vagy N- vagy C-terminális végén elhelyezkedő szabad hidroxil- vagy aminocsoportjához kapcsolva cukorgyököt (N- vagy O-glikozidos kötésen keresztül) vagy zsírsavgyököt (pl. mirisztinsavat), egy vagy több foszfátcsoportot és/vagy egyéb módosításokat tartalmazhatnak. Ezen túlmenően, a „származék” kifejezés jelentése kiterjed a fúziós proteinekre is, amelyekben egy találmány szerinti aminosav-szekvencia valamely oligo- vagy polipeptidhez van kapcsolva.

A találmány leírásában az „analóg” kifejezésen olyan aminosav-szekvenciákat értünk, amelyek legalább egy aminosav tekintetében (deléció vagy szubsztitúció eredményeként) eltérnek a natív szekvenciától. A találmány szerinti megoldás szempontjából azok a konzervatív szubsztitúciók előnyösek, amelyek megőrzik a szubsztituált aminosavak (poláros aminosav, hosszú alifás lánc, rövid alifás lánc, negatív vagy pozitív töltésű aminosav, aromás csoportot tartalmazó aminosav) fizikai-kémiai tulajdonságait (méret, bázicitás, hidrofóbitás, stb.). Az ilyen szubsztitúciók eredményeként biológiailag működőképes, részlegesen működőképes vagy biológiailag nem működőképes szekvenciák jöhetnek létre. Például, az arginin lizinnel, a valin izoleucinnal, az aszparaginsav glutaminsavval helyettesíthető. Mindazonáltal, lehetőség van aminosavak addíciójára vagy deléciójára is. Az így létrehozott, módosított proteinek legalább 60 %-ban, előnyösen, legalább 70 %-ban, különösen előnyösen, legalább 90 %-ban azonosak a natív ee3-proteinekkel (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciákat tartalmazó proteinekkel). A szekvenciák százalékos azonosossága az Altschul és mtsai. [J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)] által leírt algoritmussal határozható meg. Az izolált protein és funkcionális változatai, előnyösen, emlősök (például, ember,

Rattus norvegicus vagy *Mus musculus*) agyából izolálhatók. A funkcionális változatok közé tartoznak az egyéb emlősfajokból származó homológok is.

A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyösek azok az analógok, amelyek a natív szekvenciában megjelenő másodlagos szerkezetüket is megtartják. A találmány értelmében lehetőség van arra is, hogy a natív szekvenciába – a konzervatív szubsztitúciók mellett – kevésbé konzervatív aminosav-módosításokat is beiktassunk. Az ilyen módosítások eredményeként létrejövő változatok megtartják biológiai funkciójukat, közelebbről, apoptózis vagy nekrotikus szignált, illetve gyulladásos szignálokat vagy sejtszaporodással, sejtplaszticitással vagy sejtnövekedéssel összefüggő szignálokat átalakító képességüket. A szubsztitúciók vagy deléciók hatása megfelelő vizsgálati eljárások (például, kötési tesztek vagy citotoxicitási tesztek) alkalmazásával egyszerűen meghatározható.

A találmány tárgyához tartoznak a „domináns negatív” hatás kifejtésére képes szekvenciák is, amelyek – módosított elsődleges szekvenciájuknak köszönhetően – továbbra is képesek megkötni egy extracelluláris ligandumot, de nem képesek a jel továbbadására (intracellulárisan). Ilyen példaként említhetők az olyan változatok, amelyek egy ee3_1-szekvencia C-terminálison lerövidített változatai, ideértve például, a 11/B és 11/C ábrán (illetve a 15/B és 15/C ábrán) bemutatott két „splice”-változatot. Ennek megfelelően, az ilyen analógok a biológiai funkció inhibitoraiként (közelebbről, az apoptózis inhibitoraiként) működnek. Ezek az analógok egy találmány szerinti proteint (jellemzően az 5., 6., 7(b,c), 8. vagy 11. Azonosítószámú aminosav-szekvenciát) kódoló DNS-szekvencia genetikai módosításával, rendszerint „helyspecifikus” mutagenézisével hozhatók létre. A genetikai manipuláció eredményeként az analóg alapjául szolgáló DNS-szekvenciához jutunk, amelyből a protein rekombináns sejtenyészetben expresszáltatható [Sambrook és mtsai. (1989), ld. fentebb]. A fenti analógok származékai, illetve az ilyen aminosav-szekvenciákat kódoló DNS-szekvenciák szintén a találmány tárgyához tartoznak.

A találmány értelmében feltárjuk a találmány szerinti natív aminosav-szekvencia fragmenseit is. A fragmenseket deléciók (N- vagy C-terminális vagy szekvencián belüli deléciók) különböztetik meg egymástól. Az ilyen fragmensek domináns negatív vagy domináns pozitív hatásúak lehetnek.

Mindazonáltal, a találmány szerinti géntermékek (proteinek) közé tartoznak az ábrákon bemutatott DNS-szekvenciák származékaiból, fragmenseiből vagy alléljeiből transzkripció és transzláció útján származó géntermékek (proteinek) is.

A találmány szerinti proteinek kémiai módosításoknak is alávetethetők. Például, a pro-

tein N-terminális végén védőcsoport helyezhető el; a hidroxil- vagy aminocsoportokhoz glikozilcsoportok kapcsolhatók. A találmány szerinti proteinhez kovalens kötással lipidek, illetve foszfátcsoportok vagy acetilcsoportok, továbbá, tetszőleges szintézises módszerrel bármely kémiai anyag, vegyület vagy csoport kapcsolható. Ezen túlmenően, a találmány szerinti protein N- és/vagy C-terminális végéhez aminosavak (önmagukban vagy peptidek, proteindomének vagy hasonló alakjában) is kapcsolhatók.

A találmány szempontjából különösen előnyösek a találmány szerinti proteinek aminosav-szekvenciájának N-terminálisán elhelyezkedő „szignál-” vagy „vezetőszekvenciák”, amelyek a peptidet – a transzlációval egyidejűleg vagy transzlációt követően – adott sejtstruktúrába vagy extracelluláris térbe (vagy a tenyésztő tápközegbe) irányítják. A protein N- vagy C-terminálisán olyan aminosav-szekvenciák is elhelyezkedhetnek, amelyek – antigénként funkcionálva – lehetővé teszik a találmány szerinti aminosav-szekvencia antitestekhez történő kötődését. Konkrét példaként említjük az ún. „Flag”-peptidet (aminosav-szekvenciája, egybetűs kóddal: DYKDDDDK) vagy a His-jelölőt, amely legalább három, előnyösen hat hisztidinből áll. Ezek a szekvenciák erősen antigén tulajdonságúak, így a rekombináns protein gyors kimutatását és egyszerű tisztítását teszik lehetővé. A „Flag”-peptidhez kötődő monoklonális antitestek kereskedelmi forgalomban beszerezhetők az Eastman Kodak Co.-tól (Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut).

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, natív ee3-szekvenciák (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott szekvenciák) részleteit tárjuk fel, amelyek legalább 20 aminosavat, előnyösebben, legalább 30 aminosavat, még előnyösebben, legalább 50 aminosavat tartalmaznak. Az ilyen szekvencia-részletek szakember számára jól ismert kémiai módszerekkel szintetizálhatók, és antitestek előállítására alkalmas antigénként alkalmazhatók. Ezek a szekvencia-részletek és/vagy származékaik, alléljaik vagy fragmenseik – a proteinek háromdimenziós modelljében – azon régiókba tartoznak, amelyek (legalább részben) a találmány szerinti natív ee3-szekvenciákat (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C és 16. ábrán bemutatott szekvenciákat) tartalmazó proteinek felületét alkotják. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös, legalább 20 aminosavas szekvencia-részletek, legalább részben, a találmány szerinti proteinek citoplazmikus szakaszát alkotják, és, különösen előnyösen, egy találmány szerinti szekvencia-részlet a 8. ábrán bemutatott szekvenciák bármelyikének legalább 20 aminosavas peptidjét tartalmazza (a 8. ábrán alkalmazott számozás szerint a 600. és 752. pozíció között), például, a 21 aminosav WWFGIRKDFCQFLLEIFPFLRE peptidet (609-630. pozíciók).

A találmány szerinti aminosav-szekvenciák (mint például, a humán ee3_1- vagy ee3_2-protein szekvenciái) tartalmaznak specifikus szekvencia-motívumokat is, amelyek hasonló formában megtalálhatók a GPCR-osztály egyéb tagjaiban is. Például, a GPCR-osztályba tartozó proteinek harmadik transzmembrán doménjétől C-terminális irányban egy sajátos, ún. „signature” triplet-szekvencia található (egybetűs kóddal: DRY).

A találmány szerinti ee3_1-proteinben a 3. transzmembrán doméntől (TM3; 83-102. aminosavak) C-terminális irányban DRI szekvencia helyezkedik el (a 15/A ábra számozása szerint a 103-105. pozíciókban). A GPCR-osztály eddig ismert tagjaiban [galanin-2-receptor, C5a-receptor (patkány), BK-2 (humán) vagy CXCR-5 (humán)], a megfelelő pozíciókban, DRY vagy DRF szekvencia található.

A fentieknek megfelelően, a találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyösek a fentebb leírt, legalább 20 aminosavas peptidek, amelyek DRI szekvenciát tartalmaznak. Az ilyen, találmány szerinti peptidek egyik példajaként említhető a VLVCDRIERGSHFWLLVFMP szekvenciájú peptid. Az ilyen peptidek a receptorok fiziológiai funkciójának módosításával összefüggésben alkalmazhatók. Ha az ilyen peptidszekvenciákat beépítjük egy sejtbe (vagy a sejtben általánosan hozzáférhetők), befolyásolható az intracelluláris szignáltranszdukciós folyamatok agonista-dependens aktiválása, a találmány szerinti receptorok G-proteinekkel bekövetkező kölcsönhatásának aktiválása, és, alkalmas esetben, a receptorok internalizációja. Ezenfelül, bizonyos találmány szerinti oligo- vagy polipeptidek hozzájárulhatnak a szignáltranszdukciós reakcióút későbbi folyamatainak konstitutív aktiválásához is. Ilyenformán, a találmány szerinti oligo- vagy polipeptidek különösen előnyösen alkalmazhatók hatóanyagként, illetve hatóanyag előállítására.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti (például, ee3_1-proteinből származó; ld. 8. ábra), legalább 20 aminosavas oligo- vagy polipeptidek első két extracelluláris hurka két konzervált ciszteint is tartalmazhat (az ee3_1-szekvencia 78. és 145. pozíciójában; ld. 15/A ábra), ami a GPCR-osztályba tartozó proteinek tipikus jellemzője (az első extracelluláris hurok végén GETCV szekvencia, míg a második extracelluláris hurok közepén ELEILCSVNIL szekvencia található). Ilyenformán, a találmány szerinti oligopeptidek szekvenciái magukban foglalhatják, például, a fenti két szekvenciát.

Végül, a találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyösek azok az – ee3-családba tartozó protein aminosav-szekvenciájából származó – legalább 20 aminosavas peptidek, amelyek a transzmembrán (TM)-régiókból származnak, mint például, az LDGHNAFSCIPIFVPLWLSLIT peptid (amely részben tartalmazza a C-terminális TM-

domént). Az ilyen, találmány szerinti peptidek az ee3-proteinek receptorműködésének módosítására (közelebbről, gátlására) alkalmazhatók előnyösen, az ilyen peptidek terápiás profilja a későbbiekben tárgyalt, találmány szerinti indikációkra alkalmazva. A TM-struktúrákat gátló peptidek a receptorokban – a normális kötődés megszüntetése révén - funkcionális változást, elsősorban funkcionális veszteséget eredményez. Ebben az összefüggésben, hivatkozunk, például, a béta-2-adrenerg receptor hatodik transzmembrán-doménje esetében alkalmazott hasonló megközelítési módokra [Herbert és mtsai.: J. Biol. Chem. 271, 16384 (1996)]. Ezen túlmenően, ee3-családba tartozó protein aminosav-szekvenciájából származó, legalább 20 aminosav hosszúságú ligandumkötő peptidfragmenseket tárunk fel hatóanyagként vagy hatóanyag előállítására történő alkalmazásra, mely fragmensek a natív (extra- vagy intracelluláris) ligandumokkal kompetícióba képesek lépni a kötőhelyekért, ezáltal képesek blokkolni a natív ee3-ligandumok kötődését. Az ilyen típusú, találmány szerinti peptidek később ún. csali („decoy”)-receptorként jelennek meg, ami a leírásban említett valamennyi indikáció esetén terápiás profilt eredményez.

A találmány további szempontjának megfelelően, eljárásokat tárunk fel a találmány szerinti gátló hatású peptidek azonosítására. A találmány értelmében erre a célra előnyösen alkalmazható – bár más összefüggésben - a Tarasova és mtsai. által leírt eljárás [Tarasova és mtsai.: J. Biol. Chem. 274, 34911 (1999), melyet - metodikai vonatkozásában - teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni]. A találmány szerinti gátló hatású peptidek, például, különböző transzmembrán-domének intramolekuláris kölcsönhatását képesek módosítani (például, gátolni), ami fontos előfeltétele egy ee3-családba tartozó találmány szerinti protein működésének. Az ilyen típusú, találmány szerinti peptidek hatóanyagként vagy hatóanyag előállítására szintén alkalmazhatók.

A fentiekben leírt, találmány szerinti peptidek peptidanalógok (peptidutánzók) alakjában is létrehozhatók. Az ilyen analógokban a peptidváz amidszerű kötéseit eltérő, de strukturálisan hasonló kötésekkel helyettesítjük, melyeket a természetes humán enzimek nem képesek hasítani. Példaként említhetők az oligokarbamátok. Monomer, N-védett amino-alkil-karboxilátokat egyszerűen előállíthatunk (például, megfelelő aminoalkoholokból), majd ezeket aktivált észterekké átalakítva, bázissal hasítható Fmoc-csoport alkalmazásával, szilárd fázisú szintézisben alkalmazhatjuk. Mivel az ilyen analógok hidrofóbitása nagyobb, mint a megfelelő peptideké, különösen alkalmasak a vér-agy gáton történő átjutásra, közelebbről, neurológiai alkalmazásokra.

A találmány további szempontjának megfelelően, transzgenikus állatokat tárunk fel. A

találmány szerinti transzgenikus állatok genetikailag módosított állatok, amelyek genetikai módosítása azt eredményezi, hogy legalább egy szövetükben egy találmány szerinti génterméket – normális állat szövetével összehasonlítva - módosított mennyiségben expresszálnak vagy tartalmazznak (például, egy találmány szerinti gén promóterrégiójának módosítása eredményeként), vagy amelyek módosított génterméket (például, ee3-családba tartozó protein találmány szerinti származékát, ideértve annak fragmensét is) tartalmazznak vagy expresszálnak. A találmány értelmében transzgenikus állatok közé tartoznak azok az állatok is, amelyekben (a) genetikai szinten nincs jelen a természetes állapotban megtalálható, találmány szerinti DNS-szekvencia (sem részben, sem egészben); vagy amelyek (b) genetikai szinten hordozzák a találmány szerinti szekvenciákat, de nem képesek annak transzkripciójára és/vagy translációjára, s ennek eredményeként nem tartalmazzák a génterméket. Ezen túlmenően, transzgenikus állatokban a találmány szerinti natív szekvenciák, azaz az ee3-családba tartozó, találmány szerinti proteinek aminosav-szekvenciái (például, az 5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8. és 11. azonosítószámú szekvencia), függetlenül attól, hogy jelen vannak vagy sem, legalább egy találmány szerinti DNS-szekvenciával kiegészíthetők és/vagy legalább egy találmány szerinti DNS-szekvenciával helyettesíthetők. Közelebbről, a helyettesített és/vagy inszertált szekvencia (szekvenciák) a találmány szerinti, nem natív szekvencia (szekvenciák) lehet(nek).

A találmány szerinti szekvenciák vonatkozásában transzgenikus állatok és/vagy az ún. „knockout” állatok - közelebbről, egerek, patkányok, sertések, szarvasmarhák, juhok, muslicák (*Drosophila*), *C. elegans* vagy zebradániók - szakember számára jól ismert módon hozhatók létre. Ennek érdekében, például, egy találmány szerinti cDNS-szekvenciát (vagy annak natív vagy nem natív változatát) transzgenikus egerekben – például, neuronokban NSE-promóter, oligodendrocitákban MBP-promóter, stb. szabályozása alatt – expresszáltatjuk. A genetikailag módosított állatok különféle betegség-modellekben (például, kísérletileg kiváltott stroke; MCAO) tanulmányozhatók. A „knockout” állatok létrehozása információkat nyújthat az inhibitorok teljes organizmusra gyakorolt hatásáról, mivel e tekintetben a „knockout”-modell a találmány szerinti natív szekvenciák gátlásának felel meg. E vonatkozásban egy ilyen eljárás a találmány szerinti, gátló hatású anyagok (például, peptidanalógok vagy egyéb, kisméretű szerves vegyületek) pre-klinikai tesztelésére alkalmazható.

A találmány értelmében valamennyi soksejtes organizmus létrehozható transzgenikusan; ezek közelebbi példái az emlősök, pl., egerek, patkányok, juhok, szarvasmarhák vagy sertések. Elvileg transzgenikus növények is létrehozhatók. A transzgenikus organizmusok „knockout” állatok is lehetnek. Ebben az összefüggésben, a transzgenikus állatok találmány

szerinti, funkcionális vagy nem funkcionális nukleinsav-szekvenciát vagy funkcionális vagy nem funkcionális nukleinsav-konstrukciót tartalmazhatnak (önmagában vagy találmány szerinti proteinek kódoló, funkcionális vagy nem funkcionális szekvenciával kombinálva).

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében olyan transzgenikus állatokat
5 tárunk fel, amelyek ivarsejtjeiben - vagy szomatikus sejtjeik mindegyikében vagy némelyikében – az ee3-családba tartozó, találmány szerinti nukleotidszekvencia (-szekvenciák), közelebbről, az 1-4. azonosítószámú szekvenciák, genetikai módszerekkel módosítva lettek vagy DNS-elemek inszertálásával meg lettek szakítva. A találmány szerinti nukleotidszekvencia vagy részletei további lehetséges alkalmazási területe a transzgenikus vagy „knockout” állatok
10 (illetve a kondicionális vagy régió-specifikus „knockout” állatok) létrehozása, valamint a genetikailag módosított állatokban specifikus mutációk kialakítása [„Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., John Wiley & Sons, New York (1998); „Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting”, szerk.: Torres és mtsai., Oxford University Press, Oxford (1997)]. Ezen túlmenően, transzgenikus állatokban a konstitutívan aktív ee3-proteinek
15 létrehozása céljából (ún. „knock-in” állatok) megfelelő mutációk iktathatók be (például, promóterek módosítása vagy erősítőszekvenciák inszertálása). A találmány értelmében az ilyen állatok, például, az ee3-proteinfunkció potenciális agonistáinak pre-klinikai vizsgálatokban alkalmazható analóg modelljeinek létrehozására alkalmazhatók.

Transzgének túlzott mértékű expresszáltatásával vagy genetikai mutagenézisével (null-
20 mutációk, specifikus deléciók, inszerciók vagy egyéb módosítások beiktatásával) olyan állatmodelleket hozhatunk létre, amelyek további értékes információkat nyújthatnak a találmány szerinti szekvenciák (pato)fiziológiájáról. Az így létrehozott állatmodellek alapvető tesztelőrendszerekként alkalmazhatók, amelyek a találmány szerinti proteinek (közelebbről, az 5-8. azonosítószámú szekvenciák bármelyikét tartalmazó proteinek) neuronális, immunológiai,
25 proliferatív vagy egyéb folyamatokban betöltött biológiai funkcióját befolyásoló új gyógyszerek értékelésére alkalmasak.

A találmány további szempontjának megfelelően, feltárunk egy antitestet, amely találmány szerinti ee3-génterméken (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott, találmány szerinti proteinen, annak származékán, fragmensén, izoalakján vagy al-
30 léljén) jelen lévő epitóp felismerésére képes, ugyanakkor, például, találmány szerinti mRNS ellen is irányulhat. A találmány értelmében az „antitest” kifejezés poliklonális és monoklonális antitestekre, kiméra antitestekre, anti-idiotípusos antitestekre (amelyek találmány szerinti antitestek ellen irányulnak) egyaránt vonatkozik, mely antitestek bármelyike lehet kötött vagy

oldott állapotú, és, alkalmas módon, jelölőanyaggal lehetnek jelölve. Szintén az antitestek közé tartoznak a fentiek fragmensei. A találmány szerinti antitest-fragmensek nemcsak izolált állapotban, hanem rekombináns alakban, más (protein)komponensekkel alkotott fúziós proteinek formájában is előfordulhatnak. A találmány szerinti antitestek fragmensei önmagukban (illetve fúziós proteinek részeként) enzimatis emésztéssel, proteinszintézissel vagy rekombináns módszerekkel állíthatók elő, mely eljárások szakember számára jól ismertek. A fentieknek megfelelően, találmány leírásában az „antitest” kifejezésen poliklonális, monoklonális, humán, humanizált vagy rekombináns antitesteket vagy azok fragmenseit, egyláncú antitesteket, illetve egyéb, szintetikus antitesteket értünk.

A poliklonális antitestek antitest-molekulák heterogén elegyei, amelyek antigénnel immunizált állatok szérumból állíthatók elő. Mindazonáltal, a találmány szerinti antitestek közé tartoznak a poliklonális, monospecifikus antitestek is, amelyek az antitestek (például, specifikus epitópot tartalmazó peptidekkel töltött oszlopon végzett) tisztításával nyerhetők. A monoklonális antitestek antigénekre specifikus (és lényegében azonos epitópkötő helyeket tartalmazó) antitestek lényegében homológ populációját alkotják. A monoklonális antitestek jól ismert eljárások alkalmazásával állíthatók elő [ld. pl., Köhler és Milstein: Nature 256, 495 (1975); 4 376 110 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Harlow és Lane: „Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., John Wiley & Sons, New York (1998); mely forrásokban leírtakat teljes terjedelmükben a kitanítás részének kell tekinteni].

Az említett forrásokban leírt eljárásokkal genetikailag módosított antitestek is előállíthatók. Az ilyen antitestek előállítása során antitest-termelő sejteket tenyésztünk, majd – a tenyészet megfelelő optikai denzitásának elérése után – a sejtekből (ismert módon, guanidinium-tiocianáttal végzett sejtlízissel, nátrium-acetáttal végzett savanyítással, fenol, kloroform/izoamilalkohol eleggyel végzett extrakcióval, izopropanollal végzett precipitációval és etanolos mosással) mRNS-t izolálunk. Ezt követően az izolált mRNS-ből, reverz transzkriptáz segítségével, cDNS-t szintetizálunk, majd a cDNS-t - közvetlenül vagy genetikai beavatkozás (például, helyspecifikus mutagenézissel, inszerciók, inverziók, deléciók vagy szubsztitúciók beiktatását) követően - megfelelő állati, gomba-, bakteriális vagy vírusvektorba inszertáljuk és megfelelő gazdaszervezetekben expresszáltatjuk. A gének klónozására és baktériumokban (például, E. coli-ban) vagy élesztőkben (pl., Saccharomyces cerevisiae-ben) történő expresszáltatására előnyösen olyan bakteriális, illetve élesztő vektorok alkalmazhatók, mint a pBR322, pUC18/19, pACYC184, lambda vagy élesztő mu-vektor. A találmány szerinti pro-

teinek elleni specifikus antitestek diagnosztikai reagensekként, illetve gyógyszerekként hasznosak olyan rendellenességek esetében, amelyekben az ee3-családba tartozó proteinek patofiziológiai szempontból fontosak.

A találmány szerinti antitestek a következő immunglobulin-osztályok bármelyikébe tartozhatnak: IgG, IgD, IgM, IgE, IgA, GILD, illetve, alkalmas módon, ezek alosztályai (például, az IgG alosztályai és elegyei). A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös az IgG, illetve alosztályai (IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 vagy IgGM), melyek közül különösen előnyös altípusok az IgG1/k és IgG2b/k. A találmány szerinti monoklonális antitesteket termelő hibridómasejt-klónok tenyésztését in vitro, in situ vagy in vivo végezhetjük. A monoklonális antitestek nagy titerei előnyösen in vivo vagy in situ termeltethetők.

A találmány szerinti kiméra antitestek olyan molekulák, amelyek különböző állatfajokból származó különféle antitestrészeket tartalmaznak (például, egéreredetű monoklonális antitestből származó variábilis régiót és humán immunglobulinból származó konstans régiót tartalmazó antitest). A kiméra antitesteket egyrészt az antitestek alkalmazása során megfigyelhető immunogenitás csökkentése, másrészt az antitest-termelés hozamának javítására alkalmazhatók. Például, az egéreredetű monoklonális antitestek hibridóma-sejtvonalakban nagyobb hozammal termeltethetők, ugyanakkor, emberekben nagyobb immunogenitásúak, így a humán/egéreredetű kiméra antitestek alkalmazása előnyös. A kiméra antitestek és előállítási eljárásaik szakember számára jól ismertek [ld. Cabilly és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3273 (1984); Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984); Boulianne és mtsai.: Nature 312, 643 (1984); EP-A-125023 (Cabilly és mtsai.); Neuberger és mtsai.: Nature 314, 268 (1985); EP-A-171496 (Taniguchi és mtsai.); EP-A-173494 (Morrison és mtsai.); WO 86/01533 számú nemzetközi közzétételi irat (Neuberger és mtsai.); EP-A-184187 (Kudo és mtsai.); Sahagan és mtsai.: J. Immunol. 137, 1066 (1986); WO 87/02671 számú nemzetközi közzétételi irat (Robinson és mtsai.); Liu és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3439 (1987); Sun és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 214 (1987); Better és mtsai.: Science 240, 1041 (1988); Harlow és Lane: „Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); mely forrásokat teljes terjedelmükben a kitanítás részének kell tekinteni].

A találmány szerinti kiméra antitestek előnyösen olyan epitóp ellen irányulnak, amely egy találmány szerinti ee3-protein (közelebből, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott protein) extracelluláris részletét reprezentálják. Valamennyi találmány szerinti antitest felhasználható az ee3-családba tartozó proteinek gátlására, például, in vitro kísérletekben, in situ, például, jelölőként, valamint in vivo terápiás célokra, például, intravénás,

szubkután, intraartériás vagy intramuszkuláris injektálásra.

A találmány szerinti anti-idiotípusos antitestek olyan antitestek, amelyek olyan determinánst ismernek fel, amely rendszerint egy találmány szerinti antitest antigénkötő helyével áll kapcsolatban. Anti-idiotípusos antitestet olyan állat immunizálásával állíthatunk elő, amely azonos fajba és azonos genetikai típusba tartozik (például, egy egértörzs), mint a monoklonális antitest termeltetésére alkalmazott állat (mely monoklonális antitest ellen a találmány szerinti anti-idiotípusos antitest irányul). Az immunizált állat felismeri az immunizáló antitest idiotípusos determinánsait, ami oly módon nyilvánul meg, hogy ezen idiotípusos determinánsok ellen antitestet termel (nevezetesen a találmány szerinti anti-idiotípusos antitesteket; ld. a 4 699 880 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). A találmány szerinti anti-idiotípusos antitestek immunogénként alkalmazhatók egy másik állatban immunreakció indukálására, illetve „anti-anti-idiotípusos” antitest termelődésének kiváltására. Az ilyen anti-anti-idiotípusos antitestek epitóp-szerkezetük vonatkozásában – bár nem szükségszerűen – azonosak lehetnek az eredeti monoklonális antitesttel (amely az anti-idiotípusos reakciót kiváltotta). Ilyenformán, egy monoklonális antitest idiotípusos determinánsai elleni antitestek alkalmazásával lehetőség van azonos specifitású antitesteket expresszáló egyéb klónok azonosítására.

A találmány szerinti proteinek, illetve azok analógjai, fragmensei vagy származékai ellen irányuló monoklonális antitestek felhasználhatók az anti-idiotípusos antitestek kötődésének megfelelő állatokban (például, BALB/c-egerekben) történő indukálására. Egy ily módon immunizált egér lépjéből származó sejtek, például, anti-idiotípusos antitesteket szekretáló anti-idiotípusos hibridómasejt-vonalak létrehozására alkalmazható. Ezen túlmenően, az anti-idiotípusos antitestek hordozóhoz (például, „keyhole limpet” hemocianinhoz; KLH) kapcsolhatók, majd további BALB/c-egerek immunizálására alkalmazhatók. Az így immunizált egerek széruma anti-anti-idiotípusos antitesteket tartalmaz, amelyek kötési tulajdonságai meg-egyeznek az eredeti monoklonális antitestekével, és amelyek a találmány szerinti protein, annak fragmense vagy származéka egy epitópjára specifikusak. Ilyenformán, az anti-idiotípusos monoklonális antitesteknek megvannak a saját idiotípusos epitópjai vagy „idiotópjai”, amelyek strukturálisan hasonlóak a vizsgálandó epitóphoz.

Az „antitest” kifejezés teljes antitest-molekulákra, illetve azok fragmenseire egyaránt vonatkozik. Az antitest-fragmensek közé tartoznak a lerövidített vagy módosított antitest-fragmensek, amelyek egy vagy két antigénnel komplementer kötőhelyet tartalmaznak (például, az említett antitesteknek megfelelő kötőhelyet tartalmazó antitest-részletek, amelyek könnyű és nehéz láncokból állnak, mint pl., az Fv-, Fab- vagy F(ab')₂-fragmensek vagy az egyszeres

szálú fragmensek. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyösek a kettős szá-
 5 titest-fragmensek, mint pl. az Fv-, Fab- vagy F(ab')₂-fragmensek, mely utóbbi két antitest-
 fragmensből hiányzik egy Fc-fragmens (amely, például, egy teljes antitestben jelen van), ezál-
 tal ezek a fragmensek a véráramban gyorsabban szállítódnak, és kimutathatóan kisebb nem-
 10 specifikus szöveti kötődést mutatnak, mint az intakt antitestek. A találmány szerinti megoldás
 értelmében a találmány szerinti antitestek Fab- és F(ab')₂-fragmensei, valamint maguk az
 antitestek felhasználhatók a találmány szerinti proteinek (kvalitatív) detektálására, illetve
 mennyiségi (kvantitatív) meghatározására, továbbá, alkalmas esetben, a találmány szerinti
 proteinek aktivitásának (pl., specifikus foszforiláció) kimutatására, miáltal a találmány szerinti
 15 proteinek kvalitatív és kvantitatív kimutatási eljárásai, illetve a találmány szerinti proteinek
 aktivitásának kimutatási eljárásai szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

A szóban forgó antitest-fragmensek jellemzően enzimek alkalmazásával állíthatók elő.
 Például, papain alkalmazásával Fab-fragmensek, pepszin alkalmazásával F(ab')₂-fragmensek
 állíthatók elő. Más módon, ezek az antitest-fragmensek kémiai oxidációval vagy az antisteste-
 20 ket kódoló gének genetikai módosításával hozhatók létre.

A találmány további szempontjának megfelelően, a találmány szerinti antitestek ele-
 gyeinek találmány céljaira történő alkalmazását tárjuk fel. A monoklonális antitestek, poliklo-
 nális antitestek vagy a monoklonális antitestek elegyeinek tisztított frakciói hatóanyagként al-
 25 kalmazhatók, továbbá agyi ischaemiák (pl., stroke), degeneratív rendellenességek (közelebb-
 ről, neurodegeneratív rendellenességek) és neurológiai rendellenességek (pl., epilepszia) keze-
 lésére alkalmas hatóanyagok előállítására alkalmazhatók.

A találmány szerinti antitestek – ideértve azok fragmenseit és/vagy elegyeit is – fel-
 használhatók a találmány szerinti ee3-géntermékek (közelebből, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C,
 16., illetve 18. ábrán bemutatott proteinek vagy fragmenseik vagy származékaik) kvantitatív
 25 és kvalitatív kimutatására egy mintában, illetve a találmány szerinti proteineket termelő – és,
 alkalmas esetben, szekretáló – sejtek detektálására. A találmány e megvalósítási módja szerint
 a találmány szerinti antitesteket diagnosztikai célra alkalmazzuk. Ilyenformán, például, a talál-
 mány szerinti antitestek alkalmazásával meghatározható egy találmány szerinti géntermék
 (például, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott proteinek) mennyisége,
 30 illetve, alkalmas esetben, aktivitása (pl., specifikus foszforiláció). A detektálás immunfluo-
 reszcens eljárások alkalmazásával hajtható végre, melyek a fluoreszcens jelölőkkel jelölt anti-
 testek fénymikroszkópos vizsgálattal, áramlási citometriával vagy fluorimetriás detektálással
 történő kimutatásán alapulnak.

A találmány szerinti antitestek (ideértve azok fragmenseit, illetve elegyeit) szövettani vizsgálatokra is alkalmazhatók, például – immunelektron-mikroszkópiás immunfluoreszcens vizsgálat során - találmány szerinti protein in situ detektálására. Az in situ detektálás során egy páciensből szövettani mintát veszünk, majd a mintához találmány szerinti jelölt antitesteket adunk. Az antitestet (vagy fragmensét) jelölt alakban adjuk a biológiai mintához. Ezen a módon nemcsak a találmány szerinti protein jelenléte mutatható ki a mintában, hanem a protein vizsgált szövetben megfigyelhető eloszlása is. Biológiai mintaként biológiai folyadékot, szövetkivonatot, összegyűjtött sejteket (például, immunsejteket, szívizomsejteket vagy májsejteket), illetve szövettenyészetben inkubálható sejteket alkalmazhatunk. A jelölt antitest kimutatását szakember számára jól ismert módszerekkel végezzük. A konkrét kimutatási módszert az alkalmazott jelölő típusától függően választjuk ki (például, fluoreszcens vizsgálati módszerek). Ezen túlmenően, a biológiai mintát - a sejtek, sejtalkotók vagy az oldható proteinek immobilizálása céljából - szilárd hordozóra (például, nitrocellulózra vagy más anyagra) vihetjük fel, majd a hordozót egy vagy több alkalommal megfelelő pufferrel leöblítjük, és találmány szerinti, detektálható jelölővel ellátott antitesttel kezeljük. Ezt követően a szilárd hordozót – a nem kötődött antitestek eltávolítása céljából - a pufferrel másodszor is leöblítjük, és a szilárd hordozón megkötött jelölőanyag mennyiségét szokványos eljárással detektáljuk.

A szilárd hordozóként alkalmazható anyagok konkrét példái a következők: üveg, polisztirol, polipropilén, polietilén, dextrán, nylon-amilázok, természetes és módosított cellulózok, poliakrilamidok és magnetit. A hordozó – a kívánt célnak megfelelően – korlátozott mértékben oldható vagy teljesen oldhatatlan lehet. A hordozó tetszőleges fizikai megjelenésű lehet (például, gyöngyök, hengeres vagy gömbölyű formák). A találmány céljaira a polisztirol gyöngyök alkalmazása előnyös.

Az antitestek detektálható jelölését különféle módszerekkel végezhetjük. Például, az antitestet olyan enzimhez kapcsolhatjuk, amelyet immuntesztben (EIA) alkalmazunk, melynek során az enzim reakcióba lép a megfelelő szubsztráttal, miáltal olyan vegyület jön létre, amely szakember számára jól ismert eljárással (például, spektrofotometriás, fluorometriás vagy egyéb optikai módszerrel) detektálható (illetve, alkalmas esetben, mennyiségileg meghatározható). Enzimeként malát dehidrogenáz, Staphylococcus nukleáz, delta-5-szteroid izomeráz, élesztőeredetű alkohol dehidrogenáz, alfa-glicerofoszfát dehidrogenáz, triózfoszfát izomeráz, tormaperoxidáz, alkalikus foszfátáz, aszparagináz, glükóz oxidáz, béta-galaktozidáz, ribonukleáz, ureáz, kataláz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, glükoamiláz vagy acetilkolin észteráz

alkalmazható. A detektálás a jelölésre alkalmazott enzimre specifikus szubsztrát révén, például, az enzimreakció által átalakított szubsztrát és kontroll standardok vizuális összehasonlításával hajtható végre.

Ezen túlmenően, a detektálást egyéb immunesztek alkalmazásával is elvégezhetjük, például, az antitestek vagy antitest-fragmensek radioaktív jelölésével [pl., radioimmuneszt (RIA; Work és mtsai.: „Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology”, North Holland Publishing Company, New York (1978)]. A radioaktív izotóp kimutatását és mennyiségi meghatározását szcintillációs számláló alkalmazásával vagy autoradiográfiával végezhetjük.

A jelölésre fluoreszcens vegyületek (például, fluoreszcein-izotiocianát, rodamin, fikoeitritin, fikocianin, allofikocianin, o-ftálaldehid és fluoreszcamin), illetve fluoreszkáló fémek (például, 152E vagy a lantanoidák közé tartozó egyéb fémek) is alkalmazhatók. Ezek a fémek kelátképző csoportokon [például, dietilén-triaminpentaeetsav (ETPA) vagy EDTA] keresztül kapcsolhatók az antitesthez. Ezenfelül, a találmány szerinti antitestek kemilumineszcens vegyületekkel is jelölhetők. A kemilumineszcens jelölésű antitest jelenléte a kémiai reakció során keletkező lumineszcencia révén mutatható ki. Az ilyen vegyületek példái közé tartozik a luminol, izoluminol, akridinium-észterek, imidazol, akridinium-sók és oxalát-észterek. Hasonlóan, az antitestek jelölésére biolumineszcens vegyületek is alkalmazhatók. A biolumineszcencia a kemilumineszcencia egyik típusa, amely biológiai rendszerekre jellemző, és amelynél egy katalitikus aktivitású protein fokozza a kemilumineszcens reakció hatékonyságát. A biolumineszcens protein lumineszcencia alapján detektálható. A biolumineszcens vegyületek találmány céljaira alkalmas példái közé tartozik a luciferin, luciferáz és aequorin.

A találmány szerinti antitestek immunometriás vizsgálati eljárásban (ún. „szendvics”-tesztben) is alkalmazhatók. A tipikus immunometriás vizsgálati rendszerek közé tartoznak az ún. „direkt” („forward”) tesztek, amelynek során a találmány szerinti antitesteket szilárd fázishoz kapcsolva érintkeztetjük a vizsgálni kívánt mintával, ami lehetővé teszi, hogy az antigént – antitest-antigén komplex kialakulása révén – izoláljuk a mintából. Megfelelő inkubálási idő elteltével a szilárd hordozót a folyékony minta maradékának eltávolítása érdekében lemosuk, majd ismeretlen mennyiségű jelölt detektáló antitestet tartalmazó oldattal érintkeztetjük. A jelölt antitest ebben az esetben „riportermolakulaként” funkcionál. A szilárd hordozót egy második inkubálást követően (amely lehetővé teszi a jelölt antitest és a szilárd fázishoz kötődött antigén kapcsolódását) ismét lemosuk, eltávolítva ezáltal az el nem reagált jelölt antitesteket.

Egy alternatív vizsgálati módszer szintén a „szendvics”-teszt alkalmazásán alapul. Ebben az esetben elegendő egyetlen inkubálási lépés, feltéve, hogy a szilárd fázishoz kapcsolt antitestet és a jelölt antitestet egyszerre adjuk a vizsgálandó mintához. Az inkubálást követően a szilárd fázist – a folyékony minta, illetve az el nem reagált jelölt antitestek maradékainak
5 eltávolítása érdekében – leöblítjük. A szilárd hordozón a jelölt antitest jelenlétét a hagyományos direkt szendvics-teszthez hasonlóan határozzuk meg. A „fordított” teszt a következő lépésekből áll: először a folyékony mintához hozzáadjuk a jelölt antitest oldatát, majd – megfelelő inkubálási idő elteltével – az elegyhez hozzákeverjük a szilárd hordozóhoz kötött, jelöl-
10 ten antitestet, és második inkubálást végzünk. Ezt követően a szilárd hordozót – a minta és a nem reagált, jelölt antitest maradékainak eltávolítása érdekében – szokványos módon lemosuk, majd a szilárd fázishoz kötődött, jelölt antitestet a fentebb leírtak szerint detektáljuk.

A találmány további szempontjának megfelelően, eljárásokat tárunk fel találmány szerinti ec3-géntermékek - közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott polipeptidek (ideértve azok származékait, analógjait és fragmenseit) – megfelelő
15 expressziós vektorral transzformált gazdasejtben történő expresszáltatására. A találmány szerinti expresszáltatási eljárás (amely találmány szerinti DNS-szekvencián alapul), nem a megfelelő géntermék betöményítését és tisztítását szolgálja, hanem inkább - megfelelő géntermék (találmány szerinti DNS-szekvenciák bejuttatását követő) expresszáltatása révén – a sejt-anyagcsere befolyásolására szolgál. A találmány értelmében feltárjuk az expressziós vektor-
20 rokkal transzformált gazdasejtek hatóanyagként – vagy hatóanyag előállítására - történő alkalmazását is, elsősorban rendellenességek kezelésére, például, daganatos betegségek, neurológiai rendellenességek (pl., szklerózis multiplex, Parkinson-kór) és agyi ischaemiás állapotok (pl., stroke) kezelése céljából. A találmány szerinti gazdasejtek általában olyan rendellenességek kezelésére alkalmazhatók, amelyek az apoptózis, nekrozis, sejtnövekedés, sejtosztódás,
25 sejtdifferenciálódás vagy a sejtplaszticitás rendellenes szabályozásával állnak összefüggésben. A találmány szerinti eljárással ex vivo transzformált autológ vagy allogén gazdasejtek – a transzformációt követően – visszaültethetők a páciens szervezetébe.

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, eljárást tárunk fel géntermékek izolálására, amelyek legalább egy olyan részleges szekvenciát tartalmaznak, amely a ta-
30 lálmány szerinti aminosav-szekvenciákkal (közelebbről, az 5., 6., 7/a, 7/b, 7/c, 8. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákkal) legalább 20 aminosav, előnyösen legalább 30 aminosav hosszúságban homológ. Az izolálási eljárás során a gazdasejteket találmány szerinti expressziós vektorral transzformáljuk, majd a transzformált sejteket megfelelő, expressziót

elősegítő feltételek mellett tenyésztjük, oly módon, hogy végül lehetővé váljon a géntermék tenyészetből történő tisztítása. A találmány szerinti DNS-szekvencia találmány szerinti géntermékét – az alkalmazott expressziós rendszertől függően – a tenyésztő tápközegből vagy a sejtek kivonatából izolálhatjuk.

5 Szakember számára könnyen belátható, hogy a találmány szerinti DNS-szekvencia által kódolt rekombináns protein izolálására és tisztítására alkalmazható konkrét módszer erősen függ a gazdasejt típusától és egyéb tényezőktől, illetve, hogy a gazdasejt a proteint kiválasztja-e a tápközegbe. Például, alkalmazhatunk olyan expressziós rendszereket, amelyek a rekombináns protein szekréciónak eredményezik. Ilyen esetben a tenyésztő tápközeget keres-
10 kedelmi forgalomban beszerezhető proteinkoncentrááló filterek (például, „Amicon” vagy „Millipore Pelicon”) alkalmazásával betöményítjük. A betöményítési lépést követheti a tisztítási lépés, például, géliszűréssel vagy oszlopkromatográfiás módszerekkel. Más módon, a tisztításra alkalmazhatunk DEAE-közeget tartalmazó anioncserélő oszlopot is.

Tisztítási közegként a proteinek tisztítására ismert anyagok bármelyike alkalmazható, így például, akrilamid-gyanta, agaróz, dextrán vagy hasonló. Mindazonáltal, alkalmazhatunk kationcserélő gyantát is, amely jellemzően karboxi-metilcsoportokat tartalmaz. A találmány szerinti DNS-szekvenciák által kódolt polipeptidek egy vagy több HPLC-lépés alkalmazásával további tisztításnak vethetők alá (különösen hasznos a reverz fázisú HPLC). A tisztítási lépések egy találmány szerinti DNS-szekvencia által kódolt, lényegében homogén rekombináns
20 protein kinyerését eredményezik.

A találmány szerinti géntermék – baktériumsejtek tenyésztése helyett – transzformált élesztősejtek alkalmazásával is izolálható. Ebben az esetben a transzlációval létrejött protein szekretálódik, ami leegyszerűsíti a protein tisztítását. A szekretált rekombináns protein élesztősejtekből történő kinyerését az Urdal és mtsai. [J. Chromato. 296, 171 (1994)] által leírt eljárásokkal hajthatjuk végre (mely forrást teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni).

A találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák (közelebbről, DNS-szekvenciák) és/vagy géntermékek hatóanyagként, illetve hatóanyagok előállítására alkalmazhatók. A szóban forgó hatóanyagok önmagukban (bukkálisan, intravénásan, orálisan, parenterálisan, nazálisan, szub-
30 kután), illetve egyéb aktív vegyületekkel, segédanyagokkal vagy drog-tipikus adalékokkal kombinálva adagolhatók. A találmány szerinti nukleinsav önmagában („csupasz” nukleinsavként) (elsősorban intravénásan) injektálható, illetve vektorokba foglalva adagolható. Vektorként plazmidok, vírusvektorok (retrovírus- vagy adenovírus-vektorok), illetve liposzómák al-

kalmazhatók, mely utóbbiak találmány szerinti csupasz DNS-t vagy találmány szerinti DNS-t tartalmazó plazmidot tartalmazhatnak.

Ennek megfelelően, a találmány szerinti szekvenciák (közelebből, az 1-8. azonosító-számú nukleotid-, illetve aminosav-szekvenciák, illetve ezek változatai), valamint a találmány szerinti protein-heteromerek, illetve az ezekből származó találmány szerinti reagensek (oligo-nukleotidok, antitestek, peptidek) terápiás célra (például, rendellenességek kezelésére) alkalmas hatóanyagok előállítására alkalmazhatók. A találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyös a találmány szerinti molekulák - sejthalál és sejtproliferációs események nem megfelelő szabályozásával összefüggő - rendellenességek vagy kóros állapotok kezelésére, illetve a kezelésre alkalmas hatóanyagok előállítására történő alkalmazása.

Ilyenformán, közvetetten vagy közvetve, szintén különösen jelentős az a felismerésünk, miszerint az eritropoietin (EPO) - amelynek hatása a sejtek transzkripciós viselkedésében bekövetkező változásnak tulajdonítható - a találmány szerinti receptorok (például, ee3_1) transzkripciós szintű serkentését eredményezi. Ennek megfelelően, a találmány szerinti receptorok közvetítik az EPO hatását, ezáltal a vele összefüggő rendellenességek szempontjából szintén kulcsfontosságúak. Ez, többek között, azt jelenti, hogy a találmány szerinti receptorok szelektíven képesek befolyásolni az EPO egyes hatásait, mint például, a neuroprotektív hatást (pl., neurodegeneratív rendellenességek esetén, ahol az NF-kappaB transzkripciós faktor aktiválása az EPO neuroprotektív hatásának lényeges lépése) vagy az agyi funkció fokozását (pl., dementia esetén).

Megfelelő állatkísérletek eredményei alapján a találmány szerinti megoldások funkcionálisan neurológiai rendellenességek (például, agyi ischaemiák, kísérletileg indukált encephalomyelitis vagy subarachnoidalis vérzések) modelljeiként foghatók fel.

Ez az említett részleges hatások esetén kívánatos, mivel az EPO adagolása - a neuroprotektív hatáson túlmenően - a hematokrit-érték növekedését eredményezi, ami a neuroprotektív hatással részben ellentétes lehet, mivel a vér reológiai tulajdonságai rosszabbodhatnak, károsítva a mikrokeringést [ezt egereknél az eritropoietin túltermelése esetén mutatták ki; Wiessner és mtsai.: J. Cereb. Blood Flow Metab. 21, 857 (2001)].

Ilyenformán, a találmány szerinti szekvenciák, például, nukleotidszekvenciák, oligo- vagy polipeptidek, expressziós vektorok, illetve gazdasejtek, valamint a találmány szerinti receptorok bármely pozíciójához kötődni képes helyettesítő („surrogate”) ligandumok (melyek a szabályozás szempontjából relevánsak) előnyösen alkalmazhatók neurológiai rendellenességek (közelebből, neurodegeneratív rendellenesség) kezelésére alkalmas hatóanyagok előállí-

tására.

A találmány szerinti alkalmazással bármely - találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek vagy azok természetes változatát expresszáló – sejtben (elsősorban idegsejtben) befolyásolhatók a sejthalál folyamatai, például, az apoptózist eredményező kaszkádok, illetve a nekrozishoz vezető folyamatok, mint például, a sejtek közötti kölcsönhatások (közelebbről, azok a kölcsönhatások, amelyek a G-proteinhez kapcsolt proteinek közreműködésével játszódnak le).

A találmány értelmében a találmány szerinti natív proteinek (közelebbről, az 5-8. azonosítószámú szekvenciák valamelyikét tartalmazó proteinek) - receptorokként – intracelluláris szignáltranszdukciós reakcióutak komponenseiként funkcionálnak (jellemzően a szignálkaszkád beindítójaként, melynek hibás szabályozása számos rendellenesség okaként tartható számon). E vonatkozásban a fentebb említett, találmány szerinti proteinek celluláris funkciókat, például, a következő celluláris folyamatok komponenseiként tölthetnek be: szignáltranszdukció általában, sejt differenciáció, sejtosztódás, növekedés, plaszticitás, regeneráció, differenciáció, proliferáció és sejthalál. Ennek megfelelően, egy találmány szerinti protein (például, ee3_1 vagy ee3_2) működésképtelensége vagy nem funkcionális expressziója vagy túlzott mértékű expressziója jellemzően olyan kóros állapotot idéz elő, amelyet, például, a sejt differenciáció, sejt növekedés, sejt plaszticitás, illetve sejt regenerálódás szabályozásának zavara kísérhet. Másrészt, egyéb mechanizmusok (például, a találmány szerinti ee3-receptorok natív ligandumainak működésképtelensége vagy túlzott működése) szintén előidézhethetnek kóros állapotokat. A rendellenesség molekuláris mechanizmusától függően, terápiás célokra kívánatos lehet a találmány szerinti funkcionális protein páciensnek történő adagolása vagy e protein legalább nagyobb mértékű expresszáltatása, vagy más módon, a sejtben termelődő vagy túlzott mértékben termelődő, nem funkcionális protein gátlása. Különösen előnyös a találmány szerinti szekvenciák (közelebbről, az 1-11. azonosítószámú szekvenciák) idegsejtek pusztulásában, gerjesztésében, illetve neurogenesisben betöltött működésükkel összefüggésben történő alkalmazása. Ezen felismeréseink képezik alapját a találmány szerinti szekvenciák (nukleotid- és aminosav-szekvenciák), illetve megfelelő származékaik (például, peptidek, oligonukleotidok és antitestek) daganatos és neurológiai rendellenességek kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására történő alkalmazásának, mely rendellenességek példái a következők: ischaemiás állapotok (pl. stroke), szklerózis multiplex, neurodegeneratív rendellenességek (pl., Parkinson-kór, amiotróf laterális szklerózis, öröklött degeneratív ataxiák, neuropátiák, Huntington-kór, epilepsziás betegségek és Alzheimer-kór). Mindezekben túlmenően, a találmány szerinti

szekvenciák alkalmazása minden olyan kóros folyamat esetén hasznos, amelyekben az eritropoietin (védő) szerepet játszik (ilyen, például, a stroke, valamint az akut és krónikus hipoxiás állapotok valamennyi formája).

A találmány értelmében az - enzim-komplementálás alapján mért - funkcionális receptor-aktiválás sejtalapú HTS-tesztjei alkalmasnak bizonyultak a molekuláris összefüggések alapjának további tisztázására. A vizsgálati eljárás a GPCR-proteinek általános szabályozó-mechanizmusán alapul, és az aktivált receptor és a béta-arrestin közötti interakciót méri. Erre a célra a receptor C-terminálisához és a béta-arrestinhez egymást kiegészítő, inaktív béta-galaktozidáz-fragmenseket fuzionálunk. A receptor aktiválásának hatására a béta-arrestin a receptorhoz vándorol, miáltal a béta-galaktozidáz két fele egyesül, s ennek eredményeként működőképes béta-galaktozidáz enzim jön létre, amely képes a megfelelő szubsztátok átalakítására (melyek a mért jelet biztosítják; ICASZT-rendszer). Ez a vizsgálati eljárás elvileg bármely enzimmel végrehajtható, amely két, egymást kiegészítő félből álló fúziós proteinként expresszálható, és amely esetében a szubsztátreakció ismert mérési módszerrel mérhető.

A találmány további szempontjának megfelelően, a találmány szerinti szekvenciák, nevezetesen egy találmány szerinti nukleinsav-szekvencia vagy aminosav-szekvencia (közelebről, az 1-4. azonosítószámú nukleotidszekvenciák, illetve az 5-8. azonosítószámú aminosav-szekvenciák, valamint azok fentebb említett változatai, például, fragmensei) terápiás alkalmazását tárjuk fel (például, emberekben génterápiás célokra). A „génterápia” kifejezésen olyan terápiát értünk, amely az 1-4. igénypontok szerinti szekvenciák páciens testébe vagy testrészeibe (például, valamely szövetébe) történő bejuttatásán, illetve a találmány szerinti szekvenciák expressziójának kiváltásán alapul. Erre a célra a szakember számára jól ismert módosítások bármelyike alkalmazható, például, oligonukleotidok, pl., antiszensz vagy hibrid RNS-DNS oligonukleotidok, melyek tetszőleges módosításokat tartalmaznak, és amelyek találmány szerinti szekvenciákat tartalmaznak. Hasonlóan, alkalmazhatók találmány szerinti szekvenciákat (ideértve azok bármely változatát, például, fragmenseit, izoalakjait, alléljeit vagy származékait) tartalmazó virális konstrukciók is. Génterápiás célokra alkalmazhatók a találmány szerinti megfelelő, csupasz DNS-szekvenciák, valamint olyan nukleinsav-részletek is, amelyek enzimikus aktivitással bírnak (pl., ribozimok).

A találmány szerinti nukleinsavak, polipeptidek, protein-heteromerek, illetve az ezekből származó reagensek (oligonukleotidok, antitestek és peptidek), a terápiás alkalmazás mellett, például, humán rendellenességek vagy genetikai predispozíciók diagnosztizálására is alkalmazhatók (például, terhességi tesztek során). A rendellenességek vagy predispozíciók

példáiként a terápiás alkalmazásnál megadott rendellenességek említhetők, elsősorban neuro-
 lógiai és immunológiai rendellenességek vagy daganatos betegségek. A szóban forgó diag-
 nosztikai eljárások in vivo, gyakrabban ex vivo eljárások lehetnek. Egy találmány szerinti
 jellemző ex vivo diagnosztikai eljárás egy találmány szerinti nukleinsav biológiai mintában
 5 történő kvalitatív és/vagy kvantitatív detektálására alkalmazható. Az ex vivo eljárás előnyösen
 a következő lépésekből áll: (a) egy biológiai mintát a találmány szerinti nukleinsav ismert
 mennyiségével (vagy a találmány szerinti nukleinsav amplifikálására láncindító oligonukleo-
 tidként alkalmas oligonukleotidok ismert mennyiségével) inkubálunk; (b) a találmány szerinti
 nukleinsavat specifikus hibridizációval vagy PCR-amplifikációval detektáljuk; és (c) a hibri-
 10 dizálódott nukleinsav vagy a PCR-amplifikációval kapott nukleinsav mennyiségét mennyiségi
 standarddal hasonlítjuk össze.

A találmány egy további szempontjának megfelelően, eljárást tárunk fel találmány sze-
 rintí protein-heteromer vagy találmány szerinti protein biológiai mintában történő kvalitatív
 és/vagy kvantitatív detektálására, melynek során (a) egy biológiai mintát a kimutatni kívánt,
 15 találmány szerinti protein-heteromer vagy protein/polipeptid ellen specifikus antitesttel inku-
 bálunk; (b) kimutatjuk az antitest-antigén komplexet; és (c) az antitest-antigén komplex men-
 nyiségét mennyiségi standard értékkel hasonlítjuk össze. Standardként rendszerint egészséges
 szervezetből vett biológiai mintát alkalmazunk. Lehetőség van arra, hogy (különösen diag-
 nosztikai célokra) kihasználjuk egy találmány szerinti gén (például, ee3_1-gén) azon tulajdon-
 20 ságát, hogy egy jellegzetes patofiziológiai stimulus (stroke, szívleállás, daganatos állapot, stb.)
 után a találmány szerinti szekvenciák mRNS-ének sejtekben mérhető mennyiségének változá-
 sát (például, növekedését) idézi elő. Ezen a módon lehetőség nyílik arra, hogy prognosztizál-
 juk a találmány szerinti proteinek termelődési szintjének megváltozásával járó betegségeket
 (pl., stroke), és értékeljük a sikeres terápiákat, illetve besoroljuk a betegséget. Végül, a talá-
 25 lmány szerinti eljárások a fenti rendellenességek kezelésének ellenőrzésére is alkalmazható.

A találmány szerinti szekvenciák felhasználhatók az említett szekvenciák polimorfiz-
 musainak meghatározására, például, emberekben. A találmány szerinti szekvenciák e megha-
 tározott polimorfizmusai diagnosztizálás céljából prognosztikai markerként, illetve - a talá-
 lmány szerinti szekvenciák nem funkcionális expressziójával, a találmány szerinti nem funkci-
 30 onális szekvenciák expressziójával és/vagy azok túlzott mértékű expressziójával összefüggő -
 rendellenességek predispozíciójának diagnosztizálására alkalmazhatók. Ezen túlmenően, a
 találmány szerinti szekvenciák humán genetikai betegségek (monogénés vagy poligénés rend-
 ellenességek) vizsgálatára is alkalmazhatók.

A találmány szerinti nukleinsavak és polipeptidek – humán és/vagy állatgyógyászati téren terápiás és/vagy diagnosztikai alkalmazásuk mellett – tudományos célokra is felhasználhatók. Közelebbről, a találmány szerinti szekvenciák alkalmazása lehetővé teszi rokon szekvenciák egy- vagy többsejtű organizmusokban - szakember számára jól ismert módszerekkel (például, cDNS-könyvtárak alkalmazásával) – történő azonosítását, illetve e rokon szekvenciák humán genomban történő lokalizálását. Ilyenformán, a találmány szerinti nukleotidszekvenciák, közelebbről, az 1-4. azonosítószámú szekvenciák (ideértve azok tetszőleges változatait), felhasználhatók az említett nukleinsavakat vagy funkcionális megfelelőiket, homológjait vagy származékát kódoló mRNS-ek génjei izolálására és térképezésére, illetve e gének humán genetikai betegségek markereivel mutatott korrelációinak meghatározására, például, egerek vagy más állatok genomjában és a humán genomban, ismert eljárásokkal végzett homológia szkríneléssel. Ez az eljárás lehetővé teszi, például, az ee3-családba tartozó szekvenciák kromoszómális lokuszainak [2. kromoszóma (2q14.2); X-kromoszóma (Xq28, lokusz-azonosító: 84548); 5. kromoszóma, 8. kromoszóma, 3. kromoszóma; 7. kromoszóma] fenotípusosan ismert genetikai rendellenességekkel, közelebbről, daganatos betegségekkel (pl. májsejtes karcinoma) mutatott kauzális összefüggésének meghatározását, lényegesen leegyszerűsítve ezáltal az ilyen rendellenességek diagnosztizálását, és új terápiás megoldásokat téve lehetővé. Ugyanez vonatkozik a találmány szerinti proteinekre is.

Ilyenformán, a találmány szerinti nukleinsavak segítségével lehetőség nyílik humán genetikai betegségek (monogén és poligén rendellenességek) diagnosztizálására, és e nukleinsavak markerként alkalmazhatók a genetikai rendellenességek diagnosztikai eljárásaiban.

Ennek megfelelően, tudományos célokra alkalmazható, találmány szerinti aminosav-szekvenciákon és/vagy nukleotidszekvenciákon alapuló vizsgálati rendszert tárunk fel. Az ilyen vizsgálati rendszerek kifejlesztésére cDNS, genomi DNS, a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák és a polipeptid szabályozóelemei, valamint ezek rekombináns vagy nem rekombináns fragmensei alkalmazhatók. A találmány szerinti vizsgálati rendszer különösen alkalmas a promóter vagy a protein vizsgálandó anyag jelenlétében kifejtett aktivitásának mérésére. A szóban forgó vizsgálati rendszer előnyösen egyszerű (kolorimetriás, luminometriás, fluoreszcencia-alapú vagy radioaktív) mérési eljárásokból áll, melyek a vizsgálandó anyagok sokaságának gyors mérését teszi lehetővé [Böhm és mtsai.: „Wirkstoffdesign”, Spektrum-Verlag, Heidelberg (1996)]. A leírt vizsgálati rendszerek kémiai könyvtárak találmány szerinti proteinekre (közelebbről, az 5-8. azonosítószámú szekvenciákra, például, azok származékaira

vagy fragmenseire) ható (azokat gátló vagy aktiváló) anyagokra történő szkrínelését teszik lehetővé. Az ilyen anyagok azonosítása az ee3-asszociált szignáltranszdukcióra specifikusan hatást gyakorló gyógyszerek azonosításának első lépése. Ez olyan vizsgálati rendszerek kifejlesztését foglalja magában, amelyek a G-proteinhez kapcsolt proteinek ismert tulajdonságait használják ki (mint például, az alábbiakban leírásra kerülő vizsgálati rendszerek).

A találmány szerinti protein (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott proteinek) - jellemzően apoptózissal, proliferációval, regenerációval vagy sejtnövekedéssel összefüggő - biológiai aktivitása gátolható (például, olyan esetekben, mint a stroke, szeptikus sokk, graft-versus-host betegség, degeneratív rendellenességek, közelebbről, neurodegeneratív rendellenességek, akut májgyulladás vagy a leírásban ismertetett egyéb indikációk), oly módon, hogy az érintett sejtekbe - szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával - az 5., 6., 7/A, 7/B, 7/C, 8., illetve 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteinek natív szekvenciájának antiszensz szálát (annak részletét) kódoló, jellemzően legalább 10 nukleotid hosszúságú oligonukleotidokat juttatunk be. A megfelelően transzformált sejtekben a találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek (például, ee3_1 vagy ee3_2) natív mRNS-ének transzlációja gátlás alá kerül, ami előnyös esetben a transzfektált sejt életképességének növekedését, illetve a sejtnövekedésre, sejtplaszticitásra, sejtproliferációra gyakorolt hatás módosulását eredményezi. Ez az eljárás szintén végrehajtható rekombináns vírusok alkalmazásával.

A találmány szerinti szekvenciák hibás szabályozásán alapuló rendellenességek esetében (például, a fentebb említett indikációknál) a kórosan megnövekedett apoptózis vagy sejtproliferáció kezelésére is lehetőség van, például, ribozimok alkalmazásával. Ennek megfelelően, olyan ribozimokat tárunk fel, amelyek képesek a natív ee3-mRNS (pl., ee3_1 vagy ee3_2) hasítására. A találmány szerinti ribozimoknak - például, az ee3_1 vagy ee3_2 transzlációjának blokkolása céljából - képesnek kell lenniük a találmány szerinti cél-mRNS-sel történő interakcióra (például, bázispárosodás révén), majd az mRNS hasítására. A találmány szerinti ribozimokat megfelelő vektorok (például, plazmidok, módosított állati vírusok, közelebbről, retrovírusok) alkalmazásával juttatjuk be a célsejtekbe. Ezek a vektorok, egyéb szekvenciák mellett, találmány szerinti ribozimot kódoló cDNS-szekvenciát tartalmaznak.

A találmány szerinti géntermékek (közelebbről, a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott géntermékek) biológiai funkciójának módosítása – jellemzően a találmány szerinti géntermékek apoptózisos, nekrozisos, proliferatív vagy növekedést jelző szignáltranszdukcióban betöltött funkciójának módosítása -, a fentebb említett lehetőségek mel-

lett, a találmány egy további megvalósítási módja alkalmazásával is végrehajtható. Ennek megfelelően, feltárunk egy kémiai vegyületet, amely képes a találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek intracelluláris funkciójának módosítására (gátlására vagy aktiválására), illetve a proteinek kódoló, találmány szerinti DNS-szekvenciák szintjén történő beavatkozásra [például, a DNS-hez (annak promóter-régiójához) vagy a találmány szerinti gént szabályozó transzkripciós faktorok bármelyikéhez történő kötődés révén]. A találmány szerinti vegyületek specifikusan kötődnek a találmány szerinti proteinhez (közelebbről, az 1-4. azonosítószámú szekvenciák bármelyikét tartalmazó proteinhez) vagy a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciához (közelebbről, az 5-8. azonosítószámú nukleotidszekvenciák bármelyikéhez), miáltal farmakológiai, közelebbről, neuroprotektív, immunmodulátor, anti-apoptózis vagy antiproliferatív hatást váltanak ki.

Ennek megfelelően, olyan kémiai vegyületeket, előnyösen szerves kémiai vegyületeket tárunk fel, amelyek molekulatömege kisebb, mint 5000 D, közelebbről, kisebb, mint 3000 D, speciálisan kisebb, mint 1500 D, és amelyek fiziológiailag jól tolerálhatók, és előnyösen képesek átjutni a vér-agy gáton. A találmány szerinti vegyületek, alkalmas esetben, olyan készítmény részét képezi, amely legalább még egy aktív vegyületet (és, előnyösen, kiegészítő anyagokat és/vagy adalékanyagokat) tartalmaz és hatóanyagként alkalmazható. A találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyös az olyan szerves molekula, amelynek találmány szerinti proteinhez (közelebbről, annak C-terminálisához, citoszol-doménjéhez vagy extracelluláris doménjéhez) történő kötődésre vonatkozó kötési állandója legalább 10^7 mol^{-1} . A találmány szerinti vegyületek előnyösen úgy alakíthatók ki, hogy képesek legyenek áthatolni a sejtmembránon (akár diffúzióval, akár (intra)membrán-transzportproteinek segítségével), ami megfelelő módosítással, például, aminosav-szekvencia hozzákapcsolásával biztosítható. Szintén előnyösek azok a vegyületek, amelyek gátolják vagy serkentik a találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek és kötőpartnereik kölcsönhatását (különös tekintettel az apoptózis, nekrotikus, proliferatív, növekedést jelző vagy regeneratív szignálok átalakítására). Az ilyen vegyületek a találmány szerinti proteinek megfelelő pozícióit foglalják el, s ezzel helyi konformációs változásokat idéznek elő, gátolva ezáltal a natív kötőpartner találmány szerinti proteinhez történő kötődését.

A találmány szerinti protein strukturális analízisével specifikus kötési affinitású találmány szerinti vegyületeket azonosíthatunk [ld. Böhm és mtsai.: „Wirkstoffdesign”, Spektrum-Verlag, Heidelberg (1996)]. A találmány szerinti proteinek – közelebbről, az 5-8. azonosítószámú szekvenciák bármelyikét tartalmazó proteinek -, azok származéka, allélja, izoalakja

vagy részlete szerkezetét vagy részleges szerkezetét NMR-analízissel vagy (megfelelő, például, „függőcsepp”-módszerrel végzett kristályosítást követően) Röntgen-krisztallográfiás eljárással határozzuk meg, vagy, ha ilyen nagy felbontású szerkezet nem áll rendelkezésre, szerkezetmeghatározó algoritmusok felhasználásával (például, korábban már meghatározott szerkezetű, homológ proteinek, mint például, rodopszin segítségével) megalkotjuk a találmány szerinti protein strukturális modelljét, majd az így kapott szerkezetet, illetve strukturális modellt – molekuláris modellező programok felhasználásával - a protein agonistájaként vagy antagonistájaként funkcionáló vegyületek azonosítására alkalmazzuk, mely vegyületekről megjósolható, hogy nagy affinitással kötődnek a találmány szerinti proteinhez. A fenti eljárások, alkalmas módon, egyéb szerkezetmeghatározó módszerekkel is kombinálhatók. Egy találmány szerinti protein vizsgált rész-szerkezete (például, aktív hely, kötőbarázda vagy „csukló” („hinge”)-régió) vonatkozásában potenciális affinitással bíró vegyület affinitásának szimulálására megfelelő erőtereket alkalmazunk. Ezek az anyagokat azután szintetizálással előállítjuk, és megfelelő vizsgálati eljárással kötőképességükre, illetve gyógyászati alkalmazhatóságukra teszteljük. Ennek megfelelően, az aktivitásukat találmány szerinti ee3-proteinekhez történő kötődéssel kifejtő, potenciális aktív vegyületek azonosításának in silico módszerei szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

A találmány egy következő előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti vegyület antitest, előnyösen ee3-családba tartozó, találmány szerinti protein (például, ee3_1, ee3_2 vagy ee3_5) vagy annak alapjául szolgáló mRNS ellen irányuló antitest, amely visszaültetett gazdasejtekbe ex vivo (vagy in vivo génterápiás módszerekkel gazdasejtekbe) van bejuttatva, és amely ún. „intratest”-ként nem szekretálódik, de hatását intracellulárisan fejti ki. Az ilyen intratestek a sejteket megvédik a rosszul vezérelt apoptózisos reakcióktól. Ez különösen azon szövetek sejtjei esetében alkalmazható, amelyek a páciensben kórosan túlzott apoptózisos viselkedést mutatnak (például, hasnyálmirigysejtek, keratinociták, kötőszöveti sejtek, immunsejtek, neuronok vagy izomsejtek). Az ilyen, intratestekkel genetikailag módosított sejtek szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

A találmány értelmében hatóanyagként alkalmazhatók azok a találmány szerinti vegyületek, amelyek képesek a találmány szerinti, natív ee3-protein (például, az 5., 6., 7/A, 7/B, 7/C, 8., illetve 11. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy megfelelő natív allélja vagy natív „splice”-változata) biológiai funkciójának (például, apoptózisos funkciójának) blokkolására vagy, alkalmas esetben, aktiválására. A szóban forgó vegyületek közé tartozik valamilyen fentebb említett változat, mint például, a szerves kémiai vegyületek, antitestek, antiszensz

oligonukleotidok vagy ribozimok. A találmány szerinti vegyületek különösen hasznosak rendellenességek, közelebbről, neurológiai, immunológiai vagy proliferatív rendellenességek kezelésére (illetve az ilyen rendellenességek kezelésére alkalmas hatóanyagok előállítására. Ilyenformán, egy találmány szerinti natív protein (közelebbről, az 5-8. azonosítószámú szekvenciák bármelyikét vagy azok natív változatait tartalmazó protein) celluláris működését gátló, találmány szerinti inhibitor - például, gátló hatású antitest (közelebbről, intratest), ribozim, antiszensz RNS, domináns negatív mutáns vagy a fentebb említett szerves kémiai vegyületek bármelyike, előnyösen egy nagy affinitású vegyület, amely, például, a fentebb leírt eljárások bármelyikével hozható létre - hatóanyagként alkalmazható a következő rendellenességek kezelésére (illetve azok kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására): krónikus vagy akut hipoxiás állapot bekövetkezésével jellemezhető betegségek, például, szívinfarktus, szívelégtelenség, szívizom-rendellenességek, szívizomgyulladás (myocarditis), pericarditis, perimyocarditis, szívkoszorúér-betegség, öröklött szívdefektusok jobb-bal kamrai egybenyílással (anastomosis), Fallot-tetralógia/pentalógia, Eisenmenger-szindróma, sokk, végtagok hipoperfúziói, artéria-elzáródásos betegség (AOD), perifériás AOD (pAOD), carotid stenosis, veseartéria-stenosis, kisérbetegség, intracerebrális vérzés, agyi véna- és sinus-trombózisok, érdaganatok, subarachnoideális vérzések, vaszkuláris dementia, Biswanger-betegség, subcorticalis arteriosclerotikus encephalopathia, embóliával összefüggésben kialakuló cortex infarktusok, vasculitis, diabetes-eredetű retinopathia, különböző eredetű vérszegénységek konszekutív tünetei (például, aplasztikus vérszegénység, mielodiszpláziás szindróma, policitémia vera, megaloblasztikus vérszegénységek, vashiányos vérszegénység, veseeredetű vérszegénység, szferocitózis, vészes vérszegénység, thalassemiák, hemoglobinopátiák, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz hiány, transzfúziós jelenségek, Rh-összeférhetetlenség, malária, szívbillentyű-helyettesítés, vérzéses vérszegénységek, fokozott lépműködéses szindróma), tüdőfibrózisok, emphysema, tüdőödéma: ARDS, IRDS, kiújuló tüdőembólia, daganatos betegségek (például, vastagbél-karcinoma, emlőkarcinoma, prosztatacarcinoma, tüdőkarcinoma), immunrendszeri rendellenességek (például, autoimmun betegségek, közelebbről, diabetes, psoriasis, immunhiányos állapotok, szklerózis multiplex, reumaszerű ízületi gyulladás, atópiák, asztma), vírusfertőzés-okozta betegségek (például, HIV, hepatitis-B vagy hepatitis-C fertőzések), baktériumfertőzések (pl., Streptococcus- vagy Staphylococcus-fertőzések), degeneratív rendellenességek, különös tekintettel a neurodegeneratív rendellenességekre, mint például, az izomsorvadás, graft-versus-host betegség (pl., máj-, vese- vagy szívatültetésekénél), illetve egyéb neurológiai rendellenességek (például, többek között, a következők: stroke, szklerózis multiplex, Parkinson-kór, subarachnoi-

deális vérzések, amiotróf laterális szklerózis, örökletes degeneratív ataxiák, Huntington-kór, neuropátiák, epilepsziás betegségek, agysérülések, Alzheimer-kór), izomlazítók (például, érzéstelenítéshez), endokrinológiai rendellenességek (például, osteoporózis vagy pajzsmirigy-elégtelenség) és bőrbetegségek (psoriasis, neurodermatitis), krónikus vagy akut fájdalom, genetika-
 5 netikai betegségek, pszichológiai rendellenességek (pl., skizofrénia vagy depressziók), sebgyógyulás, kardiovaszkuláris betegségek (például, isémiás infarktus, szívelégtelenség, szívritmuszavar, magas vérnyomás), agyi funkciók fokozása.

A felsorolt indikációk érvényesek a találmány szerinti géntermékek, illetve a találmány szerinti DNS-szekvenciák hatóanyag előállítására történő alkalmazására is.

10 A fentebb említett, találmány szerinti anyagok gyógyászati készítménybe is foglalhatók, mely készítmény – stabilizálása, illetve biológiai hozzáférhetőségének és/vagy farmakodinamikai tulajdonságainak javítása érdekében - gyógyászati szempontból elfogadható hordozókat, segédanyagokat és/vagy adalékanyagokat tartalmazhat.

A találmány egy további szempontjának megfelelően, eljárásokat (szkrínelési eljárásokat) tárunk fel gyógyászatilag aktív vegyületek - közelebbről, a találmány szerinti szekvenciák által okozott fiziológiai reakciókkal összefüggő szignálok kiváltását vagy átalakítását gátló tulajdonsággal bíró vegyületek – azonosítására. Az ilyen, gyógyászati szempontból aktív anyagok a találmány szerinti receptorokat extracelluláris végükön vagy transzmembrán-doménjükön (például, dimerizációjuk vagy multimerizációjuk gátlása révén) blokkolhatják, továbbá,
 15 intracellulárisan, gátolhatják a szignáltranszdukciót, például, az ee3-proteinek és az intracelluláris szignálproteinek közötti interakció blokkolása vagy aktiválása révén, konkrétan a ranbpn és/vagy MAP1a/MAP1b intracelluláris proteinek közötti interakció aktiválása vagy gátlása révén.

A találmány szerinti eljárások a következőket eredményezik: (a) 5. igénypont szerinti
 25 expressziós vektorral - közelebbről, találmány szerinti polipeptidet (például, az 5., 6., 7/A, 7/B, 7/C, 8., illetve 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polipeptidet) kódoló expressziós vektorral, és, alkalmas esetben, legalább egy riporter gént kódoló legalább egy expressziós vektorral - transzfektálandó sejtek; és (b) találmány szerinti proteinek által közvetített funkció (például, regeneratív vagy proliferatív folyamatok szignáltranszdukciója) észlelésére alkalmas paraméter, mely paraméter konkrétan a kaszpáz-3-aktiválás, amely egy tesztelt vegyület hozzáadása után az (a) pont szerint kapott gazdasejt-rendszerre - a tesztelt vegyület hozzáadása nélküli kontrollal összehasonlítva - mérendő. Ennek érdekében, a találmány szerinti eljárásnak megfelelően, a tesztelt vegyület növekvő koncentrációjával több párhuzamos kísérletet

végzünk a tesztelt vegyület gyógyászati aktivitásra (például, a apoptózist gátló hatásra) vonatkozó ID50-értékének meghatározására.

A találmány szerinti ee3-proteinek elsődleges szekvenciájának ismerete olyan rekombináns konstrukciók létrehozására alkalmazható, amelyek már ismert és karakterizált GPCR-proteinek tulajdonságait használják ki. Ilyenformán, például, a találmány szerinti ee3-proteinek aminosav-szekvenciájának adott régiói ismert, jól karakterizált GPCR-protein megfelelő szekvencia-régióival helyettesíthetők. Az így kapott konstrukció – ismert ligandumok vagy agonisták alkalmazásával – G-protein kapcsolódásának azonosítására alkalmazható, és a G-protein-kapcsolódást használó második jeltovábbító rendszerek alkalmasak ismert ligandumok, agonisták vagy antagonisták azonosítására. A találmány szerinti kiméra receptorok – például, a fentebb említett alkalmazásokra - például, a Kobilka és mtsai. által leírt eljárással állíthatók elő [ld. Kobilka és mtsai.: Science 240, 1310 (1988); melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni].

A találmány szerinti, ee3-családba tartozó konstitutív aktivitású receptormutánsok e receptorok szignáltranszdukciós reakcióutak karakterizálására és ligandumok szkrínelésére is alkalmazhatók. A találmány szerinti receptorok, mint a 7TM-protein-osztály képviselői, fiziológiai és farmakológiai viselkedésük módosítása érdekében, mutagenesisnek vethetők alá. Ez, például, intracelluláris jelátviteli reakcióutak azonosítására is alkalmazható, olyan esetekben, amikor a természetes ligandum vagy egy agonista ismeretlen. Az ilyen változások kiváltására különösen alkalmasak az ee3-proteinek „DRI” konszenzus szekvenciájában végrehajtott mutációk; például, a „DRY” szekvenciában [Scheer és mtsai.: Mol. Pharmacol. 57, 219 (2000)] az „R” lizinnel, hisztidinnel, glutaminsavval, aszparaginsavval, alaninnal, aszparagin-nal vagy izoleucinnal végzett helyettesítése. Az „R” aminosav lizinnel végzett helyettesítése a konstitutív aktiválás erőteljes fokozódását eredményezi, míg a hisztidinnel vagy aszparaginnal történő helyettesítés a konstitutív aktiválás kisebb mértékű fokozódását váltja ki. Érdekes módon, az argininnel végzett helyettesítés úgy növeli az agonista-affinitást, hogy az így létrejött mutánsok a HTS-szkrínélések szempontjából szintén érdekeltek.

A harmadik transzmembrán-doménben elhelyezkedő konzervált arginin szintén potenciális mutagenesis-hely [Ballesteros és mtsai.: J. Biol. Chem. 273, 10445 (1998)].

Más módon, a találmány szerinti immobilizált, funkcionális receptorok alkalmazásán alapuló eljárások endogén vagy helyettesítő ligandumok azonosítására alkalmazhatók. Ilyen esetben a találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorokat GST-vel, „Flag”-jelölővel vagy TAP-jelölővel alkotott fúziós proteinekként expresszáltatjuk. A megfelelő sejteket a membrá-

nok elválasztására ismert eljárásokkal dolgozzuk fel vagy közvetlenül alkalmazzuk a szolubilizálásra. A receptorok szolubilizálására detergensként, például, dodecilmaltozid, digitonin, kolát vagy ezek elegyei alkalmazhatók, majd a receptorokat megfelelő affinitási ágyazóközeghez (például, GST-„Sepharose”-hoz, anti-„Flag” M2-agarózhoz vagy IgG-„Sepharose”-hoz) kapcsoljuk. Ezt követően az ágyazóanyagokat leöblítjük, a szövetkivonatokkal vagy a sejtfelülűszőkkel inkubáljuk, végül ismét leöblítjük. Ha a kivonat aktív ligandumot (például, peptidet) tartalmaz, a ligandum hozzákötődik az immobilizált receptorhoz, és eluálást követően analitikai eljárásokkal (például, tömegspektrometriával) azonosítható.

A találmány értelmében az „internalizációs tesztek” a találmány szerinti receptorok (például, ee3_1) természetes vagy, konkrétan, helyettesítő ligandumainak azonosítására alkalmas vizsgálati eljárások, melyek esetében szintén a GPCR-osztályba tartozó proteinek eltérő tulajdonságait használjuk ki. Például, a detektálásra a GPCR-osztályba tartozó proteinek internalizációs viselkedését használhatjuk fel. Ezt a receptor aktiválása utáni szabályozómechanizmusként kell értelmezni. Az ilyen viselkedésen alapuló szkrínelési eljárás előnye, hogy nincs szükség az adott receptor fiziológiájának részletes ismeretére (közelebbről, nincs szükség a kapcsolódó G-proteinek és az alkalmazott szignáltranszdukciós reakcióutak ismeretére).

Lenkei és mtsai. leírtak egy ilyen tesztet [Lenkei és mtsai.: J. Histochem. Cytochem. 48, 1553 (2000)], amely a találmány szerinti receptorok esetében is hasonlóan alkalmazható. Ennek során először létrehozunk egy találmány szerinti protein EGFP-vel alkotott C-terminális fúziós konstrukcióját, majd standard eljárásokkal stabil CHO-sejteket hozunk létre. EGFP-fluoreszcenciára végzett FACS-analízissel stabil klónokat szelektálunk; a végső szelekciót a felületi expresszió fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal végezzük. A sejteket ezután a szöveti kivonatok HPLC-frakcióival inkubáljuk, és az internalizációt konfokális mikroszkóp alkalmazásával határozzuk meg. Az értékelést morfometriás szoftver (NIH Image) alkalmazásával – a fluoreszcens jelek sejt középpontjától mért távolságának elvét követve – végezzük. A gyakoriság/távolság megoszlás az internalizáció jó megkülönböztetését eredményezte.

Ismeretlen ligandumok azonosítása érdekében – a megfelelő peptid tiszta állapotban történő izolálása céljából – egymás utáni frakcionálásokat végzünk, majd a peptidet szekvenálással vagy, például, MALDI-TOF-analízissel azonosítjuk. Ugyanezen módszer egy másik alkalmazását írták le Gosh és mtsai. [Biotechniques 29, 170 (2000)], illetve Conway és mtsai. [J. Biomol. Screen 4, 75 (1999)]. Mindkét alkalmazást teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni.

Mindazonáltal, a ligandumok azonosítására és/vagy, alkalmas esetben, a találmány

szerinti receptor karakterizálására funkcionális Ca-tesztet is alkalmazhatunk. A találmány értelmében azt a tényt használjuk ki, hogy a HEK293-sejtekben, CHO-sejtekben vagy egyéb sejtekben termelt nagyszámú 7TM-receptor (hét transzmembrán-domént tartalmazó recepto-
 5 és az intracelluláris Ca mobilizálását eredményezik. Ha a találmány szerinti egyes receptorok nem kapcsolódnának a Gq-osztályba tartozó G-proteinekhez, úgy e receptorok kiméra G-proteinek (vagy a receptorokhoz kevésbé specifikusan kötődő G15 és G16 G-protein) együttes expresszáltatásával arra kényszeríthetők, hogy PLC-n keresztül szignáltranszdukciót folytassanak. A találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorokat jellemzően HEK293- és CHO-
 10 sejtekben, stabilan és ideiglenesen, önmagukban vagy a Gq15 kiméra G-proteinnel (vagy más módon, a Gq15 G-proteinnel) együttesen expresszáltatjuk, majd a sejteket membrán-permeabilis Ca-kötő fluoreszcens színezékekkel (pl., Fura-2, Fluo-3 vagy Fluo-4) festjük. Ezt követően a sejteket leöblítjük, majd különböző tesztanyagokkal kezeljük, ugyanakkor – például, FLIPR-készülék (Molecular Devices) alkalmazásával –, mérjük a Ca-felszabadulást. A pozitív jelet
 15 adó tesztanyagokat előnyösen kontroll (csak vektorral transzformált) sejtekben is teszteljük, és ha a jel specifikusnak bizonyul, elvégezzük az anyag farmakológiai karakterizálását is (például, dózis-reakció görbék alapján).

Más módon, egy ligandum által előidézett Ca-reakció más Ca-detektorok alkalmazásával is mérhető; ilyen, például, az AequoScreen (Euroscreen; Brüsszel, Belgium; ld. pl.,
 20 http://www.pharmaceutical-technology.com/contractors/compound_man/euroscreen/). Ennek során apoequorin nevű proteint kódoló gént expresszáló sejteket alkalmazunk. Az aequorin a sejtek – apoequorinhoz kötődni képes - coelentraxinnal történő feltöltése után termelődik. Ha egy ligandum Ca-felszabadulást eredményez, a felszabadult Ca aktiválja az aequorin, miáltal az oxidálja a coelentraxint, s e reakció eredményeként fénykibocsátás következik be. A fényemisszió intenzitása arányos az intracelluláris Ca-koncentráció növekedésével, így (megfelelő
 25 kontroll figyelembe vételével) alkalmas a ligandum aktivitásának mérésére.

A találmány értelmében az antagonisták azonosítása céljából a receptorokat – különféle ligandumok kellőképpen nagy koncentrációi jelenlétében - ismert agonistával stimuláljuk, és a - csak agonistát (ligandum nélkül) tartalmazó kontrollhoz viszonyítva - megváltozott jel
 30 kompetitív antagonista jelenlétét jelzi.

A találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorok karakterizálására és ligandumok azonosítására cAMP-teszteket is alkalmazhatunk. Az ee3-receptorok farmakológiai karakterizálása és a ligandumok (agonisták vagy antagonisták) azonosítása e megközelítési módjának

alapját a GPCR-osztályba tartozó receptorok (például, a találmány szerinti proteinek) azon tulajdonsága képezi, hogy képesek az adenilát ciklázok serkentésére vagy gátlására, ami rendszerint ún. Gs („stimuláló”), illetve Gi („gátló”) proteinek aktiválásával megy végbe. A tesztanyagok hatásától függően (például, nagy átmenőteljesítményű szkrínelés során), lehetőség van a celluláris cAMP-koncentráció tesztelt anyagokkal összefüggő változásának – direkt vagy indirekt mérések alkalmazásával történő – vizsgálatára. Ennek során a receptort kódoló gént stabilan vagy ideiglenesen emlőseredetű sejtekben expresszáltatjuk (ld. a 2. példát). Az adenilát ciklázokat aktiváló – és ezáltal a celluláris cAMP-koncentrációt növelő - GPCR-proteinek esetében a tesztelt anyagok között (a cAMP kontroll sejtekben mérhetőhöz képest megnövekedett koncentrációja alapján) potenciális agonistát azonosítunk. Az antagonistákat (például, HTS-módszernél) a cAMP-koncentráció agonista által kiváltott növekedését blokkoló hatásuk alapján azonosíthatók. A találmány szerinti Gi-proteinnel kapcsolt ee3-receptorok esetében a vizsgálati eljárás során az adenilát cikláz - forskolinnal közvetlenül vagy Gs-kapcsolt receptor aktiválásával – stimuláljuk, ami a cAMP-koncentráció növekedését eredményezi. A Gi-hez kapcsolt receptor agonistája gátolja ezt a koncentráció-növekedést. A közvetlen cAMP-mérésekre számos kereskedelmi forgalomban beszerezhető teszt alkalmazható [pl., a cAMP[3H] tesztelőrendszer (Amersham)], amely az endogén termelődésű cAMP hozzáadott, radioaktívan (tríciummal) jelölt cAMP általi kompetitív helyettesítésén alapul. Indirekt cAMP-méréseket rendszerint riportertesztek alkalmazásával végezhetünk. Erre a célra a receptorokat riporterrendszereket (például, CRE-luciferáz rendszert) tartalmazó sejtvonalakban expresszáltatjuk. A cAMP aktiválja a luciferáz expresszióját, amelynek aktivitása a megfelelő szubsztrátok átalakítása és a termékek luminometrikus mérése alapján mérhető. A riportertesztek különösen alkalmasak a tömegalapú szkrínelési eljárásokban történő alkalmazásra.

Végül, a találmány szerinti receptorok második jeltovábbító-rendszerének karakterizálására és/vagy a találmány szerinti ee3-receptorok ligandumainak azonosítására – a fentebb leírt teszteken kívül – alkalmazhatók olyan vizsgálati rendszerek is, amelyek sejtekben vagy sejtmembránokban az adenilát cikláz aktivitásának meghatározására [ld. Salomon és mtsai.: Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 35 (1979)], az inozitol-3-foszfát koncentrációjának meghatározására, illetve az arachidonsav-felszabadulás változásának meghatározására alkalmasak. Például, az ee3_1-proteint ismert sejtvonalakban túlzott mennyiségben termeltethetjük, majd – szövetkivonatokkal végzett aktiválást követően, meghatározhatjuk a fentebb említett második jeltovábbító-rendszerek aktivitását. A GPCR-osztály másodlagos jeltovábbító-rendszereinek vizsgálati eljárásai külön-külön jól ismertek (ld. pl., „Signal Transduction: A Practical

Approach”, szerk.: Mulligan, Oxford University Press, Oxford, Anglia). További, szkrínelésre alkalmas riporter-tesztek közé tartozik a MAP-kináz/luciferáz és NFAT luciferáz rendszer.

A találmány kidolgozása során tett azon megfigyelésünk, hogy az ee3-receptor szignáltranszdukciója a MAP-kináz szignáltranszdukciós reakcióutakon keresztül is lejátszódhat, olyan szkrínelési eljárások kifejlesztésére is felhasználható, amelyek ligandumok keresésére vagy inhibitorok azonosítására alkalmasak (például, NF-kB riporter-rendszerek vagy luciferáz-rendszerek alkalmazásával).

Ahogy fentebb említettük, a második jeltovábbító aktiválása alkalmas lehet a találmány szerinti receptorokhoz kötődő ligandumok, agonisták vagy antagonisták azonosítására, s ezáltal kimutatható ezek bizonyos celluláris folyamatokra gyakorolt agonista és/vagy antagonistá hatása. Például, a ligandumok, agonisták vagy antagonisták azonosítására mikrofiziometerek alkalmazhatók. Egy ligandum ee3-családba tartozó receptorhoz történő kötődése által kiváltott szignálok energiafogyasztó folyamatokat reprezentálnak. Ennek megfelelően, az ilyen folyamatokat mindig kismértékű metabolikus változások kísérik (többek között, csekély pH-eltolódás). Ezek a változások extracellulárisan, például, mikrofiziométerrel (Cytosensor, Molecular Devices) regisztrálhatók.

A találmány szerinti, ee3-receptorcsaládba tartozó proteinek megkötésére képes ligandumok, agonisták vagy antagonisták, azonosításukat követően, részletesebb karakterizálásnak vethetők alá (például, ligandumkötési tesztekkel). A ligandumkötési tesztek különféle ligandumok adott receptorra vonatkozó kötési affinitásának közvetlen mérésére alkalmazhatók. A kötési tesztek céljára – fentebb említett vagy egyéb ismert módszerekkel azonosított – kémiaiilag tiszta ligandumot nagy specifikus aktivitással (30-2000 Ci/mmol) radioaktív izotóppal jelölünk, oly módon, hogy a radioaktív jelölő a ligandum receptorra vonatkozó aktivitását ne csökkentse. A vizsgálati feltételeket - a receptort expresszáló sejtekre, illetve az azokból készített membránfrakcióra -, a pufferösszetétel, a sók, modulátorok (például, nukleotidok) vagy a stabilizátorok (például, glicerín) vonatkozásában úgy optimalizáljuk, hogy használható jel/háttérszint arányt mérhessünk. E kötési tesztekben a specifikus receptorkötést a receptor-készítménnyel (sejtek vagy membránok) összefüggő összes radioaktivitás (azaz csak egy specifikus ligandum, nevezetesen a radioaktív jelölővel jelölt ligandum jelenlétében mért radioaktivitás) és a radioaktívan jelölt ligandum és egy radioaktívan nem jelölt ligandum feleslege jelenlétében mért radioaktivitás különbségeként definiáljuk. A nem jelölt ligandum a radioaktív jelölőt hordozó ligandumot kompetitív módon kiszorítja. A nem specifikus kötődés meghatározása céljából, ha mód van rá, legalább két, kémiaiilag különböző kompetitor ligandumot

alkalmazunk. Az optimális specifikus kötődés az összes kötődés legalább 50 %-át teszi ki. A kötési tesztet inhomogén módon, filtrációs tesztként, vagy homogén módon, szcintillációs közelségi („proximity”) tesztként hajtjuk végre.

Az első esetben a receptortartalmú készítményt (sejteket vagy membránokat) megfelelő pufferoldatban kötési egyensúly kialakulásáig inkubáljuk a ligandumokkal (rendszerint szobahőmérsékleten egy óra hosszat és 4 °C-on egy éjszakán át), majd megfelelő filtereken (például, a Whatman-tól vagy Schleicher & Schuell-től származó üvegszálas filtereken) le-szűrjük, mely filtereket a kötött és nem kötött radioligandum elválasztása céljából előzetesen polietiléniminnel kezelünk. A filtereket leöblítjük, majd szárítást követően – vagy más mó-
don, nedves állapotban – megfelelő szcintillátorral kezeljük, és kellő inkubálási idő után a radioaktivitást szcintillációs számlálóval mérjük. A szcintillációs közelségi teszt során megfelelő szcintillációs gyöngyöket (például, WGA-gyöngyöket) megfelelő pufferoldatban, a ligandumok és a receptortartalmú membránok jelenlétében kötési egyensúlyi állapot kialakulásáig inkubálunk, majd a radioaktivitást megfelelő szcintillációs számlálóval mérjük. Mind-
két kötési teszt végrehajtható HTS-formátumban (HTS = nagy átmenőteljesítményű szkrínelési eljárás).

A szolubilizált vagy tisztított receptorokat a szcintillációs közelségi tesztrel vagy standard inhomogén tesztekkel (például, PEG-precipitációt követően végzett filtrációs tesztrel, adszorpció tesztrel vagy gélfiltrációs tesztrel) mérhetjük [ulme és Birdsall: nature 323, 396
(1986)].

A radioaktívan jelölt ligandum helyett alkalmazhatunk fluoreszcens ligandumot is, például, fluoreszcens színezéket (pl., BODIPY). A fluoreszcens ligandum receptorhoz történő kötődését fluoreszcencia-polarizáció alkalmazásával mérjük. Ez a módszer HTS-formátumban végzett elsődleges szkrínelésre, illetve másodlagos tesztekre egyaránt alkalmas.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja értelmében nagy átmenőteljesítményű szkrínelési eljárásokat (HTS) tárunk fel ligandumok (agonisták vagy antagonisták), közelebből, a találmány szerinti ee3-szekvenciák inhibitorainak azonosítására. A találmány e megvalósítási módja szerinti eljárásban különösen előnyös a MAP szignáltranszdukciós reakcióút (valamennyi ismert) komponensének alkalmazása, különösen kisméretű szerves vegyületek azonosítása esetén. Az erre a célra alkalmas rendszerek, előnyösen, magukban foglalják a szcintillációs közelségi tesztet [SPA; Amersham Life Science, MAP kináz SPA; ld. McDonald és mtsai.: Anal. Biochem. 268, 318 (1999), mely hivatkozást teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni]. E vizsgálati eljárás során a MAP-kaszkádot in vitro rekonst-

ruáljuk, az egyes komponensekkel előállítva, melyek (E. coli sejtekben expresszáltatott) GST fúziós proteinek, vagy – a cRAF1 esetében - baculovírus-rendszer alkalmazásával lettek elő-állítva. Az inhibitorok megbízható módon történő tesztelése érdekében a kaszkád első elemét (MAP-KKK) folyamatosan és egyenletesen aktiválni kell, ami a baculovírus-rendszerben rendszerint src együttes expresszáltatásával valósítható meg. Ez a cRaf ras-szerű aktiválását biztosítja. A találmány szerinti nukleotidszekvenciák transzfektálása után a kaszkád módosulása következik be, melyet arra használunk, hogy HTS-rendszerben mérhessük a vizsgálandó anyag hozzáadása által okozott módosítás hatását.

A nagy affinitású, szelektív anyagok - fentebb említett, találmány szerinti eljárásokkal végzett – azonosítása után ezeket az anyagokat epilepszia, stroke és más neurológiai, immunológiai vagy proliferatív rendellenességek (daganatos megbetegedések) kezelésére szolgáló gyógyszerként történő alkalmazhatóságukra teszteljük. Ezenfelül, a kéthibrides élesztő-rendszer vagy más vizsgálati eljárások alkalmazásával meghatározhatjuk az azonosított és gyógyászatilag aktív anyagok találmány szerinti ee3-géntermékek (közelebbről, az 5., 6., 7/A, 7/B, 7/C, 8., illetve 11. azonosítószámú szekvenciák) megkötésére alkalmas kötőhelyeit, ami az interakcióért (illetve a natív proteinek közötti interakcióért) felelős aminosavak számának leszűkítése szempontjából jelentős. Egy következő lépésben – a találmány leírásában ismertetett szkrínelési eljárásokkal - azonosíthatjuk a nagy affinitású anyagokat (helyettesítő ligandumokat), melyek kiváltképp tartalmazzák a korábban azonosított (natív kölcsönhatási partnerek kötődéséért felelős) aminosavakat. Ezen a módon lehetőség van olyan anyagok felismerésére, amelyek alkalmasak a találmány szerinti polipeptidek és lehetséges natív intracelluláris kölcsönhatási partnereik közötti interakció befolyásolására (közelebbről, gátlására). Ennek megfelelően, eljárást tárunk fel olyan anyagok azonosítására, amelyek specifikus kötési affinitást mutatnak a találmány szerinti proteinre. E vonatkozásban különös hangsúllyal hivatkozunk a Klein és mtsai. [Nat. Biotechnol. 16, 1334 (1998)] által leírt eljárásokra. Egy találmány szerinti – G-proteinhez kapcsolt receptorok osztályába tartozó – protein ismert tulajdonságai (G-proteinekhez történő kapcsolódás, szignáltranszdukció) felhasználhatók inhibitorok azonosítására is.

A találmány szerinti eljárással azonosított, gyógyászatilag aktív anyagok – köszönhetően a találmány szerinti gének, illetve találmány szerinti, ee3-családba tartozó géntermékek (közelebbről, ee3_1- és ee3_2-szekvenciák) és/vagy natív változataik számos rendellenesség-nél [például, neurodegeneratív, proliferatív (túlbujánzásos), illetve hipoapoptózis vagy hiperapoptózis rendellenességeknél] kimutatható farmakológiai jelentőségüknek - igen széles

körben alkalmazhatók. Az említett túlbujánzásos rendellenességek közé tartoznak a dagantos betegségek, mint például, a kemény tumorok [sarcomák, pl., a bőr sarcomája (Kaposi-sarcoma), blastomák, a máj, a bél, a hasnyálmirigy, a gyomor vagy a tüdő karcinomái], továbbá a vérképzési rendszeri tumorok, különös tekintettel a limfomákra és a leukémiákra. Amellett, 5 hogy lehetőség van az egy vagy több egyéb molekulával (például, a szignáltranszdukciós reakcióút későbbi szakaszában szerepet játszó protein kinázokkal vagy adaptorokkal) bekövetkező interakció gátlására, a találmány szerinti proteinek kódoló gének transzkripciójának vagy a transzkriptum mennyiségének sejtben történő módosítása is lehetséges. Példaként említhető a találmány szerinti DNS-szekvenciák transzkriptumainak - találmány szerinti vegyületek által 10 szuppresszált kóros folyamatok utáni - gyors serkentő szabályozása, különösen azok transzkripció aktiválás utáni nagyon gyors szabályozása esetén. Ennek megfelelően, egy gyógyászatilag aktív vegyület esetében előnyös cél a transzkripció szabályozása, ami, például, egy találmány szerinti géntermék szabályozó régiójához (promóteréhez vagy erősítőszekvenciájához) specifikusan kötődő, említett anyagok révén, egy találmány szerinti géntermék egy 15 vagy több transzkripció faktorához történő kötődéssel (ami a transzkripció faktor aktiválását vagy gátlását eredményezi) vagy a transzkripció faktor expressziójának (transzkripciójának vagy transzlációjának) szabályozásával valósulhat meg.

A találmány szerinti, gyógyászatilag aktív vegyület - a transzkripció szabályozás (azaz egy találmány szerinti gén mRNS-e mennyiségének sejtben történő szabályozása) mellett – 20 más celluláris szabályozó folyamatokba is beavatkozhat, melyek, például, egy találmány szerinti protein expressziójának mértékét befolyásolják (például, a transzlációt, „splicing”-folyamatokat, a géntermék natív derivatizálódását, pl., foszforilációját, vagy a géntermék lebomlásának szabályozását).

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében eljárásokat tárunk fel találmány szerinti, ee3-családba tartozó polipeptidek – közelebbről, az ee3_1-, ee3_2- vagy 25 ee3_5-proteinek és/vagy natív változataik (izoalakjaik, alléljeik, „splice”-alakjaik vagy fragmenteik) – celluláris kölcsönhatási mintázatainak azonosítására. A találmány szerinti eljárással proteinek olyan kötőpartnerként azonosíthatunk, amelyek a találmány szerinti protein vonatkozásában specifikus kötési affinitással bírnak, továbbá, lehetőség nyílik a találmány szerinti 30 proteinek vonatkozásában specifikus kötési affinitással bíró proteinek kódoló nukleinsavak azonosítására. A találmány szerinti, ee3-proteinek celluláris kötő partnerei közé egyéb GPCR-proteinek, illetve ioncsatornák tartoznak.

A találmány e megvalósítási módja szerinti eljárást - illetve az ilyen eljárások gyakor-

lati kivitelezésére alkalmas, találmány szerinti polipeptidek, nukleinsav-szekvenciák és/vagy nukleinsav-konstrukciók alkalmazását - előnyösen kéthibrides élesztő-rendszerben végzett szkríneléssel (y2h-szkrínelés) önmagában vagy más biokémiai módszerekkel kombinálva hajtjuk végre [Fields és Song: Nature 340, 245 (1989)]. Ilyen szkrínelési eljárások további példáit
5 illetően ld. Van Aelst és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6213 (1993); Vojtek és mtsai.: Cell 74, 205 (1993). A találmány szerinti eljárás elvégzésére élesztő-rendszer helyet emlős-rendszereket is alkalmazhatunk [ld. pl., Luo és mtsai.: Biotechniques 22, 350 (1997)]. A fentebb említett, megfelelő kísérleti megoldások a GPCR-proteinek jellemző tulajdonságait használják fel, például a szignáltranszdukciót, pl. G-proteineken keresztül, azaz, például az ismert
10 intracelluláris kölcsönhatási partnereken keresztül is.

Az y2h-szkríneléshez a találmány szerinti szekvenciák (közelebbről, az 1-4. azonosító-számú szekvenciák vagy azok natív változatai, előnyösen a találmány szerinti szekvenciák intracelluláris régiói, pl., ee3_1 vagy ee3_2) nyitott leolvasási fázisát - a GAL4-kötődoménnel azonos leolvasási fázisban - „csalivektorba” („bait vector”), (például, a Clontech-től beszerez-
15 hető pGBT10- vagy pGBKT7-vektorba) klónozzuk. Ez előnyösen alkalmazható egy élesztő-törzsben létrehozott „zsákmány-könyvtár” („prey library”) interakcióba lépő proteinekre szokványos módszerrel történő szkrínelésére. Ezen túlmenően, az y2h-rendszerek - specifikus kölcsönhatási domének azonosítása céljából - „térképezési kísérletek” elvégzésére is alkalmazhatók.

Hasonlóan előnyösek az egyéb fúziós partnereket vagy más sejtrendszereket alkalmazó kéthibrides rendszerek, mint például, a BacterioMatchsystem (Stratagene) vagy a CytoTrap-system (Stratagene). A találmány értelmében - az y2H-eljárások alternatívájaként - megfelelő emlőssejtes rendszerek is alkalmazhatók [ld. pl., Luo és mtsai.: Biotechniques 22, 350 (1997), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni].

A találmány szerinti megoldás értelmében a kölcsönhatási partnereket találmány szerinti expressziós vektorokkal transzfektált sejtekből végzett együttes immunprecipitációval is izolálhatjuk, ami lehetővé teszi a hozzájuk kötődő proteinek tisztítását, majd - proteinszekvenálási módszerek (például, MALDI-TOF, ESI-tandem-MALDI) alkalmazásával - a megfelelő gének azonosítását.

Ennek megfelelően, kéthibrides élesztő-rendszer vagy megfelelő, szakember számára jól ismert eljárások vagy egyéb biokémiai eljárások alkalmazását tárjuk fel találmány szerinti ee3-proteinek interakciós doménjeinek és/vagy e proteinek natív változatainak azonosítására. Ezen túlmenően, feltárjuk az azonosított interakciós domének (natív szekvenciák fragmensei)

gyógyászati beavatkozásra történő alkalmazását.

Az endogén ligandumok vagy helyettesítő ligandumok (azaz a találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorok megkötésére képes, nem természetes vegyületek) azonosításának egyéb eljárásai a következő kiindulási anyagok alkalmazásával végzett tesztekkel hajthatók
5 végre: (a) különféle szövetkivonatok és sejtenyészeti felülúszók, amelyek előzetesen olyan anyagokkal kezelhetők, mint például, az eritropoietin (a kivonatok azután frakcionálásnak vetjük alá, s a ligandum azonosítására az egyes frakciókat használjuk); (b) kereskedelmi forgalomban beszerezhető vegyületbankok [például LOPAC (Sigma)], amely az ún. „árva” receptorok potenciális ligandumait tartalmazzák, például, (neuro)transzmittereket, bioaktív
10 peptideket, hormonokat, kemokineket és egyéb, természetben előforduló anyagokat, amelyek képesek a jelenleg ismert 7TM-receptorok megkötésére, s így szintén alkalmasak lehetnek a találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorokhoz történő kötődésre; (c) kombinatorikus peptidkönyvtár; vagy (d) kereskedelmi forgalomban beszerezhető vegyületkönyvtár, amelynek összetétele nagymértékben különbözhet a felsoroltakétól.

15 Például, az ee3_1 EPO általi serkentő szabályozása arra utalhat, hogy az ee3_1 összefüggésben áll a sejtek túlélésével, mivel az EPO neuroprotektív hatású. Ennek megfelelően, a találmány szerinti polipeptidek, közelebbről, a natív polipeptid-alakok vagy mesterségesen létrehozott változatok (melyek biológiai funkcióját vizsgálni kívánjuk), a találmány értelmében apoptózis-tesztben - vagy sejthalállal vagy más sejtfiziológiai folyamatokkal összefüggő
20 szignálok indukálásában, továbbításában vagy gátlásában betöltött funkciójuk és/vagy hatékonyságuk tanulmányozására alkalmas vizsgálati eljárásban – alkalmazhatók. A találmány szerinti, ee3-családba tartozó proteinek vagy fentebb említett változataik, például, apoptózis kaszkádokban játszott szerepének tanulmányozása céljából a találmány szerinti ee3-szekvenciákat (közelebbről, az 1-4. azonosítószámú szekvenciák bármelyikét vagy ezek változatait)
25 tartalmazó expressziós vektorokkal eukarióta sejteket transzfektálunk, s a transzfektált sejtekben lehetővé válik az apoptózis indukálásának vizsgálata. Az említett eukarióta sejtek ilyen vizsgálati eljárásokban történő alkalmazása szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartozik. Az apoptózis indukálását, például, annexinnel (Roche Diagnostics) végzett festéssel, a kaspáz-3 aktív alakját felismerő antitestek (New England Biolabs) alkalmazásával vagy
30 DNS-hisztin fragmenseket kimutató ELISA-tesztek („sejthalál”-ELISA, Roche Diagnostics) alkalmazásával mutatjuk ki. Az apoptózis indukálása lehet sejttípus-specifikus, így a találmány szerinti megoldás szempontjából előnyösen, a vizsgálatba sokféle sejtvonalat és primer sejtet vonunk be. Az apoptózis indukálása, adott esetben, stimulus-specifikus is lehet; ilyen

esetben a találmány szerinti eljárásban sokféle stressz-helyzetet használunk [pl., sokk, hipoxiás feltételek, citokines kezelés (pl., IL-1, IL-6, TNF- α) vagy hidrogén-peroxidos kezelés]. Az ilyen, találmány szerinti eljárásokban szokványos sejttypusok alkalmazhatók, mint például, COS-sejtek, HEK-sejtek, PC12-sejtek, THP-1-sejtek vagy primer sejtek, például, 5 neuronok, asztrociták, valamint, kívánt esetben, egyéb immortalizált és primer sejt vonalak.

A találmány további szempontjának megfelelően, találmány szerinti nukleinsavak, nukleinsav-konstrukciók vagy géntermékek alkalmazását tárjuk fel proliferációs tesztek végrehajtására és/vagy eljárásokat tárunk fel proliferációs tesztek találmány szerinti nukleinsavak, nukleinsav-konstrukciók vagy géntermékek alkalmazásával történő végrehajtására. A szóban 10 forgó proliferációs tesztek - a fentebb leírt apoptózis vizsgálati eljárásokhoz hasonlóan -, például, ee3-szekvenciák (közelebbről, ee3_1 vagy ee3_2, illetve ezek natív vagy nem natív változatai) sejt növekedésben, sejt ciklus-folyamatokban vagy tumorképző folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozására nyújtanak lehetőséget, például, lágy agar teszt segítségével [Housey és mtsai.: Adv. Exp. Med. Biol. 235, 127 (1988)]. Ezekben az eljárásokban szok- 15 ványos sejttypusok alkalmazhatók, mint például, COS-sejtek, HEK-sejtek, PC12-sejtek, THP-1-sejtek vagy primer sejtek, például, neuronok, asztrociták, valamint, kívánt esetben, egyéb immortalizált és primer sejt vonalak. Közelebbről, az ilyen, találmány szerinti eljárások segítségével lehetőség nyílik a találmány szerinti géntermékek „ras” szignáltranszdukciós reakcióútban betöltött szerepének vizsgálata, illetve a találmány szerinti géntermékek és a „ras” 20 szignáltranszdukciós reakcióút egyéb komponensei közötti kölcsönhatás tanulmányozására (különös tekintettel a proliferációs folyamatokra).

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia, illetve 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermék - „szipicid” génként/proteinként - gazdasejtek in vivo vagy ex vivo transzformálására történő alkalmazását 25 tárjuk fel. Ez az alkalmazás gazdasejtekben a sejt halál specifikus kiváltását teszi lehetővé, különös tekintettel a találmány szerinti protein apoptózis és/vagy nekrotikus szignál transzdukciójában betöltött biológiai funkciójára. A találmány szerinti DNS-szekvencia és/vagy protein alkalmazását előnyösen úgy tervezzük, hogy a szipicid gén működőképesen egy promóterhez legyen kapcsolva, miáltal a transzkripció akkor represszálható vagy aktiválható, amikor 30 arra szükség van. Közelebbről, a páciens sejtjeinek beültetése után lehetőség van a transzfektált sejt, génterápia során történő, ex vivo vagy in vivo specifikus kikapcsolására.

Összefoglalásul; a találmány kidolgozása során, emlőseredetű rendszerben, membránkötött G-proteinhez kapcsolt receptorok (GPCR-ek) új családját azonosítottuk, amely egyér-

telmüen megkülönböztethető e receptorok korábban ismert családjaitól. Azonosítottunk egy új proteinosztályt (s annak tagjait kódoló DNS-szekvenciákat), amelyek - a központi idegrendszerben tapasztalható eltérő szabályozásuknak köszönhetően - számos fiziológiai és patofiziológiai folyamat értékelését és karakterizálását teszik lehetővé.

5 A találmány értelmében az azonosítást (közvetlenül vagy közvetve) a találmány szerinti ee3_1-protein EPO által indukált transzkripciós szintű serkentő szabályozásával végeztük, ami azt jelenti, hogy, például, az ee3_1 agonistái és antagonistái képesek az EPO hatásainak serkentésére vagy helyettesítésére, illetve a nem kívánatos hatások gátlására. Az EPO szelektíven befolyásolható, konkrét hatásainak példáiként említhető a neuroprotektív hatás (például, neurodegeneratív rendellenességek esetén), illetve az agyi funkciók serkentése (például, dementiák esetén).

A találmány szerinti gén egerekben és emberekben 7-transzmembrán-proteint kódol, és elsősorban az agyban expresszálódik. A 7-transzmembrán-protein egy G-proteinhez kapcsolt receptor. Az EMBL szekvencia-adatbázisban végzett homológia-szkrínelés az A-családba tartozó GPCR-receptorokkal (konkrétan peptidreceptorokkal) távoli hasonlóságot mutatott ki.

Az ee3_1 szabályozása a következő neurológiai betegségmodellekben korlátozott módon valósul meg (ha megvalósul egyáltalán): gerjesztés (hippocampus, 5-ös szélületi stádium, szélület után két órával); agykérgi stroke (cortex, 2,5 órás érelzárás, két és hat órás reperfüzió); globális ischaemia patkányokban (teljes agy, ischaemia után három és hat órával). Ez az EPO általi szabályozás nagy specifitását jelzi, ellentétben, például, az azonnali korai génekkel.

A következőkben a találmány leírásához mellékelt ábrák részletes leírását ismertetjük.

Az 1/A ábrán Epo-egerek agyában végzett transzkripciós analízis eredményét mutatjuk be. Az ábrán látható grafikon DNS-mátrix hibridizációs kísérlet adatait reprezentálja. Az EPO-transzgenikus állatokban kapott jelet (y-tengely) a vad típusú egerekben kapott jel (x-tengely) függvényében ábrázoltuk. A jel (relatív) fluoreszcens jel. Az átló feletti pontok az EPO-transzgenikus állatok agyában nagymértékben szabályozott géntermékeket reprezentálnak. A 2. átló felett nyolc pozitív jelet figyeltünk meg (a vad típushoz viszonyítva kétszeresen túlzott mértékű expresszió a transzgenikus állatban). Az 1/B ábrán mikromátrix kísérletek eredményeit mutatjuk be. EPO-transzgenikus egerek agyában az egérereditű ee3_1 (relatív) induktív faktorát (a grafikon jobb oldalán) a vad típusú állatok agyában megfigyelhető induktív faktorral hasonlítottuk össze (két független hibridizációs kísérletből származó induktív értékek átlagaként). Az 1-es induktív faktor az egy alomból származó kontroll állatok agyában megfigyelhető koncentrációnak felel meg. Egy találmány szerinti szekvencia expressziója

ennek csaknem négyszerese.

A 2. ábrán egerekkel végzett kísérletek eredményeit mutatjuk be, mely kísérletet annak igazolására végeztük, hogy EPO-transzgenikus egerekben a találmány szerinti ee3_1-protein és az alfa-globin-géntermék (amely az EPO-transzgenikus állatban hasonlóan serkentő szabályozás alatt áll) fokozott indukciója érvényesül. A kísérletet kvantitatív PCR (LightCycler) alkalmazásával végeztük. A bemutatott adatok hat agyból származó, összesített RNS-minták eredményeit reprezentálják. A relatív indukciót az y-tengelyen ábrázoltuk. A találmány szerinti szekvencia – kontrollhoz viszonyítva (rel. indukció = 1) – az indukció 11-szeres növekedését eredményezte.

A 3. ábrán a találmány szerinti ee3_1-protein egerek fejlődése során (7, 11, 15 és 17 napos embriókban), illetve kifejlett állatok különböző szöveteiben (agy, szív, máj, vese, tüdő, vázizom, lép és here) kimutatott (LightCycler) expresszióját szemléltetjük. Az ee3-transzkriptumok relatív gyakoriságát az y-tengelyen tüntettük fel. A kapott adatok azt mutatják, hogy az ee3_1 valamennyi vizsgált embrionális fejlődési stádiumban, illetve valamennyi vizsgált szövetben viszonylag egyenletes mértékben expresszálódik.

Az ee3_2, EST-adatok alapján, egerek esetében embrionális karcinómában, vesében, májban, B-sejtekben, tüdőben, emlőben és méhben expresszálódik.

A 4. ábrán a találmány szerinti humán ee3_1, ee3_2 és ee3_c5 felnőtt emberi szövetekben (szív, agy, méhlepény, tüdő, máj, vázizom, vese, hasnyálmirigy) megfigyelt expresszióját szemléltetjük. A bemutatott adatok kvantitatív PCR-kísérletekből (LightCycler) származnak. Az y-tengelyen felvett adatok megfelelnek a 3. ábra adatainak; a vizsgált szövetekben a találmány szerinti, ee3-családba tartozó gének gyakorlatilag egyöntetű és párhuzamos expresszióját detektáltuk. A vesékben és a hasnyálmirigyben az ee3-család jelentős mértékben megnövekedett expressziója különösen szembevetendő, míg az agyban és a vázizomban kisebb mértékű expressziót figyeltünk meg. Az ee3_1 és ee3_2 expressziója lényegében azonos; ennek alapján e két találmány szerinti protein redundáns funkciója tételezhető fel.

Emberekben ee3_1-szekvenciák EST-i a következő szervekben mutathatók ki: agy, szem, csírasejtek, szív, vese, tüdő, placenta, prosztata, teljes embrió, mellékvese, emlő, vastagbél, gyomor, here. Ez viszonylag széles körű expressziót jelez. Az ee3_2-szekvenciák EST-i embereknél az agyban, vastagbélben, szívben, vesében, tüdőben, hasnyálmirigyben, mellékpajzsmirigyben, prosztatában, herében, méhben, húgyhólyagban, emlőben és bőrben mutathatók ki.

Az 5. ábrán a találmány szerinti humán ee3_1 különböző humán tumorsejtvonalakban

megfigyelhető expressziója northern-blot-analízisének eredményét mutatjuk be. A hibridizál-
tatást humán ee3_1 nyitott leolvasási fázisát tartalmazó egéredetű próba alkalmazásával
(Clontech) végeztük. A kísérlet eredményeként a találmány szerinti humán ee3_1 RNS-transz-
kriptum mindenütt jelenlévő expresszióját mutattuk ki.

5 A 6. ábrán az ee3_1 - patkányagy különböző területein megfigyelhető - expresszióját
szemléltetjük. Az agy különböző területein egyformán előforduló megoszlást találtunk; az ex-
presszió mértéke a kisagyban (cerebellum) és a gerincvelőben valamivel nagyobb mértékű
volt. Próbaként egéredetű ee3_1-et alkalmaztunk. Az alsó képen etidium-bromiddal festett
gél látható (terheléses kontroll).

10 A 7. ábrán ee3_1_m-protein topológiai modelljét mutatjuk be, amely a transzmemb-
rán-doméneket (TM) figyelembe vevő strukturális megfontolások alapján készült. A modell
jól mutatja a GPCR-proteinek topológiáját, amelyre hét transzmembrán-domén (az ábrán víz-
szintes vonalban egymás mellett feltüntetve), egy rövid extracelluláris N-terminális szakasz
(az ábrán az első transzmembrán-domén felett), és egy intracelluláris C-terminális szakasz (az
15 ábrán a 7. transzmembrán-domén alatt feltüntetve) jellemző. A hidrofób aminosavakat zöld
színnel jelöltük.

A 8. ábrán a találmány szerinti ee3_1-protein („humán pro”), ee3_2-protein és egy
ee3_5-proteinfragmens aminosav-szekvenciájának különböző, korábban azonosított GPCR-
proteinek (pl., dc32_bio, ccr5_human vagy dop21_human) és az „A”, „B” és „C” GPCR-csa-
20 ládra jellemző konszenzus-motívumok (cons_famA, cons_famB) aminosav-szekvenciájával
végzett összehasonlítását szemléltetjük. A „Pfam” jelentése: proteincsalád, és a proteinek cso-
portosításából eredő konszenzus-motívumok egy csoportját írja le. A felsorolt motívumok a
pfam-adatbázisokból származnak. A találmány szerinti ee3-proteinek egyértelműen az „A”
családba tartozó GPCR-proteinekkal mutatják a legnagyobb hasonlóságot. A humán ee3_1 és
25 ee3_2 következő szekvencia-részletei – korábban ismert GPCR-proteinekkal összehasonlítva -
különösen jellemzőek a találmány szerinti proteincsaládra (a 8. ábrán használt aminosav-szá-
mozást követve): 75-85. aminosavak; 129-135. aminosavak (különösen a 129. pozícióban lé-
vő glicin és a 132. pozícióban lévő szerin); a 174. pozícióban lévő glicin; 193-200. Aminosav-
vak (különösen a 198. pozícióban lévő glicin); a 260. és 261. aminosav; a 308. aminosav
30 (Cys); 334-340. aminosavak; 539. aminosav (His); 608. aminosav (His); 611. aminosav (Asp);
és végül, a teljes C-terminális szakasz, a 637. aminosavtól (különösen a 640. és 655. pozíciók
közötti savas kémhatású motívum, a 666. és 670. pozíciók közötti bázikus motívum, és a 680.
és 685. pozíciók közötti prolinban gazdag motívum).

A 9/A ábrán a találmány szerinti egéredetű ee3_c1 (ee3_1) DNS-szekvenciát (1. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, amely tartalmazza a transzlálódó régiót (valamennyi bemutatott szekvenciát balról jobbra, fentről lefelé, folyamatosan kell olvasni, vagyis az első sor vége után az alatta lévő sor eleje következik, balról). E szekvencia-régióban a start- és stop-kodont félkövér betűtípussal szedve jelöljük. A 9/B ábrán egy másik, találmány szerinti szekvenciát mutatunk be, amely a 9/A ábrán látható szekvencia egy al régiója (annak 3'-oldali nem transzlálódó régiójában).

A 10. ábrán a találmány szerinti egéredetű ee3_2 DNS-szekvenciát (2. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, amely szintén magában foglalja a transzlálódó régiót. E szekvencia-régióban a start- és stop-kodont félkövér betűtípussal szedve jelöljük.

A 11/A ábrán a találmány szerinti humán ee3_1 DNS-szekvenciát (3. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, amely szintén magában foglalja a transzlálódó régiót. E régióban a start-kodont (ATG) és a stop-kodont (TAG) félkövér betűtípussal szedve, a feltételezett poliadetilációs szignált félkövér betűtípussal és aláhúzással jelöljük. A 11/B és 11/C ábrán alternatív C-terminális „splice”-termékeket mutatunk be, amelyek C-terminálison lerövidített, találmány szerinti proteint kódolnak. A start- és stop-kodont mindkét ábrán félkövér betűtípussal szedve jelöljük, csakúgy, mint a 11/B ábrán a „splice”-hely konszenzus-szekvenciáját (AGGT).

A 12. ábrán a találmány szerinti humán ee3_2 DNS-szekvenciát (4. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, amely szintén magában foglalja a transzlálódó régiót. E régióban a start-kodont (ATG) és a stop-kodont (TAA) félkövér betűtípussal szedve, a feltételezett poliadetilációs szignált pedig félkövér betűtípussal és aláhúzással jelöljük. Az ábra alsó részén látható szekvencia az első szekvencia folytatása (a „gat” a két szekvencia közötti átfedést reprezentálja).

A 13. ábrán a találmány szerinti egéredetű ee3_1-aminosav-szekvenciát (5. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 9. ábrán).

A 14. ábrán a találmány szerinti egéredetű ee3_2-aminosav-szekvenciát (6. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 10. ábrán).

A 15/A ábrán a találmány szerinti humán ee3_1-aminosav-szekvenciát (7. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 11/A ábrán).

A 15/B ábrán a találmány szerinti humán ee3_1b_h-aminosav-szekvenciát (7/b azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 11/B ábrán).

5 A 15/C ábrán a találmány szerinti humán ee3_1c_h-aminosav-szekvenciát (7/c azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 11/C ábrán). A 15/B, illetve 15/C ábrán látható szekvenciák a 11/A ábrán bemutatott DNS-szekvencia alternatív „splicing”-ja eredményeként létrejött termékek.

10 A 16. ábrán a találmány szerinti humán ee3_2-aminosav-szekvenciát (8. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 12. ábrán).

A 17. ábrán a találmány szerinti humán ee3_5-cDNS-szekvenciát (10. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, amely magában foglalja a transzlálódó régiót is. E régióban a start-kodont (ATG) és a stop-kodont (TAA) félkövér betűtípussal szedve jelöltük. Feltüntetünk egy leolvasási fázison belüli stop-kodont is, amely a C-terminális fragmenstől 5'-irányban helyezkedik el (megakadályozva a leolvasási fázis 5'-irányú kiterjesztését). A cDNS-szekvencia 3'-vége nem teljes.

15

A 18. ábrán a találmány szerinti humán ee3_5-aminosav-szekvenciát (11. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, N-terminális → C-terminális irányban (DNS-szekvenciáját ld. a 19. ábrán).

20 A 19. ábrán az 5000 E/testtömeg-kilogramm dózisú eritropoietinnel intraperitoneálisan kezelt, majd 6 vagy 24 óra elteltével átmosott és vizsgált egerek agyában megfigyelhető ee3_1 kvantitatív PCR-analízisének eredményeit mutatjuk be. Az ábrán alkalmazott rövidítések jelentése a következő: si-6-1, si-24-1: sóoldattal beoltott állatokban 6, illetve 24 óra elteltével végzett vizsgálat eredménye;

25 ei-6-1, ei-6-2: EPO-val beoltott állatokban 6 óra elteltével végzett vizsgálat eredménye; ei-24-1, ei-24-2: EPO-val beoltott állatokban 24 óra elteltével végzett vizsgálat eredménye.

A vizsgálat eredményeként az ee3-RNS expressziójának növekedését mutattuk ki, amely az idő előrehaladásával fokozódott. Az EPO-val kezelt állatok adatai statisztikailag szignifikáns eltérést mutatnak a sóoldattal kezelt állatok eredményeitől (ANOVA, majd Newman-Keuls-féle „post hoc” teszt).

30

A 20. ábrán egéragy horizontális metszetén végzett in situ hibridizáció képe látható. Radioaktívan jelzett próba (ee3_1.3as: Aacgaagggccagtagcacagagaacagcagcagacagggcatagtagg) alkalmazásával az ee3_1 expresszióját a következő agyterületeken tudtuk láthatóvá

tenni: cerebellum (ce), hippocampus (hc), fogazott gyrus (dg) és cortex (co), közelebből, entorhinalis cortex (ent) és bulbus olfactorius (olf). Megfelelő szensz kontroll (ee3_1.3s: cctcatctat gcctgtctgctgtgttctgtgctactggcccttcgtt) alkalmazásával specifikus jelet nem kaptunk (ábrát nem mutatunk be).

5 A 21. ábrán humán ee3_1-protein elleni C-terminális poliklonális antiszérum előállítását szemléltetjük. 21/A: a protein C-terminális részén kiválasztottunk egy nagy antigénhatású peptidepitópot (CLHHEDNEETEETPVPEP). A 21/B ábrán az ee3_1 - ideiglenesen transzfektált HEK293-sejtekben végzett - specifikus detektálására alkalmazott „immunblot”-analízis eredménye látható. Mindegyik esetben az Exp.ee3-1-h-Nter-myc-konstrukcióval (amely N-terminálison fuzionált myc-jelölőt tartalmazó ee3_1-protein termelődését eredményezi) transzfektált HEK293-sejtek lizátumának azonos mennyiségét alkalmaztuk. 1. sáv: N-terminális myc-jelölőt tartalmazó ee3_1-protein detektálása myc-specifikus antitesttel [Upstate Biotechnology (Biomol Feinchemikalien GmbH); 1:2000 hígításban]. 2-8. sávok: az ee3_1-protein detektálása az ee3_1-specifikus AS4163-antiszérum különböző (1:500 – 1:12000) hígításai-
10 val. Az antiszérummal nagy érzékenységgel, specifikusan detektálható az ee3_1-specifikus csík (kb. 35 kD). 9. sáv: a megfelelő pre-immun szérum (PIS) 1:500 hígításával nem detektáltunk csíkot.

A 22. ábrán az ee3_1 AS4163-antiszérummal különböző szövetekben végzett immunhisztokémiai detektálását szemléltetjük. 22/A: a szomatoszenzoros cortex V. rétegében lévő
20 neuronok specifikus festődése; 22/B: az „A” kép nagyítása; 22/C: neuronok az entorhinalis cortexben; 22/D: az ee3_1 expressziója a fogazott gyrusban és a CA3 hippocampus régióban; 22/F: az ee3_1-expresszió CA3 és CA2 közötti határa a hippocampusban; 22/G: cerebellum, specifikus immunhisztokémiai festődés a Purkinje-sejtes rétegben és a kisagyi magvakban; 22/H: Purkinje-sejtek a cerebellumban; 22/I: bulbus olfactorius; 22/J: nagyítás, nagy mitralis
25 sejtek; 22/K: retina, ganglionok és a retina érzékelősejtjeinek festődése; 22/L: a „K” kép nagyítása, a retina érzékelősejtjeinek festődése; 22/M: az ee3_1 expressziója a gerincvelő elülső szarvának nagy motoneuronjaiban; 22/N: az ee3_1 expressziója a trigeminalis mag motoros magjában; 22/O: a substantia nigra (pars reticulata) festődése; 22/P: a „Q” kép nagyítása, substantia nigra; 22/Q: az ee3_1 idegsejten kívüli expressziója a tüdőben (festődés a hörgőcs-
30 kék bazális sejtjeiben, az arteriolákban – a venulákban nincs festődés); 22/R: a jellemző pulmonaris próbák (bronchus, arteria és véna) reprezentálása; 22/S: a hörgőcskék nagyítása (expresszió a részletesen nem definiált, specifikus bazális sejtekben); 22/T: az arteriola falát (balra fent) és a hörgőcske falát (jobbra lent) ábrázoló nagyítás; 22/U: egy arteriola hosszanti met-

szete (az endothelium és az érfalban lévő símaizomsejtek festődése); 22/V: arteriola-kereszt-
metszet (símaizomsejtek és endothelsejtek immunhisztokémiai festődése); 22/W: vékonybél
cryptákkal és villusokkal (a bazális crypta festődése ee3_1 elleni antitesttel; a villusokban ve-
getatív idegek festődése); 22/X: a „W” kép nagyítása; 22/Y: idegrostok a vékonybél falában,
5 melyek a vékonybél vegetatív izomzati idegfonatához tartoznak; 22/Z: perifériás ideg kereszt-
metszeti képe bőr alatti zsír/kötőszövetben; 22/AA: szívizom specifikusan festődött idegrost-
okkal; 22/BB: harántcsikolt izom (vázizom) – a kép közepén az immunhisztokémiai festődés
jó egyezést mutat a motoros véglemezzel (jobbra lent: perifériás idegrostok a perimysiumban).

A 23. ábrán az ee3_1 vad típusú egér gerincvelőjében (felső kép), illetve eritropoietint
10 transzgenikusan túlzott mértékben expresszáló egér gerincvelőjében detektált immunhisztoké-
miai festődését hasonlítjuk össze. Azonos festési feltételek mellett a transzgenikus egérben
egyértelműen erősebb jelet detektáltunk (ezt minden esetben két további egérrel elvégzett kí-
sérlettel is igazoltuk).

A 24. ábrán az ee3_1- és map1b-protein egerekben kimutatott kettős immunfluoresz-
15 cenciáját szemléltetjük. Ezt a két proteint y2h-rendszerben kölcsönhatási partnerekként detek-
táltuk. A két protein központi idegrendszeri elhelyezkedése meglepő mértéknek felelt meg;
zöld: ee3_1 festődés; piros: Map1b festődés; sárga: a két jel elektronikus szuperpozíciója. Az
ábrán gerincvelőből (sc) és cerebellumból (cb) származó példák láthatók.

A 25. ábrán map1b-génre nézve mutáns [Meixner és mtsai.: J. Cell. Biol. 151, 1169
20 (2000)] egér agyszöveteinek immunhisztokémiai festését szemléltetjük. A map1b-homozigóta
ko-állatokban az ee3_1 csak nyomokban mutatható ki. A: hippocampus; B: cortex; C: cerebel-
lum.

A 26. ábrán az ee3_1 kifejlett patkány hippocampusából származó idegrendszeri összej-
tekben (nsc) végzett PCR-analízisének eredményét mutatjuk be. A negatív kontroll sávban (N)
25 nem detektáltunk jelet. Az idegrendszeri összejtekben kimutatható volt az ee3_1-expresszió.

A 27. ábrán különböző fajokból származó ee3-proteinek aminosav-szekvenciájának
összehasonlítását szemléltetjük (X. laevis-ből és D. rerio-ból származó szekvenciák figyelem-
be vételével).

A találmányt a továbbiakban kísérleti példák bemutatásán keresztül szemléltetjük.

1. példa

ee3-1-m és homológjai azonosítása és molekuláris klónozása

(a) ee3-1-m azonosítása

Eritropoietint túlzott mértékben expresszázó transzgenikus egerek agyát transzkardiális perfúziót és sokkot követően, altatásban eltávolítottuk, majd folyékony nitrogénben tároltuk. RNS-t Chomczynski és Sacchi módszerével [Anal. Biochem. 162, 156 (1987)] izoláltunk. A hibridizációs kísérleteket (két transzgenikus egér és két azonos alomból származó kontroll egér bevonásával) egér-cDNS-mátrixon (chipen), az Incyte eljárása szerint hajtottuk végre (ld. <http://www.incyte.com/reagents/lifearray/lifearrayservice.s/html>). Ennek során két – eltérően jelölt (Cy5 és Cy3) – minta alkalmazásával kompetitív hibridizációt végeztünk. A hibridizációs kísérlet eredményeként számos serkentő szabályozás alatt álló szekvenciát kaptunk. Azonosítottunk egy EST-klónt (AA185432), amely egy megismételt kísérletben EPO-transzgenikus egerekben szintén serkentő szabályozás alatt állt. A relatív indukciós faktor – az azonos alomból származó, nem transzgenikus egerekhez viszonyítva - $+3,9 \pm 0,1$ volt (ld. az 1. ábrát). Ezt a serkentő szabályozást LightCycler-rendszer alkalmazásával végzett kvantitatív PCR-analízissel igazoltuk (2. ábra: 5'-láncindító: 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3'; 3'-láncindító: 5'-ATACCAGCAGAGC CTGGAGA-3').

15 (b) ee3-szekvenciák klónozása

Az azonosított EST-szekvenciát EST-adatbázisokban BLASTN-kereséssel hosszabbítottuk meg, és azonosítottunk egy másik homológ egérereditű szekvenciát (ee3_2_m) is. Megfelelő programok (BLAST, TBLASTN) alkalmazásával végzett homológiai-szkrínélésekkel EST- és genomi adatbázisokban (ensembl) humán homológokat tudtunk azonosítani.

20 A kapott szekvenciákat egérereditű és humán szekvencia-adatbázisok – Shepard PCR-klónozási eljárásával [ld. Shepard és Rae: Nucleic Acids Res. 25, 3183 (1997), mely hivatkozást (a benne említett forrásokkal együtt) teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni] végzett – szkrínelésével ellenőriztük. Shepard eljárása plazmidkönyvtárból származó cDNS-molekulák biotinnal kapcsolt oligonukleotid-szekvenciához történő hibridizáltatásán alapul, majd a plazmidokat sztreptavidinnel kapcsolt mágneses gyöngyökkel kivonjuk, az

25 eredményt diagnosztikai PCR-ral ellenőrizzük, és e lépéseket – a kisselektált plazmid újra-transzformálása után – kétszer ismétljük, míg különálló klónokat nem kapunk. A következő láncindító-kombinációkat alkalmaztuk.

(1) A teljes hosszúságú génszakasz klónozására alkalmazott oligonukleotidok az egyes ee3-szekvenciák esetében:

30

ee3_1-h:

- ee3_1-5'biotin1-hs: AATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCT
 - ee3_1-3'block1-hs: GCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATC
 - ee3_1-5'block1-hs: ATGAACCTGAGGGGCCCTCTTCCAGGACTTCAACCCGAGTA
 - ee3_1-1s-hs: TGCTCCAATATGGCTGTGGA
 5 - ee3_1-1as-hs: CTCTAGTGACCTGTCATGTC
 - ee3_1-2s-h: GACAGAGCTTAAGTGGACTG
 - ee3_1-2as-h: TACAGTTCCTACTGACTGCC
 - ee3_1-5'block2-h: ACGCACTCTCTCCGCCTTCCTCTGCCCCCTCGTTCACCCC
 - ee3_1-5'biotin2-h: GCAGACCAGAACCAGTACTGGAGCT
 - ee3_1-3'block2-h: GGGTCTCCAGGTACGTCCATCTCATGCCTTGTTTGCATCC

ee3_1-m:

10 - ee3_1-5'biotin1-m: ATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCTG
 - ee3_1-3'block1-m: CTGTTCTCTGTGCTACTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATCA
 - ee3_1-5'block1-m: TGAACCTGAGGGGCCCTCTTTCAGGACTTCAACCCGAGTAA
 - ee3_1-1s-m: GGATGGCATCATTCAATGGAG
 - ee3_1-1as-m: GAACAATGGCATGAAGACCAG
 - ee3_1-2s-m: ACTGAGCTGGATGACCATTGT
 - ee3_1-2as-m: TCCTCACTATCTTCATGGTGG
 - ee3_1-5'biotin2-m: TCATCACCCAGAGCCCTGGCAAGTA
 15 - ee3_1-5'block2-m: CCTAAAATTGCACCTATGTTCCGCAAGAAGGCCAGGGTAG
 - ee3_1-3'block2-m: TGTCTTCTCCACCCAACTAAATATTGAAATGCCAGAC

ee3_2_h:

- ee3_c2-1as-h: TGAAGTGCAGGATGTTGACC
 - ee3_c2-1s-h: TCATCCAATGGAGCTACTGG
 20 - ee3_c2-5'block1-h: ATGAACCCAGGGGCCCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTA
 - ee3_c2-5'biotin1-h: AGTTTCTCATCTACACCTGCCTGCT
 - ee3_c2-3'block1-h: GCTCTTCTCGGTGCTGCTGCCCCTCCGCCTGGACGGCATC

ee3_2-m:

- ee3_c2-3'block1-m: ACTCTTCTCCGTGCTGCTGCCCCTGCGCCTGGACGGCATC
 - ee3_c2-5'biotin1-m: AGTTCCTCATTTATGCCTGCTTGCT
 - ee3_c2-1as-m: TGGATAATCCTGTCCAGCCT
 25 - ee3_c2-1s-m: ATCATCCAGTGGAGCTACTG
 - ee3_c2-5'block1-m: ATGAACCCAGGGGCCCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTA
 - ee3_c2-m-2s: TGTGGAAGCTCCTGGTCATCGT
 - ee3_c2-m-2as: GATAATCCTGTCCAGCCTCAGG
 - ee3_c2-5'block2-m: GAAGCTCCTGGTCATCGTGGGCGCCTCGGTGGGTGCGGGC
 - ee3_c2-5'biotin2-m: GTGTGGGCCCCGCAACCCACGCTACC
 - ee3_c2-3'block2-m: GTACAGAGGGGGAAGCCTGCGTGGAATTCAAAGCCATGCT
 - ee3_c2-5'biotin3-m: ACAGAGCCCTGGGAAATATGTGCCT
 30 - ee3_c2-3'block3-m: CCACCTCCCAAGTTAAACATTGATATGCCAGACTAAACTC
 - ee3_c2-5'block3-m: TTGCTCCAATGTTTGGAAAGAAGGCGCGGGTAGTTATAAC

ee3_c3-h:

- ee3_c3-5'block1-h: CCACCTTGGGCACCTTGGTGTCTTTCAAAGTGCCAGGCT
 - ee3_c3-5'biotin1-h: CCTTCCTGCCTCAGGGCCTTTGCAC
 - ee3_c3-3'block1-h: TTGCTGCTCCCTCCGTTTGAATACTGTATCCCAGAGAGT
 - ee3_c3-1s-h: GGCACCTTGGTGTCTTTCAA
 - ee3_c3-1as-h: CAGTCTGAATTAGGAGCCAG

ee3_c5-h:

- ee3_c5-1as-h: TCGGAGCTTCTGGAACCAAT
 - ee3_c5-1s-h: CCATCAGCTGGATAACGACT
 - ee3_c5-5'block1-h: ACCATGGCCATCAGCTGGATAACGACTGTCATCGTGCCCC
 - ee3_c5-5'biotin1-h: TGCTCACCTTTGAAGTCCTGCTGGT
 - ee3_c5-3'block1-h: TCACAGACTGGATGGCCGCAATACATTCTCCTGTATCTCC

ee3_c8-h:

- ee3_c8-5'block1-h: AATTTTGGTATATGGTGCAAAAAAAGGGGTCCAATTTCTT
 - ee3_c8-5'biotin1-h: CTGCAACTGGCCAGCCAGTTATCTC
 - ee3_c8-3'block1-h: AGCATCATTAAATTGAATAGGGAATCCTTACCCCACTGATT
 - ee3_c8-1s-h: AACTGGCCAGCCAGTTATCT
 - ee3_c8-1as-h: AATGGATTGTTGGGTGCAGC
 - ee3_c8-2s-h: CCAGCCAGTTATCTCAGCATCA
 - ee3_c8-2as-h: ACCATGGCATGTGTATCCCAGA

(2) A funkcionális analízisek elvégzéséhez az ee3-szekvenciák kódolórégióit GATEWAY™.

kompatibilis vektorokba klónoztuk. Ennek során az egyes ee3-szekvenciák esetében a követ-
 kező oligonukleotidokat alkalmaztuk:

ee3_1-h:

- ee3_1_h_B1:
 GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
 TACCATGAACCTGAGGGGCCTCTTCCA

- ee3_1_h_B2:
 GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
 CTAATCTGGCATTTCGATATTTAATTTGGGAGGT

- ee3_1-h-C-fus-B2:
 GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
 GCATTTCGATATTTAATTTGGGAGGTGGGAG

ee3_2-h:

- ee3_c2-h-B1:
 GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCTACC
 ATGAACCCCAGGGGCCTGTTCC

- ee3_c2-h-B2:
 GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
 TTAATCTGGCATATCAATATTTAACTTGGGAGGG

- ee3_c2-h-c-fus-B2:
 GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
 ATCTGGCATATCAATATTTAACTTGGGAGGG

ee3_c2-m:

- ee3_c2-m-B1:

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TCTACCATGAACCCAGGGGCTGTTCC

5 - ee3_c2-m-B2:

GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
TTAGTCTGGCATATCAATGTTTAACTTGGGAG

(c) Humán cDNS-könyvtár előállítás

Humán magzati agyi mRNS (Clontech, Heidelberg, Németország) 2 µg-jából és kifej-
lett egér agyából származó mRNS 5 µg-jából kiindulva, cDNS-szintetizáló reagenskészlet
10 (Stratagene, Amsterdam, Hollandia) alkalmazásával megfelelő cDNS-könyvtárakat hoztunk
létre. Az eljárást lényegében a gyártó útmutatásai szerint végeztük. Az első szál cDNS-t a
gyártó előírásai szerint, oligodT-láncindító alkalmazásával szintetizáltuk. A klónozáshoz meg-
felelő (EcoRI/XhoI), kettős szálú cDNS-fragmenseket méret szerint szelektáltuk (a gyártó út-
mutatása szerint), és pBluescript-SKII-plazmidvektorba (Stratagene) ligáltuk. A ligálást E. co-
15 li sejtek (DH10B, Gibco) elektroporációjával hajtottuk végre, majd LB-ampicillin agarlemeze-
ken amplifikáltuk. A plazmid-DNS-t lúgos lízissel és ioncserélő kromatográfiával („QIAfil-
ter” reagenskészlet; Qiagen, Hilden, Németország) izoláltuk. A humán magzati agy cDNS-
bankban az önálló klónok komplexitása négymillió volt. Mindegyik cDNS-bankból 24, vélet-
lenszerűen kiválasztott önálló klónt analizáltunk, és 800 bp-tól 4,5 kb-ig terjedő méret szerinti
20 eloszlást mutattunk ki (a humán cDNS-bankban a cDNS-inszertek átlagos hosszúsága hozzá-
vetőleg 1,2 kb volt).

2. példa

Az ee3-1 eritropoietin általi szabályozása

25 Az ee3_1-et EPO-transzgenikus egerek (tg6- és tg21-vonal) agyában serkentő szabá-
lyozás alatt álló géntermékként azonosítottuk.

A kísérleteinkre alkalmazott egereket – konstitúciójuk vonatkozásában - korábban
több alkalommal vizsgálták [ld. Ruschitzka és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11609
(2000); Wagner és mtsai.: Blood 97, 536 (2001); Wiessner és mtsai.: J. Cereb. Blood Flow
30 Metab. 21, 857 (2001)]. Az egereket transzgén-konstrukció alkalmazásával, a Hergersberg ál-
tal leírt eljárással hoztuk létre [Hergersberg és mtsai.: Hum. Mol. Genet. 4, 359-366]. Ez a
konstrukció PDGF-promótert és eritropoietint kódoló szekvenciát tartalmaz. Kísérletünkben a
létrehozott több transzgenikus egérvonal közül a tg6-ot és a tg21-et vizsgáltuk. Csak a tg6-vo-

nalban figyeltük meg az EPO-expresszió szisztémás fokozódását, amit a Ruschitzka és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11609 (2000)] által leírt eljárással végzett szérumtesztek alkalmazásával igazoltunk. A tg21-vonalban nem mutattunk ki megnövekedett szisztémás EPO-koncentrációt. Sasahara és mtsai. [Cell 64, 217 (1991)] eredményeivel összhangban, az általunk alkalmazott PDGF-promóter feltehetően a transzgenikus EPO expresszióját eredményezi (elsősorban az idegsejtekben).

A tg6-vonalba tartozó egerekben a megnövekedett szisztémás EPO-expresszió az eritropoiesis határozott fokozódását eredményezi, ami poliglobulizmushoz vezet (hematokrit egészen 0,8 értékig) és a vértérfogatot egyértelmű növekedését okozza (4,0 mL-ig) [Wagner és mtsai.: Blood 97, 536 (2001)]. Ezzel szemben, a tg21-vonalba tartozó egerekben fenotípusos változások nem voltak szembetűnők.

Az RNS-termékek (például, az ee3_1-gén RNS-terméke) expressziója az eritropoietint transzgenikusan túlzott mértékben expresszáló egerek (tg6- és tg21-vonal) agyában fokozódott [Ruschitzka és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11609 (2000); Wagner és mtsai.: Blood 97, 536 (2001); Wiessner és mtsai.: J. Cereb. Blood Flow Metab. 21, 857 (2001)]. Ezeket az RNS-termékeket DNS-mátrix analízissel azonosítottuk. Az EE3_1 túlzott EPO-expresszió általi transzkripció szabályozásának fiziológiai és patofiziológiai jelentőségét egy másik szabályozó géntermék, nevezetesen az alfa-globin felismerése igazolta, amelyről – mikromátrix alkalmazásával végzett transzkripció analízissel - kimutattuk, hogy mindkét vizsgált transzgenikus vonalban szabályozás alatt áll. Ezt LightCycler-rendszer alkalmazásával igazoltuk (ld. a 2. ábrát). Az expresszió fokozódása különösen a hippocampus területein volt látható (in situ hibridizáció).

3. példa

A találmány szerinti szekvenciák expresszáltatása emlőseredetű sejtekben; stabil sejtvonalak létrehozása

Az ee3-családba tartozó gének nyitott leolvasási fázisát pcDNA-sorozatba tartozó szokványos eukarióta expressziós vektorba (Clontech, Heidelberg, Németország) klónoztuk. Az így előállított expressziós plazmidokkal, kalcium-foszfátos eljárás alkalmazásával, humán embrionális vesesejteket (HEK293); lipofektamin alkalmazásával CHO-sejteket és CHO-dhfr-sejteket; DEAE-dextrán gyöngyök alkalmazásával pedig COS-sejteket transzformáltunk. A transzformánsokat 400-500 mg/mL G418 alkalmazásával szelektáltuk. A szelekció után három héttel a táptalajról különálló klónokat vettünk le, melyeket további vizsgálat céljára sza-

porítottunk. Northern-blot és western-blot analízissel hozzávetőleg harminc klónt vizsgáltunk. A transzfektált CHO-dhfr- sejteket nukleotidmentes tápközegben szelektáltuk. A szelektálás elősegítése érdekében az ee3-családba tartozó gének nyitott leolvasási fázisát (szelekciós markerként dihidrofolát reduktáz gént tartalmazó) eukarióta expressziós vektorba klónoztuk, és a transzfekciót ezzel az expressziós plazmiddal végeztük. Az így transzfektált CHO-dhfr- sejtek (de az ilyen módon transzfektált egyéb sejtek is) metotrexát egyre nagyobb koncentrációival kezelhetők, így is kezeltük őket, miáltal olyan sejteket szelektáltunk, amelyek a dihidrofolát reduktázt (s ezáltal a receptort is) fokozott mennyiségben termelték.

4. példa

Az ee3-1-protein C-terminális fragmensének alkalmazásával kéthibrides élesztőrendszerben végzett kísérlet

A találmány szerinti protein potenciális kölcsönhatási partnereinek kéthibrides élesztőrendszerben történő azonosítása céljából a találmány szerinti ee3_1-protein C-terminális fragmensét kódoló nukleinsav-szekvenciát pGBKT7 „csali”-vektorba (Clontech) klónoztuk.

Az alkalmazott aminosav-szekvencia a következő volt:

**KGGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHHEDNEETEETPVPEPPKIAPMFRK
KARVVITQSPGKYVLPKLNIEPDP,**

Az ennek megfelelő nukleinsav-szekvencia:

**AAGGGAGGAAACCACTGGTGGTTTGGTATCCGCAAAGATTTCTGTCAGTTTCTGCTTGAA
ATCTTCCCATTTCTACGAGAATATGGAAACATTTCTTATGATCTCCATCACGAAGATAAT
GAAGAAACCGAAGAGACCCAGTTCCGGAGCCCCCTAAAATCGCACCCATGTTTCGAAAG
AAGGCCAGGGTGGTCATTACCCAGAGCCCTGGGAAGTATGTGCTCCACCTCCCAAATTA
AATATCGAAATGCCAGAT**

A kölcsönhatási partnerek azonosítása érdekében humán agyi könyvtár - szakember számára jól ismert, standard módszerekkel [párosítási („mating”) eljárások; Clontech] – szkíneltünk, melynek eredményeként két – átfedő szekvenciákat tartalmazó - klónt (11-es és 36-os klón) azonosítottunk.

A 11-es klónban azonosított szekvencia a következő volt:

**GGGGACTCGGCCCTGAACGAGCAGGAGAAGGAGTTGCAGCGGCGGCTGAAGCGTCTNTAC
CCGGCCGTGGACNAACAAGAGACGCCGTTGCCTCGGTCCTGGAGCCCGAAGGACAAGTTC
AGCNTACATCGGCCTNTNTNAGAACAACCTGCGGGTGCCTACAAAGGTCATGGCAAAAC
CCCAAAGATGCCGCGTCAGTTCGAGCCACGCATCCAATACCAGCAGCCTGTGGGATTTA
TTATTTTGAAGTAAAAATTGTCAGTAAGGAAGAGATGGTTNCATGGGAATTGGTCTTTC**

(a) Homológ szekvenciák az 5q33.1-kromoszómán

Az AC11406.00015-ös kontigon, TBLASTN-program alkalmazásával meghatároztunk egy másik homológ szekvenciát is:

AC011406.00015

Hosszúság: 40 820

5 HSP negatív szálak

Pontszám: 389 (136,9 bit); várt: 1,3e-41; összeg P(3): 1,3e-41; azonos aminosavak: 72/303 (71 %); pozitív találatok: 78/303 (77 %); fázis: -1

Query: 224 LLTFEILLVHKLDGHNAFSCIPFVPLWLSLITLMATTFGQKGNHWWFGIRKDFCQFLL 283
 LLTFE+LLVH+LDG N FSCI I VPLWL L+TLM TTF K GNHWWFGIR+DFCQFLL
 Sbjct: 14312 LLTFEVLVHRLDGRNTFSCISISVPLWLLLLLTMTTTFRPKRGNHWWFGIARDFCQFLL 14253

10 Query: 284 EIFFFLREYGNISYDLHHEDNXXXXXXXXXXXXXKIAPMFRK 324
 EIFFFLREYGNISYDLH ED+ KIAP+F K
 Sbjct: 14252 EIFFFLREYGNISYDLHQEDSEGAETLVPEAPKIAPVFGK 14010

„Query” = Vonatkoztatási

„Sbjct” = Vizsgált

15 Pontszám: 86 (30,3 bit); várt: 1,3e-41; összeg P(3): 1,3e-41; azonos aminosavak: 15/51 (88 %); pozitív találatok: 16/51 (94 %); fázis: -3

Vonatkoztatási: 334 PGKYVLPPPKLNIEMPD 350

PGKYV PPPKLNI+MPD

Vizsgált: 13992 PGKYVLPPPKLNIEMPD 13942

20 Pontszám: 67 (23,6 bit); várt: 1,3e-41; összeg P(3): 1,3e-41; azonos aminosavak: 12/57 (63 %); pozitív találatok: 17/57 (89 %); fázis: -2

Vonatkoztatási: 206 QRRTHITMALSWMT-IVVP 223

Q RTH+TMA+SW+T ++VP

25 Vizsgált: 14368 QRRTHITMALSWMT-IVVP 14312

A megfelelő cDNS-hez hozzájutottunk, azonban a transzláció csak egy – ee3-proteinekkel homológ – C-terminális fragmenst eredményezett.

Az ee3_1_m szekvenciájával végzett összehasonlítás eredménye a következő volt:

30 Az ALIGN-program a két szekvencia teljes összehasonlítását végzi [2.0uPlease verzió, ld. Myers és Miller: CABIOS 4, 11 (1989)].

1. szekvencia (350 aminosav) vs. 2. szekvencia (148 aminosav).

Pontozómátrix: BLOSUM50; hézag-hibapontok: -12/-2;

```
Query: 2499   AGGTTTAGACCTTAAATAATACCTGATTGTGGCCACTTCTGGTTAAGGCCACTCTCTC 2440
             | |||||
Sbjct: 13048  AAGTTTAGACCTTAAATAATACCTGATTGTGGCCACTTCTGGTTAAGGCCACTCTCTC 13107

Query: 2439   CAGCTTTCAGTGACAGGTAATGCTTTACATTACAACCACTAATATTCTAAGATTCTTA 2380
             |||||||
Sbjct: 13108  CAGCTTTCAGTGACAGGTAATGCTTTACATTACAACCACTAATATTCTAAGATTCTTA 13167

Query: 2379   GAAATGGACAAACCAC TTGTGCTTATTTGATTGTTTCTGGACAGTTACTACCTGTGTG 2320
             |||||||
Sbjct: 13168  GAAATGGACAAACCAC TTGTGCTTATTTGATTGTTTCTGGACAGTTACTACCTGTGTG 13227
```

Query: 2319 GAAAAATTCAGGGTGCTAAACAACAGTGTCACTTTATGGCCTGGTACTACACTAGAGCAT 2260
|||||
Sbjct: 13228 GAAAAATTCAGGGTGCTAAACAACAGTGTCACTTTATGGCCTGGTACTACACTAGAGCAT 13287

Query: 2259 GTCACAAGTTCGCAAGGGCGGTGGCTGCTCCCTCTACTAAOGGATACTACCAGAGACCTT 2200
|||||
Sbjct: 13288 GTCACAAGTTCGCAAGGGCGGTGGCTGCTCCCTCTACTAAOGGATACTACCAGAGACCTT 13347

5 Query: 2199 CACACAGTGCAGACCTCGGTTACTAACACCTAAATATTAACACCCATGGGATTTCAGTC 2140
|||||
Sbjct: 13348 CACACAGTGCAGACCTCGGTTACTAACACCTAAATATTAACACCCATGGGATTTCAGTC 13407

Query: 2139 CCTATGTTTCATGTCTAGTACTTGGGTAAGCTCCACACCAGGCACATATTGTTTTATGCAA 2080
|||||
Sbjct: 13408 CCTATGTTTCATGTCTAGTACTTGGGTAAGCTCCACACCAGGCACATATTGTTTTATGCAA 13467

Query: 2079 TCTTTAAAGACATCTGCAATAGACAATATGCAGTTTAAACAACTGTGAGGTTTATAAAC 2020
|||||
10 Sbjct: 13468 TCTTTAAAGACATCTGCAATAGACAATATGCAGTTTAAACAACTGTGAGGTTTATAAAC 13527

Query: 2019 AGAGAATTCTTTACGTTTGCTATTATGTCATAACAGGCACAATCTGAAATACAATTTTGT 1960
|||||
Sbjct: 13528 AGAGAATTCTTTACGTTTGCTATTATGTCATAACAGGCACAATCTGAAATACAATTTTGT 13587

Query: 1959 ACTAGCAGTGTATAAAAATACTTTTAAACGATACTTTTCGATAGGTACAGTAGCACTTTAA 1900
|||||
Sbjct: 13588 ACTAGCAGTGTATAAAAATACTTTTAAACGATACTTTTCGATAGGTACAGTAGCACTTTAA 13647

Query: 1899 AGAAAACCACTGTGTAGTTATTCTTTTGAGGACCTACTAAAACAGTTCAACTTACTGCC 1840
|||||
15 Sbjct: 13648 AGAAAACCACTGTGTAGTTATTCTTTTGAGGACCTACTAAAACAGTTCAACTTACTGCC 13707

Query: 1839 CCCAGCTACATCTAAAGCACGAATGTGGAAAGCAAGTTCTCTTACCCAGGTACACACCAC 1780
|||||
Sbjct: 13708 CCCAGCTACATCTAAAGCACGAATGTGGAAAGCAAGTTCTCTTACCCAGGTACACACCAC 13767

Query: 1779 ACACACCCACATGCTGAAACAGTCTCCATTATGATGCATGCTGATGAGGCATCAATCTC 1720
|||||
Sbjct: 13768 ACACACCCACATGCTGAAACAGTCTCCATTATGATGCATGCTGATGAGGCATCAATCTC 13827

Query: 1719 AAACAGGGTATGAGATGACAGTGTGTTGGTGCTGTTTCCATTTCAGGTTTGGTATGAAT 1660
|||||
20 Sbjct: 13828 AAACAGGGTATGAGATGACAGTGTGTTGGTGCTGTTTCCATTTCAGGTTTGGTATGAAT 13887

Query: 1659 GAACAAGAGGCAAAGGCAAGGTGGAGTCTGTGTATGGGCCCTCTCTAGGAGTTTAACTCTG 1600
|||||
Sbjct: 13888 GAACAAGAGGCAAAGGCAAGGTGGAGTCTGTGTATGGGCCCTCTCTAGGAGTTTAACTCTG 13947

Query: 1599 GCATATCAATATTTAACTTGGGAGGTGGGGGAACATATTTCCAGGGATTAAACTACCT 1540
|||||
25 Sbjct: 13948 GCATATCAATATTTAACTTGGGAGGTGGGGGAACATATTTCCAGGGATTAAACTACCT 14007

Query: 1539 GGTCTTCCCAAACACTGGAGCAATTTTCGGAGCTTCTGGAACCAATGTTTCTTCAGCACC 1480
|||||
Sbjct: 14008 GGTCTTCCCAAACACTGGAGCAATTTTCGGAGCTTCTGGAACCAATGTTTCTTCAGCACC 14067

Query: 1479 TTCGCTATCTTCTGATGGAGATCATATGAAATGTTCCCATATTCTCTTAAAAATGGGAA 1420
|||||
Sbjct: 14068 TTCGCTATCTTCTGATGGAGATCATATGAAATGTTCCCATATTCTCTTAAAAATGGGAA 14127

30 Query: 1419 AATTTCAAGCAGAACTGGCAGAAGTCTCTGCGAATACCAAACCACCAATGATTGCCCT 1360
|||||
Sbjct: 14128 AATTTCAAGCAGAACTGGCAGAAGTCTCTGCGAATACCAAACCACCAATGATTGCCCT 14187


```

Query: 1359 TTTTGGCCTAAATGTTGTGGTCATTAAAGTTAGTAACAAAAGCCAAAGGGGGACAGATAT 1300
          |||
Sbjct: 14188 TTTTGGCCTAAATGTTGTGGTCATTAAAGTTAGTAACAAAAGCCAAAGGGGGACAGATAT 14247

Query: 1299 GGAGATACAGGAGAATGTATTGCGGCCATCCAGTCTGTGAACCAGCAGGACTTCAAAGGT 1240
          |||
Sbjct: 14248 GGAGATACAGGAGAATGTATTGCGGCCATCCAGTCTGTGAACCAGCAGGACTTCAAAGGT 14307

5 Query: 1239 GAGCAGGGCAGATGACAGTCGTTATCCAGCTGATGGCCATGGTCACGTGTGTTCTTCAC 1180
          |||
Sbjct: 14308 GAGCAGGGCAGATGACAGTCGTTATCCAGCTGATGGCCATGGTCACGTGTGTTCTTCAC 14367

Query: 1179 TGCCCTGGTAGTTCTCATTGTTCTTTTCTAGTTTCTTAAGGTAGAAGCTGATGTCATT 1120
          |||
Sbjct: 14368 TGCCCTGGTAGTTCTCATTGTTCTTTTCTAGTTTCTTAAGGTAGAAGCTGATGTCATT 14427

Query: 1119 GATTCAAAACCTTTCTT 1103
          |||
10 Sbjct: 14428 GATTCAAAACCTTTCTT 14444

```

„Query” = Vonatkoztatási

„Sbjct” = Vizsgált

(b) Homológ szekvencia a 8q11.22-kromoszómán

15 Az Ac034174-es Ensembl-kontigon azonosítottunk egy további homológ szekvenciát.

A homológ nukleotidszekvencia-fragmensnek megfelelő aminosav-szekvencia a következő:

```

20 AATTTTGGTATATGGTGCAAAAAAGGGGTCCAATTCTTCTGCAACTGGCCAGCCAGTTATCTCAGCATCATTAATTGA
   ATAGGGAATCCTTACCCCACTGATTGTTTTGTGTCAGGTTTGTCAAAGATGAAATAGTTGTAGGTGTATGGTCTTATTTCT
   GGGTTCCCACTTCTGTTCCACTGGTATATGTGCTGGTTTGAAGTGTGCTGCTGTTTGGTTACTATAGCCCTGTT
   TAAATCAATGGAGTGATGCCGCCACGTGTATTTATTTTATTTTATTATTAAGTTCTGGGATACACATGCC
   ATGGTGGTTTGCTGCACCCAACATCCATTATCTATGTTGTTTTCTC

```

(c) Homológ szekvencia a 3p25.3-kromoszómán

A 3. kromoszómán a következő homológ szekvenciát azonosítottuk:

```

CCACCTTGGGCACCTTGGTGTCTTTCAAAGTGCCAGGCTCCTTCTGCTCAGGGCCTTTCAGCTTGCTGCTCCCTCCG
TTTGAAATACTGTATCCAGAGAGTCCCATTTCTGGCTCCTAATTCAGACTGA

```

(d) Homológ szekvencia az Xp21.1-kromoszómán

25 AC027722.00010

Hosszúság: 3 576

HSP negatív szálak

Pontszám: 65 (22,9 bit); várt: 4,1e+02; összeg P(2): 1,0; azonos aminosavak: 11/90 (37 %);

pozitív találatok: 19/90 (63 %); fázis: -1

30 Vonatkoztatási: 159 RLDKIIHWPWL VVCVPLWI-LMSFLCLVVL 187

R+ ++W L C+P+W+ +SF CL+ L

Vizsgált: 1848 RIMSSLNWDSLTSCLPIWMTFISFSLIAL 1759

Pontszám: 57 (20,1 bit); várt: 4,1e+02; összeg P(2): 1,0; azonos aminosavak: 16/147 (33 %); pozitív találatok: 24/147 (49 %); fázis: -2

88 VGIHLLLLMFEVLVCDRIERG-SH-FWLLVFMPLFFVSPVSVAACVWGF 134

+G L++ F V D++ G H F W L +PLF VS C ++

5 2507 IGCCFLIVCFVCFVEDQMYVGLQHYFWALYSVPLFCVSVFVPVPCSFSY2361

Az e homológ szakaszoknak megfelelő nukleotidszekvenciák a következők:

ATCATGTCATCTCTAAACTGGGATAGTTTGACTTCCTGCTTCCTATTTGGATGACTTTTATTTCTTTCTCTTGCCTGAT
TGCTCTGG

és

10 ATAGGGTGTGTGTTTCTCATTGTTTGTGTTTGTCTGCTTTGTGGAAGATCAGATGTATGTAGGTTTGCAGCATTATTTCTG
GGCTCTCTATTCTGTTCTTTGTTCTGTGTGTCTGTGTTTGTACAGTACCATGTTCTTTTAGTTACT

Mindazonáltal, e szekvenciákból hiányzik a DRI konszenzus-szekvencia.

(d) Alternatív „splice”-termékek (ee3-1b-h és ee3-1c-h)

Az ee3_1_h humán géntermék alternatív „splicing” eredményeként létrejött változatát (ee3_1b_h; 3/b azonosítószámú szekvencia) azonosítottuk (ld. a 11/B ábrát). Ez a termék a 3.
15 exonban lévő konszenzus „splice”-donor helyből ered, és módosított C-terminálist és korábbi
transzlációs stop-kodont tartalmazó módosított nyitott leolvasási fázist eredményez. E módo-
sított nyitott leolvasási fázis 166 aminosavas, 192 kD molekulatömegű proteint kódol, amely a
negyedik transzmembrán-domén után végződik (ld. a 15/B ábrát; 7/b azonosítószámú szek-
vencia). Azonosítottunk egy másik alternatív „splice”-terméket is (ee3_1c_h; 3/c azonosító-
20 számú szekvencia; 11/C ábra). Az általa kódolt protein aminosav-szekvenciája (7/c azonosító-
számú szekvencia; 15/C ábra) a második transzmembrán-domén után van hasítva. Ezeket a
„splice”-termékeket a Shepard és mtsai. által leírt eljárással végzett klónozás és szekvenálás
(ld. az 1. példát) során azonosítottuk.

Az ee3_1b_h transzmembrán-régióinak megjölését a következők szerint végeztük:

25 ----> Rendkívül előnyös modell: N-terminális kívül

4 erős transzmembrán hélix, össz-pontszám: 6315

Sorszám	Kezdő pozíció	Befejező pozíció	Hosszúság	Pontszám	Orientáció*
1.	15.	33.	19	2066	k-b
2.	40.	56.	17	1143	b-k
3.	83.	102.	20	1765	k-b
4.	112.	134.	23	1341	b-k

* b: belül; k: kívül

Ez a „splice”-termék funkcionálisan fontos szerepet játszik a teljes hosszúságú recep-

torok működésének szabályozásában. Vö., például, a V2 vazopresszin-receptorral [Zhu és Wess: Biochemistry 37, 15773 (1998); Schulz és mtsai.: J. Biol. Chem. 275, 2381 (2000)]. Mivel a GPCR-proteinek homo- vagy heterodimerizáción mehetnek keresztül [Bouvier: Nat. Rev. Neurosci. 2, 274 (2001)], a találmány szerinti szekvenciák ilyen lerövidült alakjai domináns negatív szerepet játszhatnak.

Ennek megfelelően, a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak a találmány szerinti ee3-proteinek „splice”-alakjainak (például, csupasz DNS-ként, találmány szerinti expressziós vektorba foglalt DNS-ként, találmány szerinti proteinszekvenciaként vagy hasonlóként), illetve azok változatainak fentebb leírt rendellenességek kezelésére szolgáló hatóanyagok előállítására történő alkalmazása. Ezenfelül, a találmány igényelt oltalmi körébe tartozik e „splice”-alakok találmány szerinti, ee3-családba tartozó receptorok farmakológiai befolyásolhatóságának vizsgálatára történő alkalmazása is.

6. példa

Az ee3-családba tartozó proteinek topológiai adatai

A TMPred-program alkalmazásával végzett TM (transzmembrán)-szkrínelés eredményeként a következő, rendkívül előnyös modellt kaptuk:

(a) ee3-1

----> Rendkívül előnyös modell: N-terminális kívül

7 erős transzmembrán hélix, össz-pontszám: 11 863

#	Kezdő poz.	Bef. poz.	Hossz	Pontszám	Orientáció	
1.	15.	33.	19	2066	k-b	FLIYACLLLFVLLALRLD
2.	40.	56.	17	1143	b-k	YWAVFAPIWLWKLMVIV
3.	83.	102.	20	1765	k-b	AMLIAVGIHLLLLMFVLC
4.	112.	134.	23	1341	b-k	WLLVFMPLFFVSPVSVAACVWGF
5.	168.	191.	24	2978	k-b	WLVVCVPLWILMSFLCLVLYIV
6.	211.	227.	17	1070	b-k	ITMALSWMTIVVPLLTF
7.	240.	258.	19	1500	k-b	AFSCIPIFVPLWLSLITLM

A transzmembrán-domének közötti szegmensek, sorrendben, 15, 7, 27, 10, 34, 20, illetve 13 aminosavasak, az intracelluláris szegmens pedig 92 aminosav hosszúságú.

(b) Az ee3-2-re azonos képet kaptunk:

----> Rendkívül előnyös modell: N-terminális kívül

7 erős transzmembrán hélix, össz-pontszám: 12351

Sorszám	Kezdő pozíció	Befejező pozíció	Hosszúság	Pontszám	Orientáció
1.	15.	36.	22	1811	k-b
2.	32.	50.	19	1219	b-k
3.	83	102	20	1765	k-b
4.	112.	134.	23	1341	b-k
5.	168.	191.	24	3068	k-b
6.	211.	227.	17	1239	b-k
7.	243.	260.	18	1951	k-b

A transzmembrán-domének közötti szegmensek, sorrendben, 15, 0, 33, 10, 34, 20, illetve 16 aminosavasak, az intracelluláris szegmens pedig 90 aminosav hosszúságú.

(c) Az összehasonlításra alkalmazott kontroll kísérlet az ismert CCR-5-receptor (amely szintén a 7TM-receptorok osztályába tartozik) topológiájának meghatározása:

Sorszám	Kezdő pozíció	Befejező pozíció	Hosszúság	Pontszám	Orientáció
1.	51.	76	26	2895	k-b
2.	89.	108.	20	1155	b-k
3.	124.	145.	22	1163	k-b
4.	163.	187.	25	1415	b-k
5.	220.	239.	20	2183	k-b
6.	260.	281.	22	1782	b-k
7.	298.	325.	28	1325	k-b

5 A transzmembrán-domének közötti szegmensek, sorrendben, 51, 13, 16, 18, 33, 21, illetve 17 aminosavasak, az intracelluláris szegmens pedig 46 aminosav hosszúságú.

A távoli rokon 7TM-receptorok (bradikinin-2, CXCR5, galanin-receptor-2 és anafilotaxin-C5a) általános topológiájának (az egyes transzmembrán-doménekben lévő aminosavak, vagyis az N-terminálist, a C-terminálist és a hurkokat alkotó aminosavak számának) találmány szerinti ee3_1-proteinre meghatározott topológiával történő összehasonlításával a következő eredményeket kaptuk:

10

Receptor	N-term.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Maradék
C5a	39	12	14	22	28	16	20	45
BK-2	63	13	14	20	27	26	24	56
Galanin2	28	10	17	19	24	25	1	105
cxcr-5	55	11	14	21	30	18	23	46

mw	43,3	11,7	15,0	20,3	26,3	22,3	15,0	63,0
ee3_1	15	7	27	10	34	20	13	92

E proteinek általános topológiája egyértelműen hasonló.

7. példa

Az ee3-1 motívumainak és szignálszekvenciáinak

meghatározása

A Prosite-program alkalmazásával a következő eredményeket kaptuk:

Egyező mintázat: PS00001 ASN_glikoziláció

294. aminosav: NISY

Összes egyezés: 1

10 Egyező mintázat: PS00006 CK2_foszforilációs_hely

77. aminosav: TCVE

Összes egyezés: 1

Egyező mintázat: PS00008 Mirisztin

57. aminosav: GASVGT

15 263. aminosav: GQKGGN

Összes egyezés: 2

Ilyenformán, a 77. pozícióban CK2 foszforilációs hely, a 294. pozícióban aszparagin glikozilációs hely, az 57., illetve 263. pozíciókban pedig egy-egy mirisztinációs hely található (a 7. ábra szerinti folytonos számozás szerint). A C-terminálison tipikus foszforilációs helyet
20 nem találtunk.

9. példa

Az ee3 indukálása eritropoietin egyszeri beadásával

Ahogy a 19. ábrán látható, az ee3_1 expresszióját patkányokban – transzkripció szinten – eritropoietin (Erypo; Janssen; 5000 E/testtömeg-kilogramm) egyetlen intraperitoneálisan
25 beadott injekciójával indukáltuk. Az injekció beadása után 6, illetve 24 órával a patkányokat Rompun/Ketanest injektálásával véglegesen elaltattuk, és agyukat óvatosan eltávolítottuk. A kontroll patkányokat sóoldattal kezeltük. A patkányokban az ee3_1-mRNS mennyiségét LightCycler (Roche, Mannheim, Németország) alkalmazásával végzett félkvantitatív reverz
30 transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) mértük. A mennyiségi meghatározáshoz a minta relatív fluoreszcenciáját ciklofilin standard görbéjével hasonlítottuk össze.

Patkány-előagyból (a kisagy és a bulbus olfactorius nélkül), Chomczynski/Sacchi eljárásával (savas fenolos extrakcióval) össz-RNS-t izoláltunk, majd az izolált RNS-t „RNeasy” extrakciós reagenskészlet (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) alkalmazásával, a gyártó útmutatásai szerint tisztítottuk. Az RNS koncentrációját fotometrikus módszerrel határoztuk meg, és az össz-RNS kvalitatív analízisét agarózgél-elektroforézissel végeztük. Az RNS-t felhasználásig -80°C -on tároltuk.

Az RNS – Superscript-II (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával végzett – reverz transzkripciója után a reakciótermékeket valós idejű „online” polimeráz-láncreakcióval, LightCycler-technológiával relatív kvantitatív analízisnek vetettük alá. Erre a célra három vad típusú egér agyából és három transzgenikus tg6-egér agyából származó össz-RNS-mintákat alkalmaztunk. A ciklofilinhez alkalmazott láncindító oligonukleotidok szekvenciái a következők voltak:

5'-láncindító: 5'-ACCCACCGTGTCTTCGAC-3'

3'-láncindító: 5'-CATTTGCCATGGACAAGATG-3'

(hibridizációs hőmérséklet: 60°C).

A patkányeredetű ee3_1-hez a következő láncindító-oligonukleotidokat alkalmaztuk:

5'-láncindító: 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3'

3'-láncindító: 5'-ATACCAGCAGAGCCTGGAGA-3'.

A mennyiségi analízishez a cDNS sorozathígításait (1:3, 1:9, 1:27, 1:81 és 1:243) a következő séma szerint amplifikáltuk: kezdeti denaturálás 94°C -on 5 percre, majd amplifikáció 50 cikluson keresztül [ciklusonként 94°C -on 5 másodperces denaturálás, 55 vagy 60°C -on (az adott láncindítótól függően) 10 másodperces hibridizáció; és 72°C -on 30 másodperces lánchosszabbítás]. Az egyes minták fluoreszcenciáját minden ciklus végén 80°C -on 10 másodpercig mértük. A reakciótermék specifikitását agarózgél-elektroforézissel és olvadáspont-görbe analízissel bizonyítottuk (ábrát nem közlünk). Mindegyik PCR-reakció pontosan egy reakcióterméket eredményezett.

A mennyiségi meghatározásra a PCR-reakció logaritmikus fázisát alkalmaztuk (a megfelelő görbéhez érintőt fektetve). A hemoglobin esetében eredményként gyakorlatilag párhuzamosan hajló vonalakat kaptunk, így a görbék meredekségét felhasználhattuk a ciklofilinre kapott standard görbékkel történő összehasonlításra. A normalizált PCR-termék minden egyes cDNS-hígítására átlag $\pm$ szórás értékeket állapítottunk meg. Az így kapott kvantitatív különbségek az RNS-expresszió (transzgenikus és vad típusú állatok közötti) relatív különbségének

feleltek meg. Valamennyi reakció egyetlen reakcióterméket eredményezett. Az ee3-ra az átlagos indukciós faktor hat óra elteltével 1,35-szeres, 24 óra elteltével pedig 1,44-szeres volt.

9. példa

5 Az ee3-1-RNS megoszlása az agyban

Egerekben az ee3_1-transzkriptum lokalizációját – radioaktívan jelölt oligonukleotid-próba alkalmazásával végzett – in situ hibridizációval tanulmányoztuk. A vizsgálat céljára – 20 °C-on, kriosztáttal 15 µm vastagságú agymetszeteket készítettünk, melyeket poli-L-lizinnel bevont tárgylemezekre helyeztük és foszfátpufferelt sóoldatban (PBS, pH=7,4) 4 % paraformaldehiddel fixáltuk. Az oligonukleotidot – terminális transzferáz (Roche Diagnostics, Mannheim) alkalmazásával - a-35S-dATP-vel jelöltük. A jelölést, illetve az azt követő hibridizációt Wisden és Morris eljárása [„In situ-Hybridization Protocols for the brain”, Academic Press (1994)] szerint végeztük.

15 Az radioaktívan jelölt ee3_1.3as-próba (Aacgaagggccca gtagcacagagaacagcagcagacagcagcatagatgagg) alkalmazásával az ee3_1 expresszióját a következő agyterületeken tudtuk láthatóvá tenni (ld. a 20. ábrát): cerebellum (ce), hippocampus (hc), fogazott gyrus (dg) és cortex (co), elsősorban az entorhinal cortex (ent) és bulbus olfactorius (olf A megfelelő szensz kontroll (ee3_1.3s: cctcatctatgc ctgtctgctgctgttctctgtgctactggcccttcgtt) alkalmazásával specifikus jelet nem kaptunk (ábrát nem mutatunk be).

20

10. példa

Az egerekben megfigyelt ee3-1-eloszlás immunhisztokémiai kimutatása

Paraffinba ágyazott szövetből 2 µm vastag metszeteket készítettünk, azokat előkezelt tárgylemezekre (DAKO; Glostrup, Dánia) helyeztük, levegőn egy éjszakán át szárítottuk, majd paraffinmentesítettük (xilol és csökkenő rendű alkoholok alkalmazásával). Citrátpufferben 10 percig 500 W mikrohullámú kezelést követően a metszeteket párásított kamrában, szobahőmérsékleten egy óra hosszat 1:500 hígítású anti-ee3_1 szérummal (AS4163) inkubáltuk. Az immunreakciót ABC-technikával, kromogénként DAB alkalmazásával, a gyártó (DAKO, Glostrup, Dánia) útmutatása szerint tettük láthatóvá. Negatív kontrollokként azonos módon, de elsődleges antitest nélkül kezelt metszeteket, illetve olyan metszeteket alkalmaztunk, amelyek esetében az elsődleges antitest helyett a megfelelő, immunizálás előtti szérumot alkalmaztuk.

30

Az immunhisztokémiai festődési vizsgálat eredményeit a 22. ábrán mutatjuk be. Ösz-

szességében, az ee3 lényegében neuron-specifikus lokalizációját mutattuk ki (néhány struktúrától eltekintve a bélben és a tüdőben). Az ee3 a koordináló funkciójú neuronokban (az V. agykérgi réteg nagy piramissejtjeiben, a bulbus olfactorius mitralis sejtjeiben és a cerebellum Purkinje-sejtjeiben) nagy gyakorisággal expresszálódik. A 22. ábra „A”-„C” képein az ee3 V. agykérgi rétegben megfigyelhető lokalizációja látható (a neuronális projekciók pontosan kivehető festődésével). Az entorhinalis cortexben intenzívebb festődés látható (C). Fiziológiai szempontból, az információ az entorhinalis cortexből a hippocampusba áramlik, ami elősegíti a tanulást és a memóriát.

Az entorhinalis cortex módosulása gyakran megfigyelhető a stroke-ban és Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél, illetve fej- és agysérülést követően. Az entorhinalis cortex rendellenességei viselkedési változásokat okozhatnak, melyek az érzékelés elégtelen feldolgozásában és tanulási nehézségekben nyilvánulnak meg [Davis és mtsai.: Nurs. Res. 50(2), 77 (2001)]. A 22/D-22/F ábrákon az ee3 hippocampusban megfigyelhető eloszlását szemléltetjük. Ezeken a képeken szembevetendő a CA3-szektorban tapasztalható expresszió és a CA2- és CA1-szektorban az expresszió hiánya közötti éles határ. A CA1-régióban – és, bár kisebb mértékben, a CA4-régióban – lévő a neuronok különösen fogékonyak a nekrozis- és gyulladás-mentes fiziológiai sejthalálra (apoptózisra), különösen létező általános központi idegrendszeri károsodás esetén [ld. pl., Hara és mtsai.: Stroke 31, 236 (2000)]. Ezzel szemben, úgy tűnik, a fogazott gyrusra inkább a nekrotikus károsodás van hatással. A fogazott gyrus kóros stimulust követően a de novo neuronképződéssel áll összefüggésben [Takagi és mtsai.: Brain Res. 831, 283 (1999); Parent és mtsai.: J. Neurosci 17, 3727 (1997)]. Az ee3 a nem neocortex-eredetű területeken is megtalálható; így a cerebellum Purkinje-sejtjeiben (G, H), melyek koordináló neuronokként funkcionálnak, és a bulbus olfactorius mitralis sejtjeiben (I, J). Az ee3 intenzív expresszálódása mutatható ki a retina ganglionjaiban és érzékelősejtjeiben (K, L).

Az utóbbi években beszámoltak az eritropoietin retinában kifejtett neuroprotektív hatásáról [ld. Junk és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(16), 10659 (2002); Grimm és mtsai.: Nat. Med. 8(7), 718 (2002)]. Ezek a felismerések az EPO-indukció és az ee3-expresszió között összefüggést engednek sejtetni. A EE3 szintén nagymértékű expressziót mutat a motoros rendszerbe tartozó neuronokban. Ilyenformán, specifikus expresszió mutatható ki a gerincvelőben, az elülső szarv nagy motoneuronjaiban (ld. 22/M ábra), illetve a trigeminalis mag motoros magjának funkcionálisan egyenértékű neuronjaiban (22/N ábra).

Az ee3 gerincvelőben tapasztalható eloszlása nagy valószínűséggel felhasználható az amiotróp laterális szklerózis diagnosztizálásában és terápiájában. Az amiotróp laterális szkler-

rózis (ALS; Lou Gehrig betegség v. Charcot betegség) olyan neurodegeneratív rendellenesség, amelynek évi előfordulási gyakorisága 100 000 főre számítva 0,4 és 1,76 közötti (Adams és mtsai.: „Principles of Neurology”, 6. kiadás, New York, 1090-1095. old.). Ez a motoneuronos rendellenességek leggyakoribb formája, amelyre olyan tipikus manifesztációk jellemzők, mint a generalizált izomrángások, a vázizomrendszer progresszív atrófiája és gyengesége, izomme-
 5 revség és pozitív piramidális pályai tünetek, artikulációs zavar (dysarthria), nyelési zavar (dysphagia) és nehézlégzés (dyspnoea). A betegség patológiai háttere főként a gerincvelő elülső szarvában és az agytörzs motoros magvaiban az idegsejtek fogyása, de érintheti az agykéreg elsőrendű motoneuronjait is. E betegség patogenezise jórészt ismeretlen, bár a vizsgált
 10 családi öröklődési esetekben a szuperoxid dizmutáz mutációinak szerepét részletesen feltárták. Napjainkig a SOD1-protein több, mint 90 olyan mutációját írták le, melyek ALS-t okozhatnak [ld. Cleveland és Rothstein: Nat. Rev. Neurosci. 2, 806 (2001)]. Úgy tűnik, ebben a betegségben a neurofilamentumok is szerepet játszanak. Egy másik patogenetikus faktor az excitotoxicitás (amely glutamát-felesleg által kiváltott mechanizmus), amely emberekben a riluzol
 15 hatásával bizonyítható. A kaspázok és az apoptózis aktiválása együttesen az ALS patogenezisének további módjának tűnik [Ishigaki és mtsai.: J. Neurochem. 82, 576 (2002); Li és mtsai.: Science 288, 335 (2000)]. Az ee3-protein lokalizációja az ALS-sel érintett neuronokon egyértelműen azt jelzi, hogy e betegség esetében az ee3-agonisták és -antagonisták funkcionális/diagnosztikai téren alkalmasak lehetnek.

20 Az ee3 középagy substantia nigra területén megfigyelt lokalizációja (22/O és 22/P ábra) a Parkinson-kór terápiás és diagnosztikai lehetőségeire mutathat rá. A Parkinson-kór a leggyakoribb mozgás-rendellenesség, amely Észak-Amerikában hozzávetőleg egymillió embert érint (a 65 év feletti népesség kb. 1 %-a szenved ebben a betegségben). A Parkinson-kór fő tünete a merevség, a remegés és a mozgásképtelenség (akinesia) (Adams és mtsai.: „Principles
 25 of Neurology”, 6. kiadás, New York, 1090-1095. old.). E betegség oka ismeretlen, azonban poszt-mortem szövetek és állatmodellek vizsgálatai a substantia nigrában oxidatív stressz progresszív folyamatát jelzik, ami dopaminerg neurodegenerációt tarthat fenn. Állatmodellekben a neurodegeneráció folyamatának tanulmányozására - neurotoxinokkal [például, 6-hidroxidopaminnal és N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel (MPTP) kiváltható - oxidatív
 30 stresszt alkalmaznak. Bár a Parkinson-kór esetében létezik tüneti kezelés [például, L-DOPA és dekarboxiláz inhibitor alkalmazása; dopamin-agonistaként brómokriptin és pergolid alkalmazása, valamint antikolinerg anyagok, pl., trihexifenidil (artane) alkalmazása], egyértelműen szükség van olyan kauzális (azaz neuroprotektív) kezelésre, amely képes a kóros folyamat

leállítására. A betegség patogenezisében apoptózis mechanizmusok szerepe egyértelműen bizonyított [állatmodellben és emberekben egyaránt; ld. Mochizuki és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10918 (2001); Xu és mtsai.: Nat. Med. 8, 600 (2002); Viswanath és mtsai.: J. Neurosci. 21, 9518 (2001); Hartmann és mtsai.: Neurology 58, 308 (2002)].

5 Az ee3 idegrendszeri lokalizációja nagyon jelentős bizonyítékát képezi e protein expressziója és az idegsejtek sejthalála, neurogenézise és sejtplaszticitása közötti összefüggésre.

A tüdőben az ee3 jól körülírható struktúrákban található (ld. a 22/Q-22/V ábrákat). Az ee3-at expresszáló bazális sejtek a terminális hörgőcskékben találhatók, és feltehetően olyan sejtek, amelyek neuroendokrin aktivitással bírnak. Ez a lokalizáció arra utal, hogy az ee3 terá-
 10 piás jelentőségű a hörgők betegségiben. Az ee3 expresszióját az arteriolák endotheliumában és símaizomsejtjeiben is kimutattuk (22/U és 22/V ábra), azonban a venulákban immunhisztokémiaileg detektálható ee3-expressziót nem regisztráltunk (22/Q és 22/R ábra). Az endothelsejtek bizonyos receptorainak nagy gyógyászati jelentősége van, mivel a vérben a ha-
 15 tóanyagok közvetlenül ezzel a sejtréteggel érintkeznek. A hatásukat a keringésben kifejtő hatóanyagok az arteriolákra, konkrétan az endotheliumra vagy a símaizom-rendszerre fejtik ki hatásukat, így az ee3 a keringési rendellenességek (például, artériás hipertenzió) kezelésének vonzó célproteinje.

A bélben az ee3 elsősorban a bélbolyhok közötti redőkben (22/W és 22/X ábra) és a – feltehetően a bélplexushoz tartozó – idegsejtekben (22/Y ábra) található meg. A legtöbb szö-
 20 vettanilag vizsgált szervben a szervspecifikus sejtek esetében nem detektáltunk specifikus festődést, hanem számos esetben az idegek elkülönülő festődése volt jellemző [mint például, a szívizomban (22/AA ábra) vagy a kötőszövetben (22/Z ábra)]. Az ee3 axonokon kimutatható egyértelmű lokalizációja arra utal, hogy e molekula hasznos a perifériás idegek rendellenességeinek (neuropátiák, mint például, a cukorbetegséggel összefüggő, széles körű polineuropátia)
 25 diagnosztizálására és gyógykezelésére. Hasonlóan, az ee3 a perifériás idegrendszer gyakori genetikai rendellenességei - mint például, a HMSN-csoportba (öröklött szenzomotoros neuropátiák) tartozó rendellenességek - esetében szintén hasznos lehet.

Végül, a vázizmokban is kimutattuk az ee3 expresszióját, ami legnagyobb valószínű-
 30 séggel a motoros véglemezekkel hozható összefüggésbe (22/BB ábra). Ez potenciálisan a motoros véglemezzel kapcsolatos rendellenességek (például, myasthenia gravis) esetén jelentős.

11. példa

Az ee3 proteinszinten megfigyelhető serkentő szabályozása eritropoietint túlzott mértékben

expresszáló egerekben

Az „AS 4163” antiszérum alkalmazásával végzett immunhisztokémiai vizsgálattal kimutattuk, hogy az eritropoietin egyértelműen serkenti az ee3-protein termelődését (ld. a 23. ábrát). A párhuzamosan kezelt központi idegrendszeri metszetekben az ee3-termelődésre jól látható, megnövekedett intenzitású jeleket kaptunk. Ezt mindegyik esetben összesen három egérmél mutattuk ki (vad típusú és EPO-t túlzott mértékben expresszáló tg6). A metszeteket a genotípus vonatkozásában „vak” vizsgálat keretében festettük és értékeltük.

12. példa

10 Az ee3 és map1b együttes lokalizációja és az ee3-expresszió hiánya map1b-deficiens egerekben

A Map1a és Map1b könnyű láncait kéthibrides élesztőrendszerben - az ee3_1 C-terminálisával végzett szkríneléssel – egymással kölcsönhatásba lépő proteinekként azonosítottuk (ld. a 4. példát). A 24. ábrán az ee3_1 és map1b egerekben végzett kettős immunfluoreszcens analízisének eredményét mutatjuk be. Az eredmények az ee3_1 és a map1b termelődésének váratlan átfedését jelzik.

A kettős immunfluoreszcens festés céljából paraffinmentesített metszeteket – tíz perces mikrohullámos kezelést (500 W, citrátpuffer) követően – nyúl eredetű anti-ee3_1 antitest (AS4163) és map1a elleni kecskeeredetű antitest [MAP-1B (C20): sc-8971; Santa Cruz, USA) egyidejű jelenlétében, párasított kamrában, szobahőmérsékleten egy óra hosszat inkubáltuk. Megfelelő mosási lépések után a metszeteket FITC-vel jelölt anti-nyúl és TRITC-vel jelölt anti-kecske másodlagos antitestekkel 30 percig inkubáltuk (mindkét antitest foszfátpufferelt sóoldatban készített 1:30 hígításával; Dianova, Hamburg, Németország). Ezt követően a metszeteket foszfátpufferelt sóoldattal ismét leöblítettük, a készítményeket „Histosafe”-fel lefedtük és – megfelelő filterek alkalmazásával - fluoreszcencia-mikroszkóppal (Olympus IX81, Olympus, Németország) analizáltuk. A jelek egymásra rétegzését „Analysis” szoftver (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Németország) segítségével végeztük. A párhuzamosan végzett, egyszeres fluoreszcenciájú festéseknél, a másik csatornában mindegyik esetben kimutattuk egy jel hiányát, kizárva ezáltal annak lehetőségét, hogy a jelek a mindenkor másik csatornába „sugározódjanak át” (például, nem megfelelő filterek alkalmazása miatt). Ha a másodlagos antitestek kromofórijait felcseréltük, a kettős festés ugyanazt a képet eredményezte (ábrát nem közlünk).

A 24. ábrán a két protein központi idegrendszeri elhelyezkedésének meglepő együttes

lokalizációját szemléltetjük: zöld: ee3_1 festődés; piros: Map1b festődés; sárga: a két jel elektronikus szuperpozíciója. Az ábrán gerincvelőből (sc) és cerebellumból (cb) származó példák láthatók.

A Map1b egy fontos idegrendszeri protein, amely a mikrotubulus-asszociált proteinek (map-ok) egyik első képviselője, amely az emlősök központi idegrendszerének kifejlődése során termelődik. Valószínű, hogy szerepet játszik a neuronok axonogenezisében [Gonzalez-Billault és mtsai.: Mol. Biol. Cell 12, 2087 (2001); Gonzalez-Billault és mtsai.: Brain Res. 943, 56 (2002)]. A map1b neuronok kölcsönhatásában betöltött, funkcionális szempontból fontos szerepét a legutóbbi években mutatták ki: a map1b szerepet játszik a fragilis X-szindróma patogenezisében, amely a szellemi elmaradottság leggyakoribb öröklött alakja. A map1b-mRNS-t az FMRP-protein szabályozza, mely protein közvetlenül a fragilis X-mRNS szabályozása alatt áll. Drosophila-ban végzett vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a map1b (Drosophila-ban hiányzik) központi szerepet játszik a fragilis X-analóg fenotípus megnyilvánulásában [Sohn: Science 294, 1809 (2001); Zhang és mtsai.: Cell 107, 591 (2001)]. A map1b kötődik a gigaxonin-proteinhez is, amelynek mutáns génje felelős az óriásaxonos neuropátia (GAN) néven ismert recesszív genetikai betegségért [Ding és mtsai.: J. Cell. Biol. 158, 427 (2002)]. A perifériás idegen elváltozása után a map1b a mielinhüvelyes idegek kinövő neuronjaiban egyre nagyobb mértékben indukálódik, s feltehetően szerepet játszik az axonok sarjadásában [Soares és mtsai.: Eur. J. Neurosci. 16, 593 (2002)]. Végül, a map1b a GABA-C-receptort valószínűleg szinaptikus helyszínén lokalizálja [Pattnaik és mtsai.: J. Neurosci. 20, 6789 (2000)].

A map1b-gént egerekben genetikailag inaktiválták („knockout”). A rendelkezésre álló legjobb „knockout”-egerek a Meixner és mtsai. által leírtak [Meixner és mtsai.: J. Cell. Biol. 151, 1169 (2000)]. A map1b-génre nézve homozigóta inaktív egerekben immunhisztokémiai vizsgálattal tanulmányoztuk az ee3 expresszióját. Az ee3_1 festődése (nagymértékben csökkent, ami az jelzi, hogy az ee3_1-protein termelődése vagy stabilitása nagymértékben függ a map1b-vel megvalósuló kölcsönhatástól. Ilyenformán, ezen interakció inhibitora jelentős mértékben csökkent ee3-expressziót eredményezhet.

30 13. példa

ee3-1-protein kimutatására alkalmas antiszérum előállítása

A humán ee3_1-protein aminosav-szekvenciáját a „DNASar” programcsomag (Lasergene) részét képező „Protean” program alkalmazásával vizsgáltuk. Az antiszérum létrehozásá-

ra - másodlagos jóslás, illetve megjósolt felületi valószínűség és nagy antigenitás alapján az intracelluláris C-terminális szakaszon elhelyezkedő, 299-315. aminosavaknak megfelelő epitópot (LHHEDNEETEETPVPEP) választottuk ki. Ezt a peptidszekvenciát – N-terminális végéhez kapcsolt ciszteinnel együtt (CLHHEDNEETEETPVPEP) szintetizáltuk, ami a elősegíti a hordozóproteinként alkalmazott KLH-hoz („keyhole limpet” hemocianin) történő, kontrollált specifikus kapcsolást. A peptid-KLH-komjugátummal – optimalizált séma szerint – két nyulat immunizáltunk. A peptidszintézist, a szintetizált peptid KLH-hoz történő kapcsolását, valamint a két nyúl immunizálását a BioTrend Chemikalien GmbH-től rendeltük meg. Az első immunizálás előtt több nyúl ún. pre-immun szérumát – ál-transzfektált sejtek és agyi extraktumok western-blot analízisével - keresztreaktivitásukra teszteltük. Az immunizálásra két, jelentéktelen háttér-reakciót adó nyulat választottunk ki, melyeknek az első immunizálás után három héttel első emlékeztetőoltást, majd újabb négy hét elteltével második emlékeztetőoltást adtunk. Egy héttel ezután a nyulaktól 20 mL vért vettünk, s a szérumot western-blot-analízissel és átmenetileg transzfektált sejtek (HEK293, CHO-dhfr-) immuncitokémiai festésével teszteltük. A harmadik vagy negyedik emlékeztetőoltást követően a nyulakat kivéreztettük.

Mindkét nyúl széruma pozitívnak bizonyult. Közelebbről, az AS4163-antiszérum mindkét eljárás során nagyon specifikusan ismerte fel a különböző sejtekben átmenetileg expresszáltatott humán ee3_1-proteint, és western-blot-analízisben egészen 1:12000-es hígításig alkalmazható volt. Az AS4163-antiszérum az ee3_1-protein immunprecipitálására is alkalmasnak bizonyult, így felhasználható az ee3_1-protein és az ee3_1-proteinnel kölcsönhatásba lépő proteinek transzfektált sejtekben vagy natív szövetben történő precipitálására. Az AS4163-antiszérum felismeri az egéredetű ee3_1-szekvenciában lévő, megfelelő epitópot, amely csak egy aminosavban (nevezetesen az N304→szerin mutációban) tér el a humán szekvenciától. Ennek megfelelően, az AS4163-antiszérum nagyon alkalmas az ee3_1-protein termelődésének vad típusú, transzgenikus és „knockout” egerekben történő immunhisztokémiai vizsgálatára (ld. a 22-24. ábrákat).

14. példa

Az ee3-1 expressziója idegrendszeri őssejtekben

4-6 hetes hím Wistar-patkányok hippocampusából, korábbi leírás szerint [Ray és mtsai. (1993)], idegrendszeri őssejteket izoláltunk. Az vizsgálati eljárások összhangban vannak a német törvényekkel. Az állatokat 1 % izoflurán, 70 % N₂O és 29 % oxigén összetételű gázkeverék belélegeztetésével elaltattuk és dekapitulálással leöltük. Az állatok agyát 50 mL –

4,5 g/L glükózzal kiegészített - jéghideg Dulbecco-féle foszfátpufferelt sóoldatban (DPBS/Glc) preparáltuk és mostuk. A hippocampust hat állatból preparáltuk, 10 mL DPBS/Glc-oldatban mostuk, majd 4 °C-on 1600 x g-vel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a szövetet ollóval és szikével homogenizáltuk, majd a szövetdarabokat
 5 DPBS/Glc-oldattal mostuk, 800 x g-vel 5 percig centrifugáltuk, és az üledéket – 0,1 vegyes% dipáz-II-t (neutrális proteáz), 0,01 vegyes% DNáz-I-et és 12,4 mM mangánáz-szulfátot tartalmazó – Hank-féle egyensúlyi sóoldatban (HBSS) újraszuszpendáltuk. A szövetet pipettahegyek alkalmazásával trituráltuk és szobahőmérsékleten (az oldatot 10 percenként megkeverve) 40 percig inkubáltuk. A szuszpenziót ezután 4 °C-on öt percig 800 x g-vel centrifugáltuk, majd
 10 az üledéket – 2 mM L-glutamint, 100 egység/mL penicillint és 100 egység/mL sztreptomicint tartalmazó – 10 mL DMEM-Ham's F-12-tápközegben háromszor mostuk. A sejteket ezután 1 mL – B27-et (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutamint, 100 egység/mL penicillint és 100 egység/mL sztreptomicint, 20 ng/mL EGF-et, 20 ng/mL FGF-2-t és 2 µg/mL heparint tartalmazó – neurobazális tápközegben újraszuszpendáltuk. A sejteket ezután steril feltételek
 15 mellett hatüregű tálcákra szélesztettük (25000-100000 sejt/mL). A tálcákat 5 % szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában 37 °C-on inkubáltuk. A sejtenyészítő tápközeget hetente egyszer – a tápközeg kb. 2/3-ának cseréjével – frissítettük [Ray és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3602 (1993)].

A fagyasztott állományból felolvasztott, hippocampus-eredetű összejteket három hétig
 20 tenyésztettük, majd standard eljárásokkal, „RNeasy” reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből szokványos módszerekkel – oligodT-láncindítók és Superscript-II reverz transzkriptáz (Gibco) alkalmazásával – cDNS-t szintetizáltunk. A polimeráz-láncreakciót a következő feltételekkel végeztük: 94 °C-on 10 perces denaturálás, majd amplifikáció 50 cikluson keresztül (ciklusonként 94 °C-on 30 másodperces denaturálás, 55 °C-on
 25 50 másodperces hibridizáció; és 72 °C-on 60 másodperces lánchosszabbítás), végül 72 °C-on öt perces inkubálás, majd 4 °C. A polimeráz-láncreakciót a következő láncindító-pár alkalmazásával végeztük:

ee3_plus: 5'-GGTGTGGGAGAAATGGCTTA-3';

ee3_minus: 5'-ATACCAGCAGAGCCTGGAGA-3'.

30 Az utóbbi években felismerték az új idegsejtek képződésének (neurogenézis) neurológiai betegségek folyamatában játszott szerepét. A kifejezett agy regeneratív képessége - számos más szövetrel ellentétben – korlátozott, és a szokatlanul magas fokú celluláris specializáció

csökkenti annak lehetőségét, hogy a megmaradt egészséges szövet átvegye a károsodott szövetek funkcióját. Mindazonáltal, a kifejlett agyban a prekursor-sejtekből kifejlődő idegsejtek alapvetően képesek e funkciók átvételére.

A neurogenesis a kifejlett agy jól körülírható régióiban játszódik le, nevezetesen az oldalsó agykamrák rostralis szubventrikuláris zónájában (SVZ) és a fogazott gyrusban (DG) a szubgranuláris zónában (SGZ). Számos kutatócsoport kimutatta, hogy a neurogenézist első sorban neurológiai károsodás indukálja [például, agyi vértelenség (ischaemia); Jin és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4710 (2001); Jiang és mtsai.: Stroke 32, 1201 (2001); Kee és mtsai.: Exp. Brain. Res. 136, 313 (2001); Perfilieva és mtsai.: J. Cereb. Blood Flow Metab. 21, 211 (2001)]. A neurogenesis emberekben is megfigyelhető [Erikson és mtsai.: Nat. Med. 4, 1313 (1998)], és valóban működőképes neuronok képződését eredményezi [van Praag és mtsai.: Nature 415, 1030 (2002)]. A fogazott gyrus szubgranuláris zónája és a hilus felnőtt életkorban is képes új neuronok képzésére [Gage és mtsai.: J. Neurobiol. 36, 249 (1998)]. Az ee3 szembetűnő módon detektálható a hippocampus neuronális összejtjeiben (ld. a 25. ábrát), ami arra enged következtetni, hogy az ee3 a neurogenesis szempontjából nagy jelentőségű. A neurogenesisben betöltött szerepe alátámasztja az ee3 neurodegeneratív rendellenességek esetében általánosan tapasztalható hasznosságát is.

Az endogén összejtek agyban kifejtett hatásával ellentétben, az ee3-ra ható gyógyszerek alkalmazhatók az összejtek in vitro manipulálására (pl., in vitro differenciáció és proliferáció). Jelenleg az összejtek alkalmazhatóságát számos neurodegeneratív rendellenesség (de különösen a Parkinson-kór és a stroke) vonatkozásában tanulmányozzák. Például, Parkinson-kóros páciensekbe történő transzplantáció esetén szükség lehet a sejtek in vitro differenciálódására, és ezáltal az injekció utáni dopaminerg hiány kompenzálására [helyettesítéssel; Arenas: Brain Res. Bull 57, 795 (2002); Barker: Mov. Disord. 17, 233 (2002)]. Az összejtek bejuttatásának egy másik lehetősége lehet, például, stroke és agysérülés esetén, az intraartériás vagy intravénás injektálás [Mahmood és mtsai.: Neurosurgery 49, 1196 (2001); Lu és mtsai.: J. Neurotrauma 18, 813 (2001); Lu és mtsai.: Cell Transplant. 11, 275 (2002); Li és mtsai.: Neurology 59, 514 (2002)]. Az ee3 összejt-terápiában történő alkalmazásának további lehetősége az ee3 agonistáját vagy antagonistáját állandóan szekretáló sejtek előállításának lehet.

15. példa

Az ee3-receptorcsalád *Xenopus laevis*-ből és *Danio rerio*-ból származó további tagjainak klónozása

A találmány szerinti homológia-kritériumnak köszönhetően lehetővé vált az ee3-proteincsalád további tagjainak klónozása. A humán ee3₁-proteinből származó aminosav-szekvenciák és TBLASTN-program alkalmazásával EST-adatbázisokat szkríneltünk, miáltal *Xenopus laevis*-ből (afrikai karmosbéka) és *Danio rerio*-ból (zebradánió) származó expresszált szekvencia-jelölőket (EST-ket) azonosítottunk. Ezeket az EST-ket standard eljárásokkal szekvenálva a következő szekvenciákat állapítottuk meg:

Az x1-ee3 (*Xenopus laevis*) teljes hosszúságú szekvenciája:

```

CCCCGGCACGTTACCGTATTGATGTTACTAGTAGCGCACAGAAACATCCTGGTCTAAGCAGTTGCAGCAGGTACTGCGTT
GTAGTGGCGGTAGTTACGACTCTGTAGGTTAGAGCGGAGGCTTTGCTGGAGCAATGTCCGCCTAGTGAAGCTCGGAGAGG
TGCTCGCACCATGAATCTTAGGGCCCTCTCCAGGATTTAAACCCAGTAAATTTCTCATCTACGCATGTTTGTGCTCT
TTTCTGTTCTCCTTTCCCTGCGGCTGGATAATATTATTCAGTGGAGTTACTGGGCGGTGTTTGCCTCAATATGTTTGTGG
AACTAATGTTTATTGTGGGAGCTCCTAATTGCAGTGGGAATTCATTTGCTGCTTCTTATGTTTGAAGTCTTGTGTTGCGATC
10 ATGTGTGGAGTTCAAGGCCATGCTAATTGCAGTGGGAATTCATTTGCTGCTTCTTATGTTTGAAGTCTTGTGTTGCGATC
GTATTGAAGAGGAAACCACTACTTCTGCTGCTAGTCTTTATGCCCTTTATCTTGTGTCCTCCAGTATCCGTTGCAGCT
TGCGTTTGGGGCTTTCCGCATGATCGATCATTGGAATTGGAAATCTTGTGCTCCGTCATATAATTCGCAGTTTATATTCA
TGCCCTAAGACTTGACAGCATCATCCTTGGCTTGGCTTGTGGTATGTCCTCCGCTGTGGATCCTTATGTCCTTCTCTGT
GCCCTAGTACTTCTGATTATATTGTTGGTTCAGTCTGTTCTGCTGCTTCAATGGATGTTATTGCAGAACAAAGGAGAACT
CATATTACTATGGCAGTCAGTTGGATGGCTATAGTTGTACCGCTTCTGACATTCGAGATATTACTTGTTCATCGACTTGA
TGGGCACAATCCATTATCGAATATCCCTATATTGTTCCGCTTTGGCTTTCCTTAATAACGTTGATGGCAACAACTTTG
15 GACAGAAAGGAGGCAATCAGTGGTGGTTGGGATTCTGAAGGAAAGAACTACTGACCTCATTCTCTTTTGTATTCAATTTGTAATTT
CGAGAAATATGGCAATATCTCATATGATATTTCATCATGAAGCAGTGAAGATGCTGAAGAAACACCTGTACCGAGACCCCC
CAAAATCGCACCAATGTTTGAAGAAAGACTGGCGTTGTCATTACCCAGAGCCAGGGAAATATATTGTTCTCTCTGCTA
AACTTAACATCGACATGCCGGATTAAAGTGAAATTTGGTGGCTTGAGGGCAGCTTTTCTGTTTAACTAATCCTGTTAG
TAGTACACTATCAGGTGCTAGCAGCTGAAGGAAAGAAAGAACTACTGACCTCATTCTCTTTTGTATTCAATTTGTAATTT
TTTTGTTCTCTGCAATGGTATGTTGTTTCCCATTCCTAATTCATGTCATCATGTTACTCAAGATCAGGGAAGCTTCTTAA
GGGCAAGAAATGCTGCAATTTGTAGTTTATAATTTGTGGATGACTATAAATTTTACATCTGTTGTCTTGGTAAATGACTG
CAGTCTTGCAATCTAGTTTCTAGTAACACAGAGATAGACCAGCTGTGGCCCTCCAGATCTGAGCTAACAAAGCTTTGGGA
GACATCTGCGAATCTTAGCAGCTCTGGGGCCACAGGTGGACCTTCTCAGCAGTAAATTAAGTATAATGTTTATCTTAA
20 GTAAATGCTCTTTGTGTGTTGTTTATGCAATGCAGCTATTGTTTGTATCTTTTACAGCAGAACTTGTGCTAGAAATGAA
ttcaagtgtgagctgtttataccactataaaaaatacttttAAAAAAATCTGTTTAAAGGCTCAAGCATTACCTTGGA
GAAGTGAATTTGAGCAGAGGGCTTATGGGATATATCTAATATACACCTTCCCTTAGGAGTTACTACTCCTTGCTCAGT
GTATAGTATTATAAGAACATTTTATCAATGTAATATATTGTTTCAAAATATTCTTATGTACAGTATAAATGGATAAA
TACAAAGTATTTTTTAAATAAAGATGTAATATACATATAAGTTGTCAAAATTTTGTGTAATTTACATTTTAAATG
ATCTATGTGAATTTCTACAATGAAAAAGATCTATACAATTTCAAAAGCCAGTATGTCATTTTATATACTGACCATGTAC
25 ATATTATGTAAGATGTAAGCCAAACCAATGACATGAATGTTAAGTTATTAGACTATGAATAAACATTGATTTTATT
TTATGTTGTAAAAAATAAATAAATAA

```

Az x1-ee3 nyitott leolvasási fázisa:

```

ATGAATCTTAGGGGCTCTTCCAGGATTTAAACCCAGTAAATTTCTCATCTACGCATGTTTGTGCTCTTTTCTGTTCT
CCTTTCCCTCGGACTGGATAATATTATTCAGTGGAGTTACTGGGCGGTGTTGCTCCAAATATGTTTGTGGAACATAATGG
TATTGTGGGAGCCTCAGTTGGTACAGGTGTATGGGCACGTAACCCCTCAATACAGGGCAGAAGGTGAACATGTGTGGAG
TTCAAGGCCATGCTAATTGCAGTGGGAATTCATTTGCTGCTTCTTATGTTTGAAGTCTTGTGTTGCGATCGTATTGAAG
AGGAAACCACTACTTCTGCTGCTAGTCTTTATGCCCTTTATCTTGTGTCCTCCAGTATCCGTTGCAGCTTGCCTTTGGG
CCTTTCCGCATGATCGATCATTGGAATTTGGAAATCTTGTGCTCCGTCATATTCTGCAGTTTATATTCAATGTCCTTAAGA
25 CTTGACAGCATCATCCTTGGCTTGGCTTGGTATGTTGCCGCTGTGGATCCTTATGTCCTTCCGTGCTGCTAGTAGT
TCTGTATTATATTGTGTGGTCAAGTTCTGTTCTGCTTCAATGGATGTTATTGCAGAACAAAGGAGAACTCATATTACTA
TGGCAGTCAGTTGGATGGCTATAGTTGTACCGCTTCTGACATTCGAGATATTACTTGTTCATCGACTTGTGGGCACAAT
CCATTATCGAATATCCCTATATTGTTCCGCTTTGGCTTTCCTTAATAACGTTGATGGCAACAACTTTGGACAGAAAGG
AGGCAATCACTGGTGGTTTGGGATTCGTAAGAGCTTCTGCCAGTTTCTGTTGGAGATTTCCTTTTCTTCGAGAATATG
GCAATATCTCATATGATATTATCATCATGAAGACAGTGAAGATGCTGAAGAAACACCTGTACCGGAGCCCCCAAAATCGCA
CCAATGTTTGAAGAGAGACTGGCGTTGTCATTACCCAGAGCCAGGGAAATATATTGTTCTCTCTGCTAAACTTAACAT
CGACATGCCGGATTAA

```

Az x1-ee3 aminosav-szekvenciája:

```

MNLRLGPDENFNSKFLIYACLLLSVLLSLRLDNIQWSYVAVFAPINLWKLNVIVGASVGTGVWVARNPQYRAEGETCWE
FKAMLIYVGIHLLLMFEVLVCDRIERGHYFWLLVEMPLFFVSPVSVAAACVWGFHRSLELEILCSVNILOQIFIALR
LDSIITWPLWVVCPLNILMSFLCLVLYIIVSVLFLRSMOVIARRTNITMAVSWMAIVVPLLTFEILLVHRLDGHN
PLSNIPFIYPLNLSLITLMATTFGQGGHWWFGIRKDFCQFLEIFPFLREYGNISYDIHHEDSEDAEETVPVEPPKIA
PMFRKKTGVVITQSPGKYIVPPAKLNDMPD

```


A 27. ábrán – két, *X. laevis*-ből és *D. rerio*-ból származó protein segítségével - az *ee3* nagyfokú evolúciós konzerváltságát szemléltetjük.

A szekvencialistában előforduló kötetlen szövegek fordítása

1. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_c1 (egér)

5 <223> Kezdőkodon: atg (160-162. nukleotidok), stopkodon:
taa (1210-1212. nukleotidok);

2. azonosítószámú szekvencia:

<223> „Epoest3”

3. azonosítószámú szekvencia:

10 <223> Kezdőkodon: atg (301-303. nukleotidok), stopkodon:
taa (1351-1353. nukleotidok);

4. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_1 (humán)

<223> Kezdőkodon: atg (117-119. nukleotidok), stopkodon:
15 tag (1167-1169. nukleotidok);

5. azonosítószámú szekvencia:

<223> Alternatív „splice”-termék, ee3_1b_h (humán)

<223> Kezdőkodon: atg (114-116. nukleotidok), stopkodon:
tga (612-614. nukleotidok)

20 <223> aggt (535-538. nukleotidok): „splice”-donor
konszenzus hely;

6. azonosítószámú szekvencia:

<223> Alternatív „splice”-termék, ee3_1c_h (humán)

<223> Kezdőkodon: atg (130-132. nukleotidok), stopkodon:
25 tag (346-348. nukleotidok);

7. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_2 (humán)

<223> Kezdőkodon: atg (399-401. nukleotidok), stopkodon:
taa (1449-1451. nukleotidok);

30 8. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_2-szekvencia, második, alternatív poliadenilációs
szignállal

9. azonosítószámú szekvencia:

- <223> ee3_1 (egér);
10. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_2 (egér);
11. azonosítószámú szekvencia:
- 5 <223> ee3_1 (humán);
12. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_1b_h (humán);
13. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_1c_h (humán);
- 10 14. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_2 (humán);
15. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_5 (humán)
<223> Kezdőkodon: atg (1162-1164. nukleotidok), stopkodon:
15 taa (1606-1608. nukleotidok)
<223> Leolvasási fázison belüli stopkodon: tga (1114-1116.
nukleotidok);
16. azonosítószámú szekvencia:
<223> ee3_5 (humán);
- 20 17. azonosítószámú szekvencia:
<223> Mesterséges szekvencia leírása: „Flag”-peptid
leírás, 30. old.
18. azonosítószámú szekvencia:
<223> Mesterséges szekvencia leírása: a 8 ábrán bemutatott találmány szerinti szek-
- 25 vencia 609 – 630. aminosavai
19. azonosítószámú szekvencia:
<223> Találmány szerinti peptid, amely tartalmazza a DRI aminosavhármast
20. azonosítószámú szekvencia:
<223> Mesterséges szekvencia leírása: a GPCR-proteinosztályra jellemző, az első
- 30 extracelluláris hurok végénél található ismertetőjel
21. azonosítószámú szekvencia:
<223> Mesterséges szekvencia leírása: a GPCR-proteinosztályra jellemző, az első
extracelluláris hurok végénél található ismertetőjel

22. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3-család C-terminális doménje egy jellemző peptidjének részleges szekvenciája

23. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása: radioaktívan jelzett ee3_1.3as oligonukleotid-próba;

24. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1.3s oligonukleotid-próba;

10 25. azonosítószámú szekvencia:

<223> C-terminálison elhelyezkedő peptidepitóp

<223> Mesterséges szekvencia leírása: epitóp, a humán ee3_1 szekvencia 299-315. aminosavai az N-terminális függő ciszteinnel (leírás, 101 és 137. old.).

26. azonosítószámú szekvencia:

15 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

5'-láncindító, az ee3_1_m (leírás, 105. old.) és a patkány ee3_1 (leírás, 125. old.) azonosításához használt „előre”-láncindító

27. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

20 3'-láncindító, az ee3_1_m (leírás, 105. old.) és a patkány ee3_1 (leírás, 125. old.) azonosításához használt „vissza”-láncindító

28. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'biotin1-hs;

25 29. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-3'block1-hs

30. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_1-5'block1-hs

31. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-1s-hs

32. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1_1as-hs

33. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-2s-h

34. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-2as-h

10 35. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'block2-h

36. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

15 Oligonukleotid: ee3_1-5'biotin2-h

37. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-3'block2-h

38. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'biotin1-m

39. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-3'block1-m

25 40. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'block1-m

41. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_1-1s-m

42. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-1as-m

43. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-2s-m

44. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-2as-m

45. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'biotin2-m

10 46. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1-5'block2-m

47. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

15 Oligonukleotid: ee3_1-3'block2-m

48. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-1as-h

49. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-1s-h

50. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'block1-h

25 51. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'biotin1-h

52. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_c2-3'block1-h

53. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-3'block1-m

54. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'biotin1-m

55. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-1as-m

56. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-1s-m

10 57. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'block1-m

58. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

15 Oligonukleotid: ee3_c2-m-2s

59. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-m-2as

60. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'block2-m

61. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'biotin2-m

25 62. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-3'block2-m

63. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_c2-5'biotin3-m

64. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-3'block3-m

65. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-5'block3-m

66. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c3-5'block1-h

67. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c3-5'biotin1-h

10 68. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c3-3'block1-h

69. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

15 Oligonukleotid: ee3_c3-1s-h

70. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c3-1as-h

71. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c5-1as-h

72. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c5-1s-h

25 73. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c5-5'block1-h

74. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_c5-5'biotin1-h

75. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c5-3'block1-h

76. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-5'block1-h

77. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-5'biotin1-h

78. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-3'block1-h

10 79. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-1s-h

80. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

15 Oligonukleotid: ee3_c8-1as-h

81. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-2s-h

82. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c8-2as-h

83. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1_h_B1

25 84. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_1_h_B2

85. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

30 Oligonukleotid: ee3_1-h-C-fus-B2

86. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-h-B1

87. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-h-B2

88. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-h-c-fus-B2

89. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-m-B1

10 90. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Oligonukleotid: ee3_c2-m-B2

91. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az élesztő-2-hibrid rendszerben alkalmazott ee3_1
15 karboxiterminális rész ee3_1-protein C-terminálisa kéthibrides élesztőrendszerben
történő alkalmazáshoz

92. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1 kiálló karboxiterminális részének megfelelő
nukleinsav-szekvencia

20 93. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 11-es klón szekvenciája;

94. azonosítószámú szekvencia:

<223> Map1a;

95. azonosítószámú szekvencia:

25 <223> Map1b;

96. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1/ee3_2
224-324. aminosavaiból álló szekvencia;

97. azonosítószámú szekvencia:

30 <223> A 14312 – 14010. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az 5q33.1
kromoszómáról (a AC11406.00015 jelű kontig).

98. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1/ee3_2

334-350. aminosavaiból álló szekvencia;

99. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 13992 – 13942. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az 5q33.1 kromoszómáról (a AC11406.00015 jelű kontig).

5 100. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1/ee3_2

206-223. aminosavaiból álló szekvencia;

101. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 14368 – 14312. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az 5q33.1 kromoszómáról (a AC11406.00015 jelű kontig).

10

102. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_1_m, 1-350. aminosavak;

103. azonosítószámú szekvencia:

<223> Az 1 – 148. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az 5q33.1 kromoszómáról (a AC11406.00015 jelű kontig).

15

104. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_1-ből származó cDNS, 2499-1103. nukleotidok;

105. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_1-ből származó genomi szekvencia, 13048-14444.

20

nukleotidok;

106. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 8q11.22 kromoszómáról származó nukleotidszekvencia (a Ac034174 jelű egyesített kontigból).

107. azonosítószámú szekvencia:

25

<223> A 3p25.3 kromoszómáról származó nukleotidszekvencia 108. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1/ee3_2

159-187. aminosavaiból álló szekvencia;

109. azonosítószámú szekvencia:

30

<223> A 1848–1759. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az Xp21.1 kromoszómáról (AC027722.00010)

110. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: az ee3_1/ee3_2

88-134. aminosavaiból álló szekvencia;

111. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 2507 – 2361. aminosav-pozícióknak megfelelő nukleotidszekvencia az Xp21.1 kromozómáról (AC027722.00010).

5 112. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 109. azonosítószámú szekvenciát kódoló nukleotidszekvencia.

113. azonosítószámú szekvencia:

<223> A 111. azonosítószámú szekvenciát kódoló nukleotidszekvencia.

114. azonosítószámú szekvencia:

10 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 15-33. aminosavak;

115. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 40-56. aminosavak;

15 116. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 83-102.
aminosavak;

117. azonosítószámú szekvencia:

20 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 112-134.
aminosavak;

118. azonosítószámú szekvencia:

25 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 168-191.
aminosavak;

119. azonosítószámú szekvencia:

30 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 211-227.
aminosavak;

120. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: ee3_1,
feltételezett transzmembrán-hélix, 240-258.

aminosavak;

121. azonosítószámú szekvencia:

<223> Az x1_ee3 teljes hosszúságú szekvenciája;

122. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Az x1_ee3 nyitott leolvasási fázisa;

123. azonosítószámú szekvencia:

<223> Az x1_ee3-protein aminosav-szekvenciája;

124. azonosítószámú szekvencia:

<223> dr_ee3

10 125. azonosítószámú szekvencia:

<223> A dr_ee3 nyitott leolvasási fázisa;

126. azonosítószámú szekvencia:

<223> A dr_ee3-protein aminosav-szekvenciája;

127. azonosítószámú szekvencia:

15 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklofilin 5'-láncindítója;

128. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklofilin 3'-láncindítója;

20 129. azonosítószámú szekvencia:

<223> Az intracelluláris C-terminálisban található epitóp, a humán ee3_1 299-315. pozíciói-nál (leírás, 137. old.)

130. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: patkány ee3_1 „előre”-láncindító (leírás, 125. old., 28. sor) / ee3_plus-láncindító (leírás, 140. old., 2. sor)

131. azonosítószámú szekvencia:

<223> Patkány ee3_1 „vissza”-láncindító (leírás, 125. old., 29. sor) / ee3_minus-láncindító (leírás, 140. old., 2. sor)

132. azonosítószámú szekvencia:

30 <223> ee3_1-szekvencia, human_pro, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés

133. azonosítószámú szekvencia:

<223> ee3_2_h-szekvencia, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés

134. azonosítószámú szekvencia:

- <223> ee3_c5_h_e-szekvencia, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
135. azonosítószámú szekvencia:
- <223> droso ee3-szekvencia, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
136. azonosítószámú szekvencia:
- 5 <223> c.elegans szekvencia, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
137. azonosítószámú szekvencia:
- <223> Mesterséges szekvencia leírása: GPCR-protein
dc32_bio, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
138. azonosítószámú szekvencia:
- 10 <223> ccr5_human GPCR-protein, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
139. azonosítószámú szekvencia:
- <223> c5ar_human szekvencia, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
140. azonosítószámú szekvencia:
- <223> dop21_huma GPCR-protein, 8. ábra szerinti egymás alá rendezés
- 15 141. azonosítószámú szekvencia:
- <223> Mesterséges szekvencia leírása: a 8. ábrán látható, GPCR-A-családra jellemző, 76-80.
pozíciók közötti konszenzus famA-konszenzusmotívum
142. azonosítószámú szekvencia:
- <223> Mesterséges szekvencia leírása: a 8. ábrán látható, GPCR-A-családra jellemző, 586-
20 590. pozíciók közötti konszenzus famA-konszenzusmotívum
143. azonosítószámú szekvencia:
- <223> Mesterséges szekvencia leírása: pfam_famA
(pfam = proteincsalád) a 8. ábrán látható konszenzusmotívum, amely a GPCR-A-család
proteinjeinek csoportosulásából adódik
- 25 144. azonosítószámú szekvencia:
- <223> Mesterséges szekvencia leírása: Mesterséges szekvencia leírása: a 8. ábrán látható,
GPCR-B-családra jellemző, 70-74. pozíciók közötti konszenzus famB-
konszenzusmotívum
145. azonosítószámú szekvencia:
- 30 <223> Mesterséges szekvencia leírása: Mesterséges szekvencia leírása: Mesterséges szekven-
cia leírása: a 8. ábrán látható, GPCR-B-családra jellemző, 579-588. pozíciók közötti
konszenzus famB-konszenzusmotívum
146. azonosítószámú szekvencia:

<223> Mesterséges szekvencia leírása: pfam_famB

(pfam = proteincsalád) a 8. ábrán látható konszenzusmotívum, amely a GPCR-B-család proteinjeinek csoportosulásából adódik

147. azonosítószámú szekvencia:

5 <223> Mesterséges szekvencia leírása: pfam_famC

(pfam = proteincsalád) a 8. ábrán látható konszenzusmotívum, amely a GPCR-C-család proteinjeinek csoportosulásából adódik

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS-szekvencia, amely a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrák bármelyike szerinti polipeptidet kódol, beleértve a funkcionális szempontból homológ származékokat is.
- 5 2. Az 1. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely a 9/A, 10., 11/A, 11/B, 11/C, 12. vagy 17. ábrák bármelyike szerinti transzlálódó régiónak (nagybetűkkel szedve) megfelelő (c)DNS-szekvenciát tartalmaz.
3. Expressziós vektor, amely 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvenciát tartalmaz.
4. Gazdasejt, amely 3. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva.
- 10 5. A 4. igénypont szerinti gazdasejt, amely emlőseredetű sejt, előnyösen humán sejt.
6. Tisztított géntermék, amelyet 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia kódol.
7. A 6. igénypont szerinti tisztított géntermék, amely polipeptid.
8. Transzgenikus állat, amelyből legalább egy natív ee3-aminosav-szekvencia hiányzik, mely aminosav-szekvencia, előnyösen a 7. igénypont szerinti polipeptid vagy a 13., 14.,
15 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatottak bármelyike.
9. Antitest, amely a 6. vagy 7. igénypont szerinti tisztított génterméken található epitópot ismer fel.
10. A 9. igénypont szerinti antitest, amely monoklonális antitest.
11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti antitest, amely epitópként az extracelluláris do-
20 ménben található szekvencia-részlet ellen irányul.
12. Eljárás 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermékek expresszáltatására, azzal jellemezve, hogy gazdasejteket 3. igénypont szerinti expressziós vektorral transzformálunk.
13. Eljárás 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermékek expresszáltatására, azzal jellemezve, hogy 4. vagy 5. igénypont szerinti gazdasejteket expressziót elősegítő, alkalmas felté-
25 telek mellett tenyésztünk, majd a génterméket a tenyészetből tisztítjuk.
14. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia vagy a 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermék, hatóanyagként történő alkalmazásra.
15. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia vagy a 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermék alkalmazása a következő rendellenességek kezelésére (és/vagy ilyen rendelle-
30 nességek kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására): daganatos megbetegedések, krónikus és akut oxigénhiányos állapotok, szív- és érrendszeri rendellenességek, (neuro)degeneratív rendellenességek, immunrendszeri rendellenességek, neurológiai rendellenességek, különösen a stroke, szklerózis multiplex, Parkinson-kór, amiotróf laterális szklerózis, öröklött degeneratív

ataxiák, Huntington-kór, neuropátiák és epilepsziák.

16. Vegyület, amely módosítja – előnyösen gátolja – egy ee3-protein intracelluláris és/vagy extracelluláris működését, például, egy intratest, amely ee3-protein citoplazmikus struktúrája ellen irányul.

5 17. A 16. igénypont szerinti vegyület, amely előnyösen 3000 D-nál kisebb molekulatömegű szerves vegyület.

18. A 16. vagy 17. igénypont szerinti vegyület, amely diffúzióval vagy membrán-transzport-proteinek révén jut át a sejtmembránon.

10 19. Eljárás a 16-18. igénypontok bármelyike szerinti, gyógyászatilag aktív vegyületek azonosítására, azzal jellemezve, hogy

(a) megfelelő gazdasejt-rendszert 3. igénypont szerinti expressziós vektorral - előnyösen a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott proteint kódoló expressziós vektorral - és, alkalmas esetben, legalább egy riportergént kódoló legalább egy expressziós vektorral transzfektálunk; és

15 (b) egy vizsgált vegyület hozzáadása után az (a) pont szerint kapott gazdasejt-rendszerre - a tesztelt vegyület hozzáadása nélküli kontrollal összehasonlítva – olyan paramétert mérünk, amely alkalmas egy 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermék által közvetített funkció, előnyösen apoptózis, sejtnövekedés, sejtproliferáció és/vagy sejtplaszticitás detektálására.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként

20 (c) egy találmány szerinti proteinen megfelelő biokémiai vagy szerkezetbiológiai módszerrel meghatározzuk a gyógyászatilag aktív vegyület kötőhelyét.

21. A 19. vagy 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépésben a géntermék által közvetített funkció detektálására alkalmas paraméterként alkalmas vizsgálati eljárás alkalmazásával intracelluláris Ca-felszabadulást mérünk.

25 22. A 16-18. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása krónikus vagy akut oxigénhiányos állapotokkal összefüggő betegségek kezelésére (és/vagy ilyen betegségek kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására), mely betegségek például a következők: szívinfarktus, szívelégtelenség, szívizom-rendellenességek, szívizomgyulladás (myocarditis), pericarditis, perimyocarditis, szívkoszorúér-betegség, öröklött szívdefektusok jobb-bal kamrai egybenyílással, Fallot-tetralógia/pentalógia, Eisenmenger-szindróma, sokk, végtagok hipoperfúziói, artéria-elzáródásos betegség (AOD), perifériás AOD (pAOD), carotid stenosis, veseartéria-stenosis, kísér-betegség, intracerebrális vérzés, agyi véna- és sinus-trombózisok, érdaganatok, subarachnoideális vérzések, vaszkuláris dementia, Biswanger-betegség, subcorticalis arteriosz-

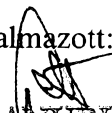
30

klerózisos encephalopathia, embóliával összefüggésben kialakuló agykérgi infarktuszok, vasculitis, diabetes-eredetű retinopathia, különböző eredetű vérszegénységek konszekutív tünetei (például, aplasztikus vérszegénység, mielodiszpláziás szindróma, policitémia vera, megaloblasztikus vérszegénységek, vashiányos vérszegénység, veseeredetű vérszegénység, szferocitózis, vészes vérszegénység, thalassemiák, hemoglobinopátiák, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz-hiány, transzfúziós jelenségek, Rh-összeférhetetlenség, malária, szívbillentyű-helyettesítés, vérzéses vérszegénységek, fokozott lépműködéses szindróma), tüdőfibrózisok, emphysema, tüdőödéma: ARDS, IRDS, kiújuló tüdőembólia, daganatos betegségek (például, vastagbél-karcinoma, emlőkarcinoma, prosztatakarcinoma, tüdőkarcinoma), immunrendszeri rendellenességek (például, autoimmun betegségek, például diabetes, psoriasis, immunhiányos állapotok, szklerózis multiplex, reumaszerű ízületi gyulladás, atópiák, asztma), vírusfertőzések okozta betegségek (például, HIV, hepatitis-B vagy hepatitis-C fertőzések), baktériumfertőzések (pl., Streptococcus- vagy Staphylococcus-fertőzések), degeneratív rendellenességek, különös tekintettel a neurodegeneratív rendellenességekre, mint például, az izomsorvadás, graft-versus-host betegség (pl., máj-, vese- vagy szívátültetéseknél), illetve egyéb neurológiai rendellenességek (például, többek között, a következők: stroke, szklerózis multiplex, Parkinson-kór, subarachnoidealis vérzések, amiotróf laterális szklerózis, örökletes degeneratív ataxiák, Huntington-kór, neuropátiák, epilepsziás betegségek, agysérülések, Alzheimer-kór), izomlazítók (például, érzéstelenítéshez), endokrinológiai rendellenességek (például, oszteoporózis vagy pajzsmirigy-elégtelenség) és bőrbetegségek (psoriasis, neurodermatitis), krónikus vagy akut fájdalom, genetikai betegségek, pszichológiai rendellenességek (pl., skizofrénia vagy depressziók), sebgyógyulás, szexuális funkciók támogatása, szív- és érrendszeri betegségek (például, isémiás infarktus, szívelégtelenség, szívritmuszavar, magas vérnyomás), agyműködés fokozása, neurodegeneratív rendellenességek (előnyösen Alzheimer-kór és Parkinson-kór), izomsorvadás, vírusfertőzéssel összefüggő betegségek, daganatos megbetegedések és autoimmun betegségek vagy agyi isémiák.

23. Eljárás ee3-protein vagy származéka celluláris kölcsönhatási partnerének azonosítására „kéthibrides élesztőrendszer” alkalmazásával.

24. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia vagy a 6. vagy 7. igénypont szerinti géntermék alkalmazása ee3-protein által közvetített szignáltranszdukcióban szerepet játszó további proteinek azonosítására.

A meghatalmazott:


DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 Dr. Pethő Árpád
 szabadalmi ügyvivő

Az eredetileg benyújtott szabadalmi igénypontok fordítása

1. DNS-szekvencia, amely a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrán bemutatott polipeptid bármelyikének legalább 20 aminosav hosszúságú szekvencia-részletét tartalmazó polipeptidet kódoló szekvencia-régiót tartalmaz, ideértve a funkcionális szempontból homológ származékokat, fragmenseket vagy alléleket, valamint az ilyen DNS-szekvenciával hibridizáló DNS-szekvenciákat is (az ábrák az igénypont részét képezik).
2. Az 1. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrák bármelyike szerinti polipeptidet kódoló szekvencia-régiót tartalmaz, ideértve a funkcionális szempontból homológ származékokat, fragmenseket vagy alléleket, valamint az ilyen DNS-szekvenciával hibridizáló DNS-szekvenciákat is.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. és 18. ábrák bármelyike szerinti polipeptidet kódol, ideértve a funkcionális szempontból homológ származékokat, fragmenseket vagy alléleket, valamint az ilyen DNS-szekvenciával hibridizáló DNS-szekvenciákat is.
4. Az 1. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely a 9/A, 10., 11/A, 11/B, 11/C, 12. vagy 17. ábrán bemutatott (c)DNS-szekvencia legalább 60 nukleotid hosszúságú szekvencia-részletét (előnyösen a 9/A, 10., 11/A, 11/B, 11/C, 12. vagy 17. ábrán nagybetűkkel szedett transzlálódó régió tetszőleges szekvenciáját) tartalmazza.
5. Expressziós vektor, amely az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvenciát tartalmaz.
6. Gazdasejt, amely 5. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva.
7. A 6. igénypont szerinti gazdasejt, amely emlőseredetű sejt, előnyösen humán sejt.
8. Tisztított géntermék, amelyet az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia kódol.
9. A 8. igénypont szerinti tisztított géntermék, amely egy polipeptid.
10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti tisztított géntermék, amely a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16., illetve 18. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazza, ideértve a funkcionális szempontból homológ alléleket, fragmenseket vagy származékokat is.
11. Transzgenikus állat, amely genetikailag úgy van módosítva, hogy egy normális állattal összehasonlítva legalább egy, 9. vagy 10. igénypont szerinti aminosav-szekvencia (specifikusan) módosított mennyiségét tartalmazza, mely aminosav-szekvencia a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrák bármelyike szerinti aminosav-szekvencia vagy a 9. vagy 10.

igénypont szerinti aminosav-szekvencia, amely a natív ee3-szekvenciához (előnyösen a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott szekvenciához) viszonyítva módosítva van, vagy amely transzgenikus állatból hiányzik legalább egy natív ee3-aminosav-szekvencia módosított változata (vagy tartalmazza azt), mely ee3-aminosav-szekvencia a 9. igénypont
5 vagy a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábra szerinti aminosav-szekvencia vagy részlete.

12. Antitest, amely a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti tisztított génterméken található epitópot ismer fel.

13. A 12. igénypont szerinti antitest, amely monoklonális antitest.

10 14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti antitest, amely epitópként az extracelluláris doménben található szekvencia-részlet ellen irányul.

15. Eljárás a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermékek expresszáltatására, azzal jellemezve, hogy gazdasejteket 5. igénypont szerinti expressziós vektorral transzformálunk.

15 16. Eljárás a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermékek expresszáltatására, azzal jellemezve, hogy 6. vagy 7. igénypont szerinti gazdasejteket megfelelő, expressziót elősegítő feltételek mellett tenyésztünk, majd a génterméket a tenyészetből tisztítjuk.

17. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia vagy a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermék, hatóanyagként történő alkalmazásra.

20 18. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia vagy a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermék alkalmazása a következő rendellenességek kezelésére (és/vagy ilyen rendellenességek kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására): daganatos megbetegedések, krónikus és akut oxigénhiányos állapotok, szív- és érrendszeri rendellenességek, (neuro)degeneratív rendellenességek, immunrendszeri rendellenességek, neurológiai rendellenességek, különösen a stroke, szklerózis multiplex, Parkinson-kór, amiotróf laterális szklerózis, öröklött degeneratív ataxiák, Huntington-kór, neuropátiák és epilepsziák.
25

19. Vegyület, amely módosítja – előnyösen gátolja - egy ee3-protein intracelluláris és/vagy extracelluláris működését, például, egy intratest, amely ee3-protein citoplazmikus struktúrája ellen irányul.

30 20. A 19. igénypont szerinti vegyület, amely előnyösen 3000 D-nál kisebb molekulatömegű szerves vegyület.

21. A 19. vagy 20. igénypont szerinti vegyület, amely diffúzióval vagy membrántranszport-proteinek révén jut át a sejtmembránra.

22. Eljárás a 19-21. igénypontok bármelyike szerinti, gyógyászatilag aktív vegyületek azonosítására, azzal jellemezve, hogy

(a) megfelelő gazdasejt-rendszert 5. igénypont szerinti expressziós vektorral - előnyösen a 13., 14., 15/A, 15/B, 15/C, 16. vagy 18. ábrán bemutatott proteint kódoló expressziós vektorral - és, alkalmas esetben, legalább egy riporter gént kódoló legalább egy expressziós vektorral transzfektálunk; és

(b) egy vizsgált vegyület hozzáadása után az (a) pont szerint kapott gazdasejt-rendszerre - a tesztelt vegyület hozzáadása nélküli kontrollal összehasonlítva - olyan paramétert mérünk, amely alkalmas egy 8. vagy 10. igénypont szerinti géntermék által közvetített funkció (előnyösen apoptózis, sejtnövekedés, sejtprolifерáció és/vagy sejtplaszticitás) detektálására.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként

(c) egy találmány szerinti proteinen megfelelő biokémiai vagy szerkezetbiológiai módszerrel meghatározzuk a gyógyászatilag aktív vegyület kötőhelyét.

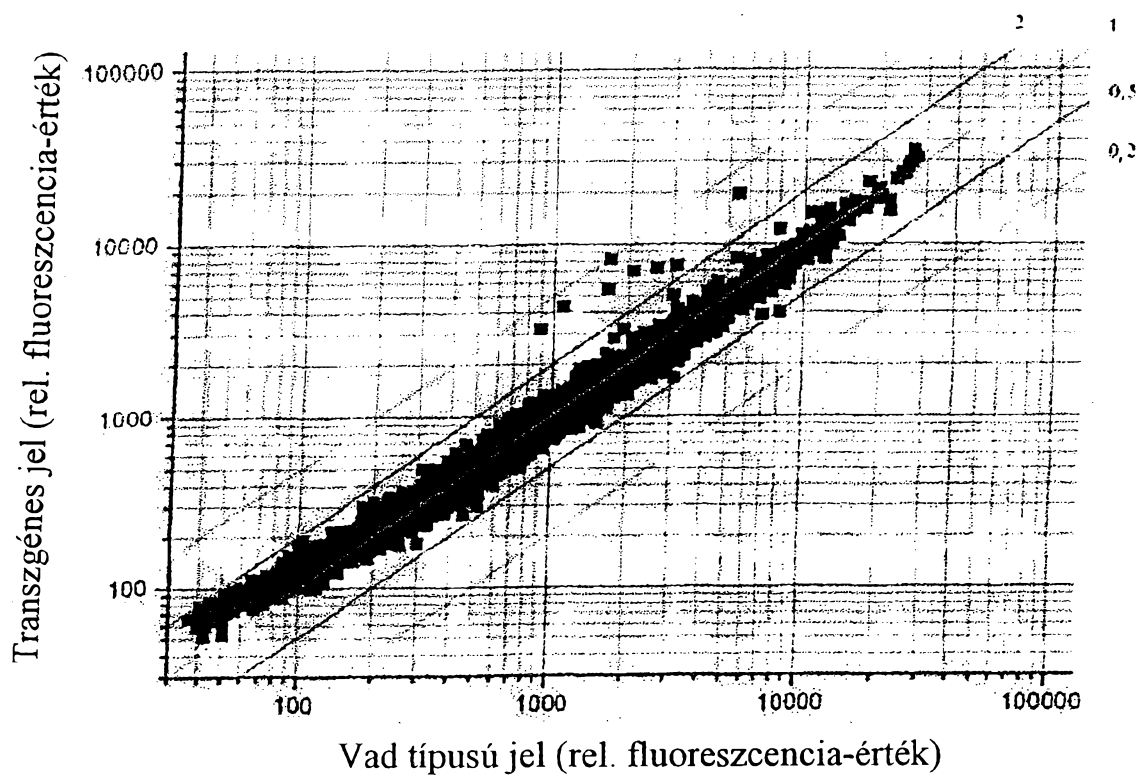
24. A 22. vagy 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépésben a géntermék által közvetített funkció detektálására alkalmas paraméterként intracelluláris Ca-felszabadulást mérünk.

25. A 19-22. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása krónikus vagy akut oxigénhiányos állapotokkal összefüggő betegségek kezelésére (és/vagy ilyen betegségek kezelésére szolgáló hatóanyag előállítására), mely betegségek példái a következők: szívinfarktus, szívelégtelenség, szívizom-rendellenességek, szívizomgyulladás (myocarditis), pericarditis, perimyocarditis, szívkoszorúér-betegség, öröklött szívdefektusok jobb-bal kamrai egybenyílással, Fallot-tetralógia/pentalógia, Eisenmenger-szindróma, sokk, végtagok hipoperfúziói, artéria-elzáródásos betegség (AOD), perifériás AOD (pAOD), carotid stenosis, veseartéria-stenosis, kisérbetegség, intracerebrális vérzés, agyi véna- és sinus-trombózisok, érdaganatok, subarachnoideális vérzések, vaszkuláris dementia, Biswanger-betegség, subcorticalis arterioszklerózis encephalopathia, embóliával összefüggésben kialakuló agykérgi infarktusok, vasculitis, diabetes-eredetű retinopathia, különböző eredetű vérszegénységek konszekutív tünetei (például, aplasztikus vérszegénység, mielodiszpláziás szindróma, policitémia vera, megaloblasztikus vérszegénységek, vashiányos vérszegénység, veseeredetű vérszegénység, szferocitózis, vészes vérszegénység, thalassemiák, hemoglobinopátiák, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz-hiány, transzfúziós jelenségek, Rh-összeférhetetlenség, malária, szívbillentyű-helyettesítés, vérzéses vérszegénységek, fokozott lépműködéses szindróma), tüdőfibrózisok, emphysema, tüdőödéma: ARDS, IRDS, kiújuló tüdőembólia, daganatos betegségek (például, vastag-

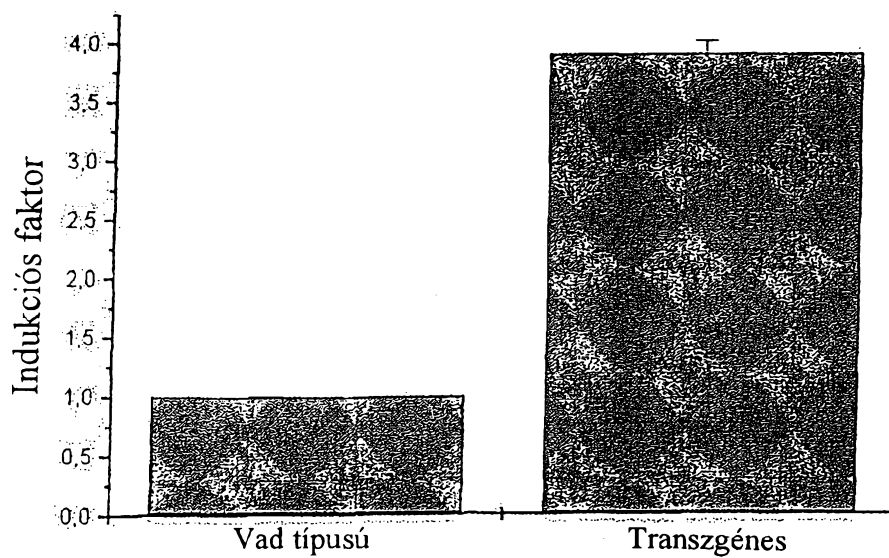
bél-karcinoma, emlőkarcinoma, prosztatákarcinoma, tüdőkarcinoma), immunrendszeri rendellenességek (például, autoimmun betegségek, előnyösen diabetes, psoriasis, immunhiányos állapotok, szklerózis multiplex, reumaszerű ízületi gyulladás, atópiák, asztma), vírusfertőzések okozta betegségek (például, HIV, hepatitis-B vagy hepatitis-C fertőzések), baktériumfertőzések (pl., Streptococcus- vagy Staphylococcus-fertőzések), degeneratív rendellenességek, különös tekintettel a neurodegeneratív rendellenességekre, mint például, az izomsorvadás, graft-versus-host betegség (pl., máj-, vese- vagy szívtültetésekénél), illetve egyéb neurológiai rendellenességek (például, többek között, a következők: stroke, szklerózis multiplex, Parkinson-kór, subarachnoidealis vérzések, amiotróf laterális szklerózis, örökletes degeneratív ataxiák, Huntington-kór, neuropátiák, epilepsziás betegségek, agysérülések, Alzheimer-kór), izomlazítók (például, érzéstelenítéshez), endokrinológiai rendellenességek (például, osteoporózis vagy pajzsmirigy-elégtelenség) és bőrbetegségek (psoriasis, neurodermatitis), krónikus vagy akut fájdalom, genetikai betegségek, pszichológiai rendellenességek (pl., skizofrénia vagy depressziók), sebgyógyulás, szexuális funkciók támogatása, szív- és érrendszeri betegségek (például, isémiás infarktus, szívelégtelenség, szívritmuszavar, magas vérnyomás), agyműködés fokozása, neurodegeneratív rendellenességek (előnyösen Alzheimer-kór és Parkinson-kór), izomsorvadás, vírusfertőzéssel összefüggő betegségek, daganatos megbetegedések és autoimmun betegségek vagy agyi isémiák.

26. Eljárás ee3-protein vagy natív allélje celluláris kölcsönhatási partnerének azonosítására „kéthibrides élesztőrendszer” alkalmazásával.

27. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia vagy a 8-10. igénypontok bármelyike szerinti géntermék alkalmazása ee3-protein által közvetített szignáltranszdukcióban szerepet játszó további proteinek azonosítására.

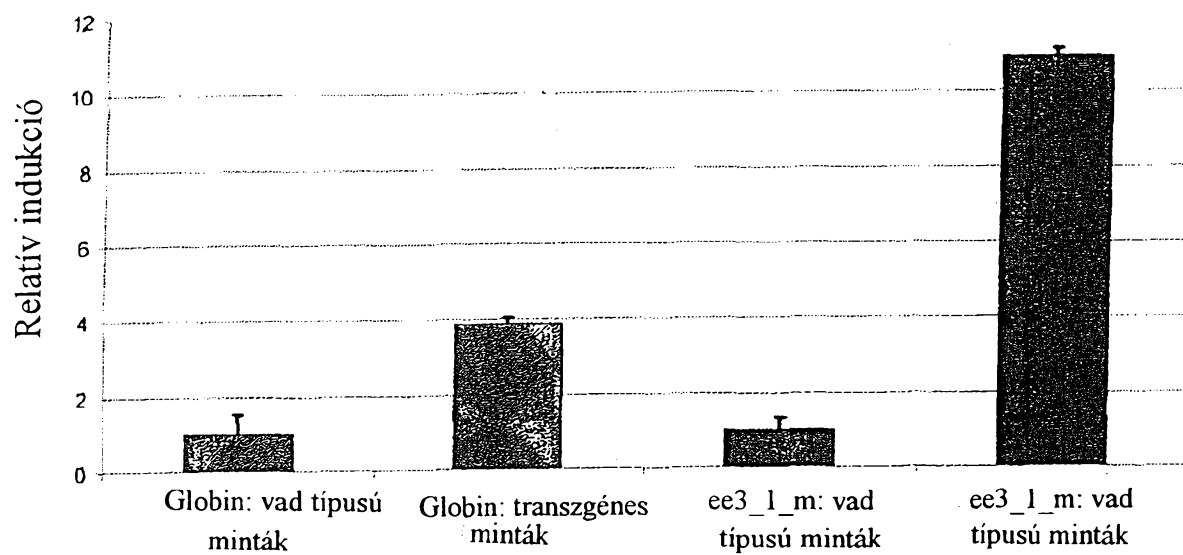


1A ábra

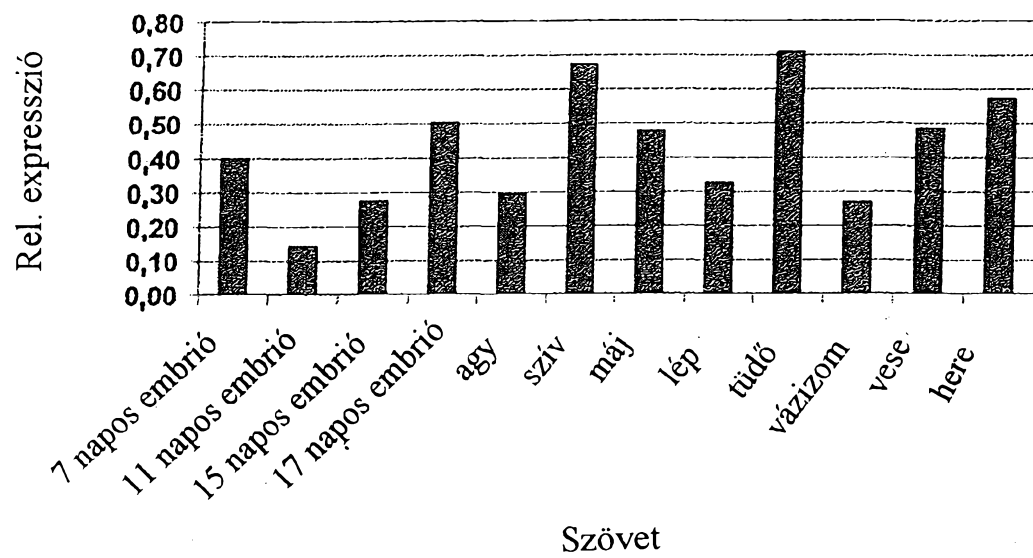


ee3_1_m

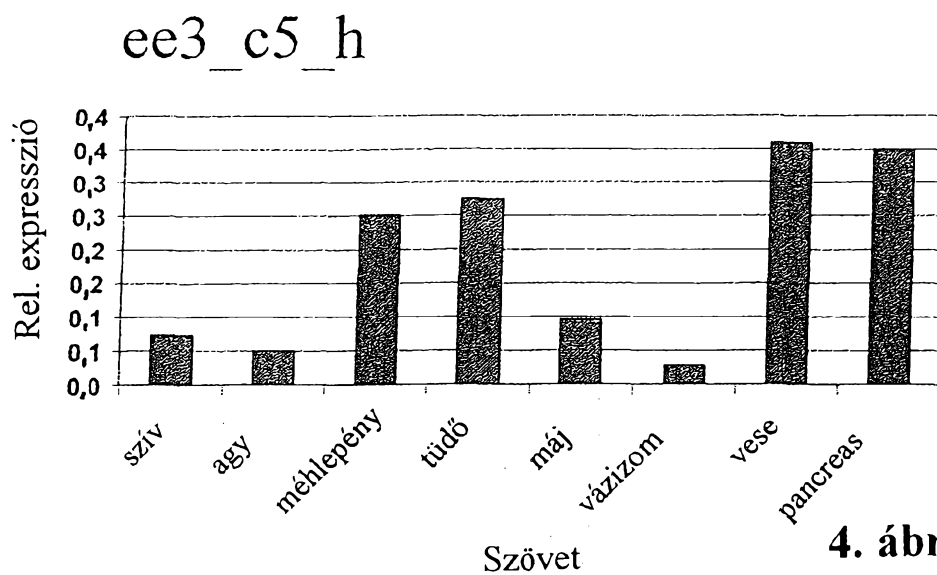
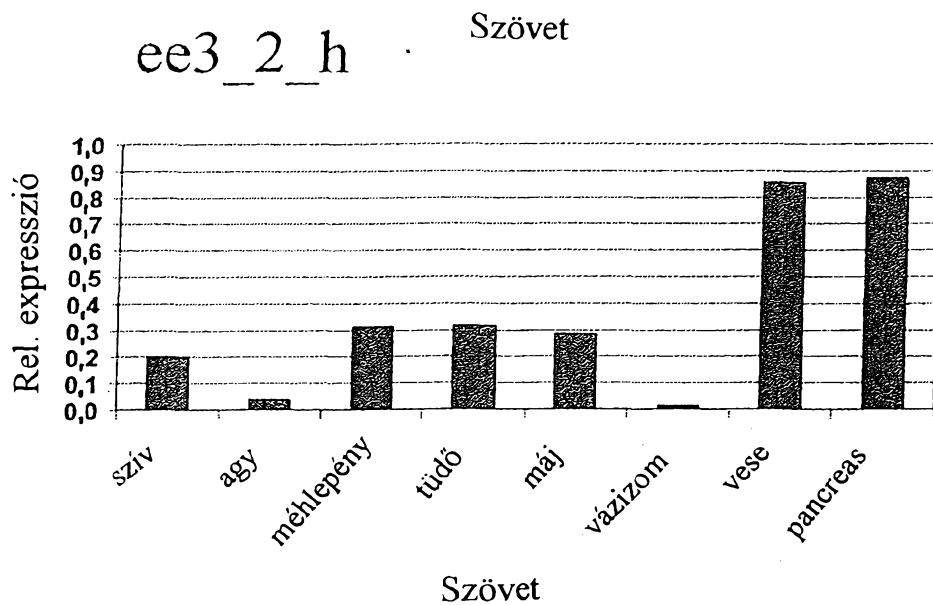
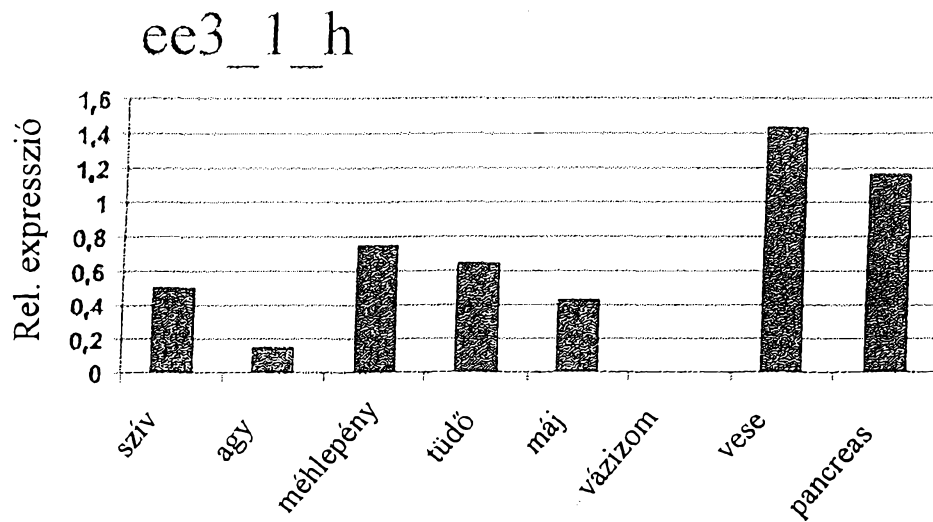
1B ábra



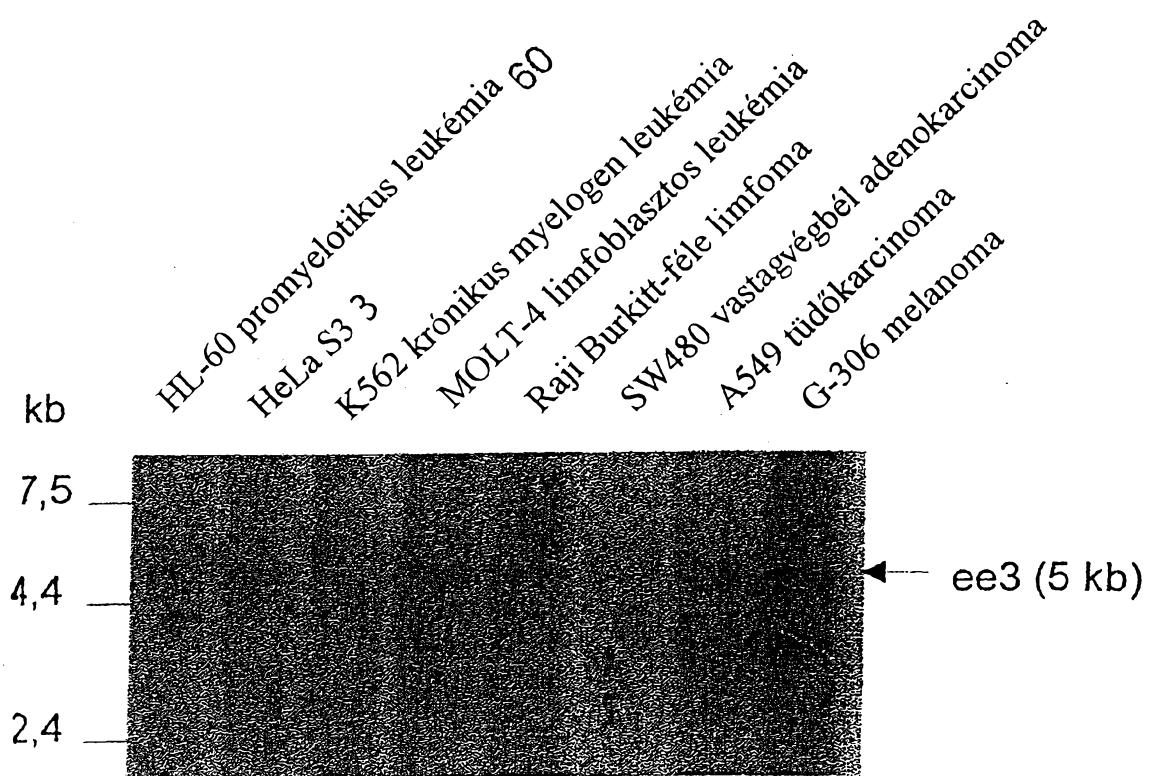
2. ábra



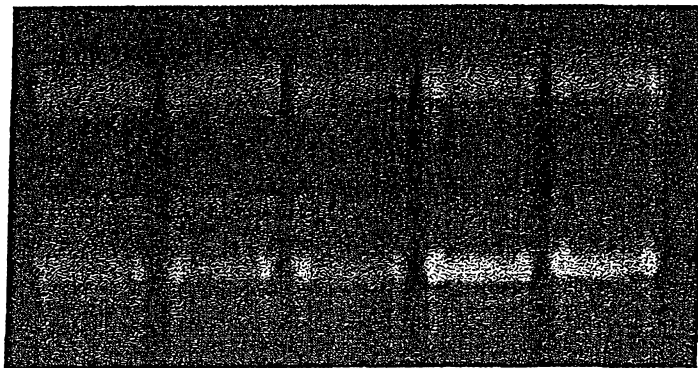
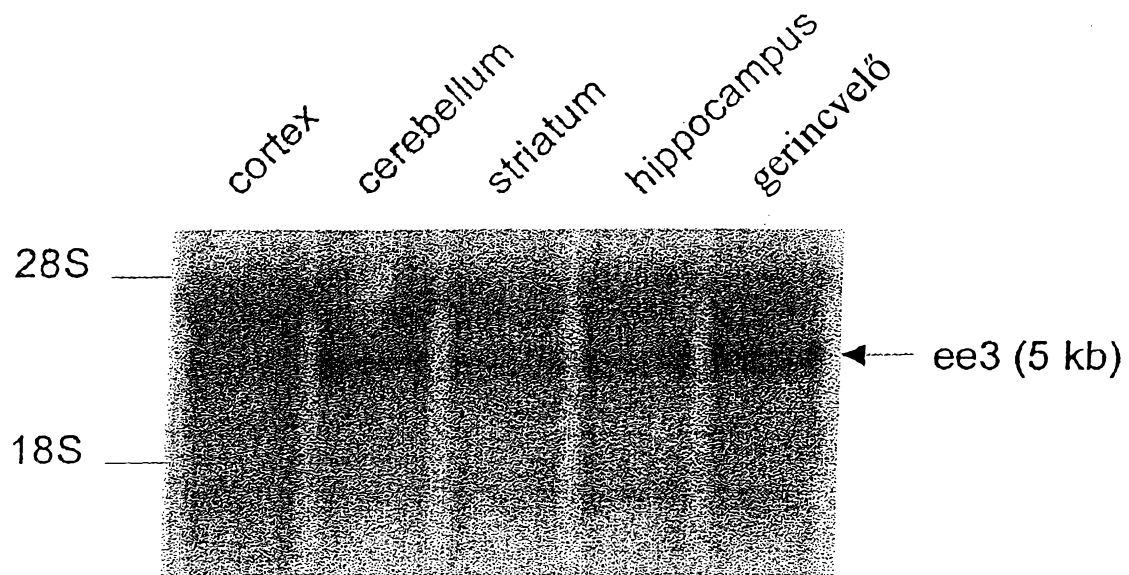
3. ábra



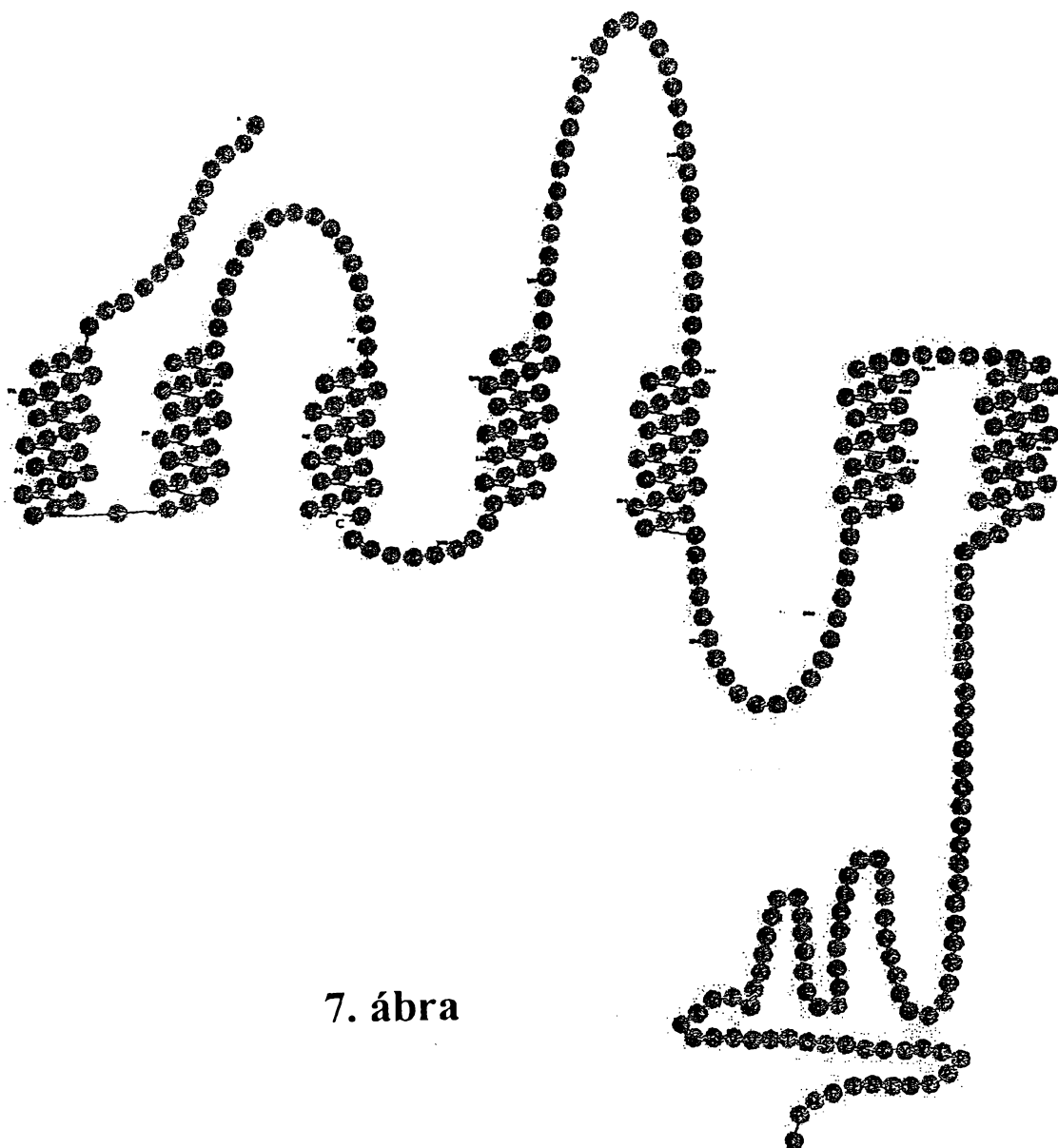
4. ábra



5. ábra



6. ábra



7. ábra

8. ábra (1. rész)

	190	200	210	220	230	240
human_pro.	MFEVLVC....	DRIERGSH.....		FWLLVFMPLFFVSPVSVAAAC		
ee3_2_h	MFEVLVC....	DRVERGTH.....		FWLLVFMPLFFVSPVSVAAAC		
ee3_c5_h_e						
droso ee3	MFELLAC....	DKLTSDRH.....		LWVLVFIPLIFGSVSVVGAC		
c.elegans	FVSLVF.....	IKLEFDYLFEPG.....		YPLPWTIVFCPLFSLSILSIGIA		
dc32_bio		AKLEQFTTMNLSYVF.....		IPLWALLAGALTELGIN		
ccr5_human	LACIAV.....	DRYLAIHVHAVHAYRHRRLLSIH.....		ITCGTIWLVGELLALPEILF		
c5ar_human	LATISA.....	DRFLLVFKPTWCQNERGAGLA.....		WIACAVAWGLALLLTIPSEFL		
dop21_huma	NLCAISI.....	DRYTAVAMPMYNTYSSKRRV.....		TVMISIVVWLSETISCPLLE		
cons famA						
pfam_famA	LtaISi.....	DRYLAIvhPlryrrrrtsprAk.....		vvillvWvlalllslPpllf		
cons famB						
pfam famB	mLv.....	EGlYLyLlvvtvevffserkr.....		lwYlliGWGvPavfvtiwa		
pfam_famC	KTirVl.....	riFrgakkpgstqkpkfisp.....		waqvlivliltliQviicv		
	250	260	270	280	290	300
human_pro.	VWGF....	RHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIIHW.....		PWLVCVPL		
ee3_2_h	VWGF....	RHDSLELEILCSVNILQFIFIALKLDRIIHW.....		PWLVEVPL		
ee3_c5_h_e						
droso ee3	VWAV....	KHDSFELELEFLAVNALQFVSLPLKLDREVVW.....		NWDVVFVPM		
c.elegans	IWSL....	RHDKPFEEFEFFYAINIVQLVFIAFKLDKQVDW.....		TWAVVFIPL		
dc32_bio	VFFV....	RD~				
ccr5_human	AKV....	SGGHNNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSR.....		FLYHVAG		
c5ar_human	YRVV....	REEYFPPKVLGVDYSHDKRRER.....		AVAIVRVLG		
dop21_huma	GLNN.....	ADQNECIAN.....		PAFVYSSIVS		
cons famA						
pfam_famA	swvk....	tveegngtlnvntvClidfpeestasvst.....		wlrsyvlstlv		
cons famB						
pfam famB	ivr....	pdkygpilaegpagygnegcCwlsndtnsg.....		fwWiikGPilli		
pfam_famC	iWLvv...	ePPrpdidiysekekeedeDvsiapiileCnkgs.....		vvaFlvvLgYdg		
	310	320	330	340	350	360
human_pro.	WILMSFLCLVLYYIV....	WSVLFRLSMDVIAEQRRTH.....				
ee3_2_h	WILMSFLCLVLYYIV....	WSLLFLRLSDVVAEQRRTH.....				
ee3_c5_h_e				RTH.....		
droso ee3	WIVICLSLVSVLYNIIF....	CGIMMRTPEVSLQQKK.....				
c.elegans	WVLSLAAGVLYALVL....	SVVLIRSRHFIPAHRROH.....				
dc32_bio						
ccr5_human	FLPMLVMGWCVGVV....	HRLRQAQRRPQRQKAVR.....				
c5ar_human	FLWPLLTLTICYTFIL....	LRTWSRRATRSTKTLK.....				
dop21_huma	FYVPFIVTLLVYI....	KIYIVLRRRRKRVTNKRSSRAFRAHLRAPLKGNCTHPEDMK				
cons famA						
pfam_famA	FllPllvilvcYtrIl....	rtlrkaakt.....				
cons famB						
pfam famB	ilvNfiffinilriLv....	qKlridslspqtgetdqyrkrlvks.....				
pfam_famC	lLavletllAFltRnl....	PvdnFNEAKfItFS.....				

8. ábra (2. rész)

	370	380	390	400	410	420
human_pro.						
ee3_2_h						
ee3_c5_h_e						
droso ee3						
c.elegans						
dc32_bio						
ccr5_human						
c5ar_human						
dop21_huma	LCTVIMKSN	GSFFVNRR	VEAARRAQ	ELEMMLSS	TSPPERTRY	SPIPPSHH
cons famA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famA						
cons famB	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famB						
pfam_famC						
	430	440	450	460	470	480
human_pro.						
ee3_2_h						
ee3_c5_h_e						
droso ee3						
c.elegans						
dc32_bio						
ccr5_human						
c5ar_human						
dop21_huma	HHGLHSTPD	SPAKPEKN	GHAHDHPK	IAKIFEIQ	TMENKTRT	SLKTMSRR
cons famA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famA						
cons famB	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famB						
pfam_famC						
	490	500	510	520	530	540
human_pro.						
ee3_2_h						
ee3_c5_h_e						
droso ee3						
c.elegans						
dc32_bio						
ccr5_human						
c5ar_human						
dop21_huma	TQM.....	LAIVLGVF	IICWLPFF	FITHILNI	H.....	CDCNIPP
cons famA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famA						
cons famB	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
pfam_famB						
pfam_famC						

8. ábra (3. rész)


```

                    550      560      570      580      590      600
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....AFSCIPFVPLWLSLITLM.ATTF.~.....
ee3_c5_h_e .....TFSYVSIFVPLWLSLLTLM.ATTF.~.....
droso ee3 .....TFSCISISVPLWLLLLTLM.TTTF.~.....
c.elegans K.....FPYIVVFSPLLVSILALIVLSSSA~.....
dc32_bio .....WPDKGSVS.....ELSYTLAMAPLQVSFFFMAIMSAGF~...GGP
ccr5_human RLKAVDNTCKLNGSLPVAI.....TMCEFLGLAHCC~NEMLYTFA~...GV
c5ar_human SPTFLLLNLKD.....SLCVSFAYINCCI~NPIIYVVA~...GQ
dop21_huma .....VLYSAFTWLGYN SAVNP I IYTTF.~...NI
cons famA .....~NPXIY~.....
pfam_famA liimsstCelervlp.....tallvtlwLayvNsclNPiIY
cons famB .....~QGXXVXXXXC~.....
pfam_famB G.....tllslvflylfliLnSfQGffVavly...Cf
pfam_famC saedykvq.....vaveifsilaSstvlLgclFaPK.....cY

                    610      620      630      640      650      660
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....GQKGGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHHEDN...EETEETPVPEPPK
ee3_c5_h_e .....RRKGGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHHEDS...EDAEETSVPEAPK
droso ee3 .....RPKRGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHQEDS...EGAEETLVPEAPK
c.elegans ...KGGNMWWFGIRKSFSQFLLSAMPFLQEYGNISYHP...ETHSNAQSMPLDAASSST
dc32_bio SSTPQTNIWWFGIRKPLCPFLLEKCPSLRITYAN...PENGEEREAVIGEENEERDEADV
ccr5_human KFRSRLSRLTKLGCTGPASLCQLFPSSWRSSLSSESENATSLTTF
c5ar_human GFQGRRLRKSLLRNVLTEESVRESKSFTRSTVD TMAQKTQAV
dop21_huma EFRKAFLKILHC
cons famA ~~~~~
pfam_famA ~~~~~
cons famB ~~~~~
pfam_famB lNgEV
pfam_famC IILfkPekN

                    670      680      690      700      710      720
human_pro. ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ee3_2_h .....IAPMFRKKARVVITQSPGKYVLPPP.....
ee3_c5_h_e .....IAPIFGKKARVVITQSPGKYVPPPP.....
droso ee3 .....IAPVFGKTRVLI...PGKYVPPPP.....
c.elegans SMAASEQLHEFHKHKDKSKKGAKN DIL.....
dc32_bio GAI VNGNERRRNQ RD KGRGSGGSQNSQEGGQNL YEKKYFFY IKNHKNSKFSPKKNYNPSE
ccr5_human
c5ar_human
dop21_huma
cons famA
pfam_famA
cons famB
pfam_famB
pfam_famC

```

8. ábra (4. rész)

	730	740	750
human_pro.			
ee3_2_h			KLNIEMPD
ee3_c5_h_e			KLNIDMPD
droso ee3			KLNIDMPD
c.elegans			KPVVPFVSLDLPD
dc32_bio	QIASSSAATIRAMAQYRNEFGYQWKGD	ISQPD	
ccr5_human			
c5ar_human			
dop2l_huma			
cons_famA			
pfam_famA			
cons_famB			
pfam_famB			
pfam_famC			

8. ábra (5. rész)

1. azonosítószámú szekvencia: ee3_c1 (egéreredetű) nukleinsavszekvencia

gccggaaggagtgtgggagacagttggttgcctctggtttctcctggcgggcggttagcgacgaagctgcctttggcagc
atgaacccgctgtgaggcgaggtctcgcggcgcggggggcgaggagagagcctcgggcgaagttctccgcca
TGAACCTGAGGGGCTCTTTCAAGACTTCAACCCGAGTAAATTCCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTA
CTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATCATTCAATGGAGCTACTGGGCTGTCTTTGCTCCAATATGGTTGTGGAAGTTAATGGT
CATTGTTGGCGCATCAGTTGGAAGTGGAGTTTGGGCACGAAATCCTCAGTATCGAGCAGAAGGAGAAACATGTGTGGAGT
TTAAAGCCATGTTAATTGCTGTGGGCATCCATTGCTCCTGTGATGTTTGAAGTTCTGGTCTGTGACAGGATTGAGAGA
GGAAGCCATTTCTGGCTTCTGGTCTTCATGCCATTGTTCTTTGTTTCCCCAGTGTCTGTTGCAGCATGTGTCTGGGGCTT
TCGACATGACAGGTCACTAGAGCTAGAAATCCTGTGTTCCGTCAACATTCTCAGTTTATATTTCATTGCCTTAAGACTGG
ACAAGATTATCCACTGGCCCTGGCTTGTGTGTGTGTCCCTCTGTGGATTCTCATGTCTTCTTGTGCTGGTGGTCTCTC
TATTACATCGTTTGGTGGCTTCTGTTCTGCGCTCTATGGATGTGATTGCAGAACACGCAGAACACATATAACCATGGC
ACTGAGCTGGATGACCATTGTGCTGCTCTTCTTACTTTTGGATCCTGCTGGTTCAAACTGGATGGCCACAATGCTT
TCTCCTGTATTCCAATATTTGTTCCCTGTGGCTCTCATTTGATCACACTGATGGCAACAACATTGGACAGAAAGGAGGA
AACCCTGGTGGTTTGGTATTTCGCAAGACTTCTGCCAGTTTCTGCTTGAATATTTCCCGTTTTTGGAGAGGTATGGAAA
CATTTTCATATGATCTCCACCATGAAGATAGTGAGGAAACAGAAACCCAGTTCAGAACCTCCTAAAATTGCACCTA
TGTTCCGCAAGAAGGCCAGGGTAGTCATCACCAGAGCCCTGGCAAGTATGTCCTTCTCCACCCAACTAAATATTGAA
ATGCCAGACTAAaggacgccaccagggcgccggagtgtgtgtgcactgagacacacactcctacttcccttgccccaa
cctagacctggaacctcgaccaccatctgaagcctcggttgcatccagtgtcaaccagccactcagaacagaacatagg
tggcagggactaagggtatcttatcaatgtggatgcagtgacacatyagcaaaagacctatttcttctcgatgggtacc
tgaaatgtgttctcattctctgtgataccaccagggatgactgctgcctaggccacagaaagcacatctgtgggtctgg
gcagatttctagtgtctaaaattcctatcaaaagtattgatgtgtgtgctccttggaacttcactctgtgctaaactggctg
ctatggtagcagaaggactataagaggtctgacacactgtgtgtcagatcagccggccctgcttccctgtctctgctgac
agaaattagcttagccaggatgacagcaggggtgagggcctcatcagtgagcccttcccaatggcatgattccatgct
atatagattatacagctatttttagcactgtaatatagctgtcaaatcctagtctgtacagcatattctctgtttaaag
tatttttttacaagcttgtgctggagatggatgggttaaagccatgggagagcagatagctcagactgctgtatctcagt
cagatggcccccactcacttaccatgcccactgataccctggaatttctgcccagcacagctactacaatcaaggaaagctc
tgtgcttttccaacatgggggtgtgggagaaatggcttaaaagcccaagaaatgcccccttgagaccaggacactagagaa
gggttgccaaggcagggcagaatcagccaggaactcctgcaaagtcgagagcattctgcctacctgcaagaagaacactgc
atactgggcatgcaggtaccaccactgtcagcagtttctccaggctctgctggtatagccagcccagaacctatcatac
cagaaaataaccttcagtctaaatcaaatgattcattcatggtcacctgatcagtggttcagtcacacataattgaagt
ctctaaccctagtccctacccttggcacaggcctccagtgagcctgttctgtttcagaagaaaggggaagcagtgtagcat
ttttgtttgggtctcttaaaaatgtggttaaatccactatttttgcctctgtagttcaataaagtggttcattttacat
gtaaaaaaaaaaaaaaaa

9A ábra

A DNS-mátrixon eredetileg azonosított EST („epoest3”) nukleotidszekvenciája:

acaagcttgtgctggagatggatgggttaaagccatgggagaagcagatagctcagactgctgtatctcagtccagatgccccac
ctcacttaccatgcccactgataccctggaatttctgccagcacagctactacaatcaaggaaagctctgtgcttttccaaca
tgggggtgtgggagaaatggcttaaaagcccaagaaatgcccccttgagaccaggacactagagaaggttgccaaggcaggcca
gaatcagccaggaactcctgcaaagtcgagagcattctgcctacctgcaagaagaacactgcatactgggcatgcaggtacca
ccacctgtcagcagtttctccaggctctgctggtatagccagcccagaacctatcataccagaaaataaccttcagtctaaat
caaatgattcattcatggtcacctgatcagtggttcagtc

9B ábra

2. azonosítószámú szekvencia: ee3_2 (egéreredetű) nukleinsav szekvencia

```
gtcgccgagtcgcgcagcgcgccaggtcccatccgactccgcacgcaacgcggcgctcggtcctcgtggctgcgaaatgaagg
cagacggcgtgagcatccactgaagcctgagctacggggttggggcagtggtccccggcgtaggcaccgtagcggttcgcgg
ccagcgcacgctgtgcccctcggtcctcgttcgggcccggccacgtjactgctcgacagtggttcgggcccctcggagctgcg
gtctggagcctctaacacgcagcgggcggtatgcccatctagaggcagtagcgccttcgccATGAACCCAGGGGCTGTT
CCAGGACTTCAACCCAGTAAGTTCCTCATTTATGCCTGCTTGCTACTCTTCTCCGTGCTGCTGCCCCCTGGCCTGGACG
GCATCATCCAGTGGAGCTACTGGGCAGTCTTCGCCCCCATCTGGCTGTGGAAGCTCCTGGTCATCGTGGGCGCCTCGGTG
GGTGGGGCGGTGTGGGCCCCGAACCCACGCTACCGTACAGAGGGGGAAGCCTGCGTGGAATTCAAAGCCATGCTTATCGC
CGTGGGCATCCACCTGCTACTACTCATGTTGAGATACTAGTCTGCGACAGGGTGGAGAGGGGCACCCACTTATGGCTGC
TGGTCTTCATGCCACTCTTCTTCGTTTCCCCTGTGTCCGTGGCCGCTGTGTCTGGGGCTTCCGACACGACAGGTCTTTG
GAACTGGAGATCCTGTGCTCTGTCAACATCCTGCAGTTCATCTTCATCGCCCTGAGGCTGGACAGGATTATCCACTGGCC
GTGGCTAGTGGTGTTCGTGCCCCCTGTGGATCCTCATGTCAATTCCTCTGCCTGGTAGTTCTCTATTACATCGTGTGGTCCC
TCCTATTCTGCGGTCCCTGGATGTGGTTCAGAGCAGCGAAGAACACATGTGACCATGGCCATCAGCTGGATCACCATT
GTCGTGCCCCCTGCTCATTTCGAGGTCTGTAGTTCACAGACTGGATGACCACAATACGTTCTCTTACATTTCCATTTT
CATCCCGCTTTGGCTCTCATTACTGACTTTGATGGCTACAACGTTCCAGGCGAAAGGGGGCAATCATTGGTGGTTTGGGA
TTCGCAGGGATTTCGTGTCAGTTTCTACTAGAAGTTCCTCGTTTTTAAGAGAATATGGAAATATCTCTTACGATCTCCAT
CACGAAGACAGTGAAGATGCTGAAGACGCATCGGTGTGAGAAGCTCCGAAAATTGCTCCAATGTTTGGAAAGAAGGCGCG
GGTAGTTATAACACAGAGCCCTGGGAAATATGTGCCTCCACCTCCCAAGTTAAACATTGATATGCCAGACTAAactcaca
ggctgggcctttcagtgaaataagaaccatatacccttgaattccacttttgcttttttcttgtgttcatccagtcctgga
attggaacaggtccccctcattttacatccacactgagacagaagtctcttgcagtggtcattgtgtgccgtaggcaga
agggggaaactgtaggactgtgggatgtgtacataatgtgcaagagaacttgctttccaggcccatcttgtgagctag
ccaaagggtggtaaatcgaattgtttctaggccttcaaaagacctgaaaactacatagctgtttgttttaaagtgtactt
atgcctaccaaagattgttttaaaaagtatttttatacactgctagtctaaaattgtatttttagattgcaccattgtg
acaaaatggcaaatgtaccaaatgtccccctccactgttccttaaacctcattgttgggtgtttctagtgtcctactgt
tcaaatagtgttttctgtgggctttgcggacacaggtctctagtatttctaatagatgaattttctaattggagtgaatct
gcataatattagtatttatatgaatgttttagcagtggtatctgtgttgattgtagttcttggcagtaattgtattgtgta
aagtatttttttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

10. ábra

3. azonosítószámú szekvencia: ee3_1 (egéreredetű) nukleinsavszekvencia

gcagcagcgtggacgcggctggcgtggcgccatgaacccgctgtaaggcgaggctgtgcagcaggggtgcgggggag
gaggaggaggaggacgcgcgggtgaagtctccgccATGAACCTGAGGGGCTCTTCCAGGACTTCAACCCGAGTAAATT
CCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATCATACAGTGGAGTTACTGGG
CTGTCTTTGCTCCAATATGGCTGTGGAAGTTAATGTCATTGTTGGAGCCTCAGTTGGAACCTGGAGTCTGGGCACGAAAT
CCTCAATATCGAGCAGAAGGAGAAACGTGTGTGGAGTTTAAAGCCATGTTGATTGCAGTGGGCATCCACTTGTCTTGT
GATGTTTGAAGTTCTGGTCTGTGACAGAATCGAGAGAGGAAGCCATTCTGGCTCCTGGTCTTCATGCCGCTGTTCTTTG
TTTCCCCGGTGTCTGTTGCAGCTTGCCTTTGGGGCTTTTCGACATGACAGGTCAGTACAGTTAGAAATCCTGTGTTCTGTCT
AACATTCTCCAGTTTATATTCAATTGCCTTAAGACTGGACAAGATCATCCACTGGCCCTGGCTTGTGTGTGTGTCCCGCT
GTGGATTCTCATGTCCTTCTGTGCCTGGTGGTCTCTACTACATTGTGTGGTCCGTCTTGTCTTGGCTCTATGGATG
TGATTGCGGAGCAGCGCAGGACACACATAACCATGGCCCTGAGCTGGATGACCATCGTCTGGCCCTTCTTACATTGAG
ATTCTGTGGTTTCAAACTGGATGGCCACAACGCTTCTCCTGCATCCGATCTTGTCCCCCTTTGGCTCTCGTTGAT
CACGCTGATGGCAACCACATTTGGACAGAAGGGAGGAAACCACTGGTGGTTTGGTATCCGCAAAGATTTCTGTCAGTTTC
TGCTTGAAATCTTCCATTTCTACGAGAATATGGAACATTTCTATGATCTCCATCACGAAGATAATGAAGAAACCGAA
GAGACCCAGTTCCGGAGCCCCCTAAAATCGACCCATGTTTCGAAAGAAGGCCAGGGTGGTCATTACCCAGAGCCCTGG
GAAGTATGTGCTCCACCTCCCAAATTAATATCGAAATGCCAGATTAGatgccacttccggggacagagcttaagtggg
ctgggacgcactctctccgcttctctgccccctcggttcccccgacagaccagaaccagtaactggagctgggtctccag
gtacgtccatctcatgccttgtttgcatccagcgctatcagccactcaccaggacgggacgcggaagtggcagggtgacg
gggggtgtgtgccagcagatgcggatgccaggaagagtgtgagaacaggggtgggattaccgtctgtctgggaggggctcc
aggtacccctcttccccgtcagaccactgggagatggctgcttgccaggccccagaaggaacatctgtctatacgggtg
ctgaaatcccaatcaaaagtattgttttagaatgtatttctccacagggctgacctctgcagctcgctgagcactccca
ggctctcagcactccaggtcgtggctggggcagtcagtaggaactgtaactatgtctctgatgcaccacgtgttttagac
acagcacagtcctttttctgttccactgtggaagtgttctcttgggcatgctgacagcagttttcatagcctca
cggatgagccctttctacgggagtgactccatgcttgtatcacagagtatttatacaaatgttttagcatcttcatatgcg
gtgttaacccctagtctgtacagcatattctgttcaagtatttttttacaatatctgttcaagtdtttttttacaagc
ttgtgctgtaggcacatgccttctgccctggaactcgtgcaggtacgtagtagctgctactgccacaacggcaacaccaa
gcaagagatgggtccatgcttttctgacgttctcagaatagtggtcagcttcaaacctgacaagcgtgcttgaagccgga
acactagagaatgttctgtgagagcagaaacggccacgcgggtcacgactatgcgtgggaaagtctcaagcttccctcctg
ccagcaacaagaaggctttggagtaggcagatgattttcacgtgtgcgtgccgtttctccaagcactgcaggttccaccg
tgtgtcagaggctgcaagtttaacatcctcctgcctgaaaacaaataggctccttctgtgaaaagagggtaaaaaaagagc
tttgatcttctcagccaggagaagaggggtgttttcacgcgggcaactgctcgcggcctacatgggggttaattcaag
tctgctgcgagcagcactccgccccttggcactggcctccagcaagccctgttctcttgggggtacaggggaacgggatgg
tttagactttctgctcagtggtgtaaaaaatgtagctaaagccactattttctctccttaagctgttcaataaacccg
ttcctcatttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

11A ábra

3/b azonosítószerű szekvencia: ee3_1b_h (humán) alternatív „splice”-termék nukleinsav-szekvenciája

gcagcagcgtggacgcggcttgccgctggcccatgaaccgcgtgtaaggcgaggetgtgcagcacggggtgcgggggag
gaggaggaggacgccgcggtgaagttctccgccATGAACCTGAGGGGCTCTTCCAGGACTTCAACCCGAGTAAATTCCCT
CATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTGGATGGCATCATACAGTGGAGTTACTGGGCTG
TCTTTGCTCCAATATGGCTGTGGAAGTTAATGGTCATTGTTGGAGCCTCAGTTGGAACGGAGTCTGGGCACGAAATCCT
CAATATCGAGCAGAAGGAGAAACGTGTGTGGAGTTTAAAGCCATGTTGATTGCAGTGGGCATCCACTTGCTCTGTGTGAT
GTTTGAAGTTCTGGTCTGTGACAGAATCGAGAGAGGAAGCCATTTCTGGCTCCTGGTCTTCATGCCGCTGTTCTTTGTTT
CCCCGGTGTCGTTGCAGCTTGCGTTTGGGGCTTTCGACATGCAGGTCCTAGAGGTGAGATTTTCATATATTTAAGAAT
GTTTTCCACTTTGGGAGGTCAAGGCAGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAgaccagcctggccaacatggtgaaac
cccatctctacttaataatacaaaaaattagccgggtgtggttggcatgcgccagaatcccagcttctccggagggtgaggc
gggagaatctcttaaccaggaggcggtgagttgcagtgcagcaagattgaaccattgcactccagcctgggtgacagaat.
gaaactccgtcttaaaaaaaaaaaaaaaaaa

11B ábra

3/c azonosítószámú szekvencia: ee3_l_c_h (humán) alternatív „splice”-
termék nukleinsav-szekvenciája

```
aacgctagcatggatctcggggcccaataatgattttatatttgactgatatgtgacctgttcggttgcaacaaattgatga
gcaatgctttttataatgccaaactttgtacaaaaagcaggctctaccATGAACCTGAGGGGCTCTTCCAGGACTTCA
ACCCGAGTAAATTCTCATCTATGCCTGTCTGCTGCTGTTCTCTGTGCTGCTGGCCCTTCGTTTGGATGGCATCATACAG
TGGAGTTACTGGGCTGTCTTTGCTCCAATATGGCTGTGGAAGTTAATGGTCATTGTTGGAGCCTCAGTTGGAAGTGGAGT
CTGGGCACGAAATCCTCAATATCGTTAGaaatcctgtgttctgtcaacattctccagtttatattcattgccttaagact
ggacaagatcatccactggccctggcttgtgtgtgtgtcccgtgtggatttctcatgtcctttctgtgcctgggtgtcc
tctactacattgtgtgggtccgtcttgttcttgcgtctctatggatgtgattgcggagcagcgcaggacacacataaccatg
gccctgagctgaatgaccatcgctcgtgcccttcttaccatttgagattctgctggttcacaaactggatggccacaacgc
cttctcctgcatccgatctttgtccccctttggctctcgttgatcacgctgatggcaaccacatttggacagaagggag
gaaaccactgggtggtttggtatccgcaaagatttctgtcagtttctgcttgaaatcttcccatttctacgagaatatgga
aacatttcctatgatctccatcacgaagataatgaagaaaccgaagagacccagttccggagccccctaaaaatcgacc
catgttccgaaagaaggccagggtggtcattaccagagccctgggaagtatgtgtctccacctcccaattaaatatcg
aatgccagattaggacccagctttcttgtacaaagtggcattataagaaagcatttgcttatcaatttgttgcaacgaa
caggtcactatcagtcaaaaataaaa
```

11C ábra

4. azonosítószámú szekvencia: ee3_2 (humán) nukleinsav-szekvencia

ggcagaggcggtccgcccagggtcgcgggcggttggggagtcagcagcgcgceaggcccttcggggccccacacgcatt
 aggtgccttcttgatgggtacggagtgaaacggggcgggcggggacggaggcagcgccagtttgtaaccgcccgcgccc
 cccgtgcccgcgcgccacaccccagcggttccggcgggggccacgtgacgcgcggtgcaagtggttcgggctctcng
 cttegccggtccgaacctcctcctgggtcgteccggcattcgteccacgcgagcgcggttggcgggggccgggagggcggc
 ggccgggagaagccgqgagacgagcgcgccgagcggtcgcgagggagcaggccggggcaggcaagcgcgcgctccgccAT
 GAACCCAGGGGCTGTTCCAGGACTTCAACCCAGTAAGTTTCTCATCTACACCTGCCTGCTGCTCTTCTCGGTGCTGC
 TGCCCTCCGCTGGACGGCATCATCCAATGGAGCTACTGGGGCGTCTTTGCCCCATATGGCTGTGGAAGCTTCTAGTC
 GTCGCAGGCGCTCCGTGGGCGCGGGCGTTTGGGCGCGCAACCTCGCTACCGCAGGAGGGAGAGGCTGTGTGGAGTT
 CAAAGCCATGCTGATCGCTGTGGGCATCCACCTGCTGCTCATGTTGGAAGTCTGGTCTGCGACAGGGTGGAGAGGG
 GCACCCACTTCTGGCTGCTGGTCTTTCATGCCTCTCTTCTCGTGTCCCCCGTGTCCGTGGCTGCCTGCGTCTGGGGCTTT
 CGACACGATAGGTGCTGGAGCTGGAGATCCTGTGCTCGGTCAACATCCTGCAGTTCATCTTCATCGCCCTAAAGCTGGA
 CAGGATTATTCACTGGCCGTGGCTGGTGGTGTGTGTCCTGTGGATCCTCATGTGCTTCTTTCCTGCTGGTCTGCTCT
 ATTACATCGTCTGGTCCCTCCTGTTCTGCGGTCCCTGGATGTGGTGGCGAGCAGCGGAGAACACACGTGACCATGGCT
 ATCAGTTGGATAACGATTGTGCTGCCTCTGCTCACTTTGAGGTCTGCTGGTTCACAGATTGGATGGCCACAATACATT
 CTCCTACGTCTCCATATTTGTCCCCCTTTGGCTTCTCTTACTAATTTAATGGCCACAACATTTAGGGCGAAAGGGGGGCA
 ATCATTGGTGGTTTGGCATTGCGAGAGACTTCTGTGCTTCTGCTTGAATTTTCCATTTTAAGAGAATATGGGAAC
 ATTTTCATATGATCTCCATCAGGAAGATAGTGAAGATGCTGAAGAAACATCAGTTCCAGAGCTCCGAAAATTGCTCCAAT
 ATTTGGAAGAAGGCCAGAGTAGTTATAACCCAGAGCCCTGGGAAATACGTTCCCCCCCCCTCCCAAGTTAAATATTGATA
 TGCCAGATTAAactcctagagaggacccaggcacacacagactccacctggccttcgcctcttggttcattcatcccaaac
 ctggaaatggaaacaggcttcaaactcgtctcacgcggtgtttgagatcacgcctcatcagtatgcatcatagatgg
 aggtggtttcagtatgtgggtgtgtgtgtgtgtacctgggtaagagacttgctttccagggtcgcaactttcagggtgtag
 ctgggggcagtaagtcgaattgttttagtaggtcctcaaaaggaataaccacacagctgtttgtttaaattgctactgtac
 ctatcaaaactattgttttaaaaagtatttttatacactgctaatctaaaattgtatttcagattgtgcctgtcatacaaa
 tagcaaatgtaaaaagttctctttcccaccacttggtttataaacctcatagttgataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

A nukleinsav-szekvencia folytatásaként, 3'-irányban egy második, alternatív poliadenilációs szignál található:

....gatatttttagtggttcctactgtttaaatactctctccttgggctttgctgatactggtctttaatattctgataggtg
 aatttttctaagtgaatgaacccatgcataatatagtttatatgaatatttttagcagtgtaatatgttgtaattctagttctc
 tgcattaccattattacgtttaaagttatttttaaaagcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

12. ábra

5. azonosítószerű szekvencia: ee3_ (egéreredetű) aminosav-szekvencia

MNLRGLFQDFNPSKFLIYACLILF SVLLALRLDGIIQWSYAVFAPIWLWKLMVIVGASVGTGVWARPQYRAEGETCVE
FKAMLLIAGGIHLLLMFEVLVCDRIERGSHFWLLVEMPLEFVSPVSVAAACVWGRHRSLELEILCSVNILQFIFIALRL
DKIISFVWLVCVPLNLLMSFLCLVVLIIIVWSVLEFLRSMGVIAEQRRTHITMALSMTIVPELLTFEILLVHKLDGHNA
FSCIPIEFVPLNLSLITLMATTFGQKGGNHWWFGIRKDFCQELLEIFPFLREYGNISYDLHHEDSEETEETPVPEPPKIA
MERKKARVVITQSPGKIVLEPPKLNIEPFD

13. ábra

6. azonosítószerű szekvencia: ee3_2 (egéreredetű) protein aminosav-szekvenciája

MNERGLFQDFNPSKFLIYACLLLSVLLPLRLDGIQWSYMAVFAPILWKLLVIVGASVGAGVWARRPRIRTEGEACVE
FKAMLIIVGIIHLLIMFEIIVCDRVERGTHLWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGERHRSLELEILCSVNIIQITFIALRL
DRIIHWPWLVEVPLWILMSFLCLVLYIIVWSILLFLRSIDVVAEQRRTHVTMAISWITIVVPLIFEVLLVHRLDDHNT
FSYISIFIPLWLSILLTLMTTFRRKGGNHWWFGIRRDFOQLLEVFPFLREYGNISYDLHHEDSEDAEDASVSEAPKIAP
MFGKKARVVITQSPGKYVPPPKLNIDMPD

14. ábra

7/a azonosítószámú szekvencia: ee3_1 (humán) protein aminosav-szekvenciája

MNLRGLFQDFNPSKFLIYACLILFSVLLALRLDGIIQWSIWAVFAPIWLRKLMVTVGASVGTGVWARNPQYRAEGETCVE
FKAMLIAVGIEHLLLMFEVLVCDRIERGSHFWLLVEMPLFFVSPVSVAACVWGERHDSLELEILCSVNILQFTFFIALRL
DKIIEWFWLVVCVPLWILMSFICLVVLTYYVWSVLFIRSMOVIAEQRRTHITMALSMTIVVPLLTFEILLVHRIDGHNA
FSCIPIFVPLNLSLITLMATTFGQKGGNHWWFGIRKDFCQFLLEIFPFLREYGNISYDLHHEDNEETEETFPVEPPKIAP
MERKKARVVITQSPGRYVLPPFKLNIEPDP

15A ábra

7/b azonosítószerű szekvencia: ee3_1b_h (humán) protein aminosav-szekvenciája

MNLRGLFQDFNPSKELIYACLLLFVLLALRLDGIQWSIWAVFAFIWLKIMVIVGASVGTGVWARNPQYRAEGETCVE
FKAMLIIVGCIHLLLLMFEVLVCDRIERGSHFWLLVFMLFFVSPVSVAACTGGERHDSLEVRFHIFKNVFHFGRSRQVD
HLRSGV

15B ábra

7/c azonosítószámú szekvencia: ee3_1c_h (humán) protein aminosav-szekvenciája

MNLRGLFQDFNPSKFLIYACILLFSVLLALRLDGTIQWSYWAVEAPIWLWKLMVTIVCASVGTGVWARNPQYR

15C ábra

8. azonosítószerű szekvencia: ee3_2 (humán) protein aminosav-szekvenciája

MNPRGLFQDFNPSKFLIYTCLLLFSVLLPLRLDGIQWSIWAVFAPIWLKLLVVAGASVGAGVWARNPRYRTEGEACVE
FKAMLIAGVGIHLLLLMFEVLVCDRVERGTHFWLLVEMPLEFFVSPVSVAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALKL
DRIIHWPWLVEFVPLWILMSFLCLVVLTYIVWSLLEFLSLDVVAEQRRTHVTMAISWITIVVPLLTFEVLLVHRLDGHNT
FSYVSIFVPLWLSLLTLMATTFRRKGGNHWWEGIRRDQCFLLEIFPFLREYGNISDLEHEDSEDAEETSVPEAPKIAP
IFGKKARVVITQSPGKYVPPPKLNIDMPD

16. ábra

10. azonosítószámú szekvencia: humán ee3_5-cDNS

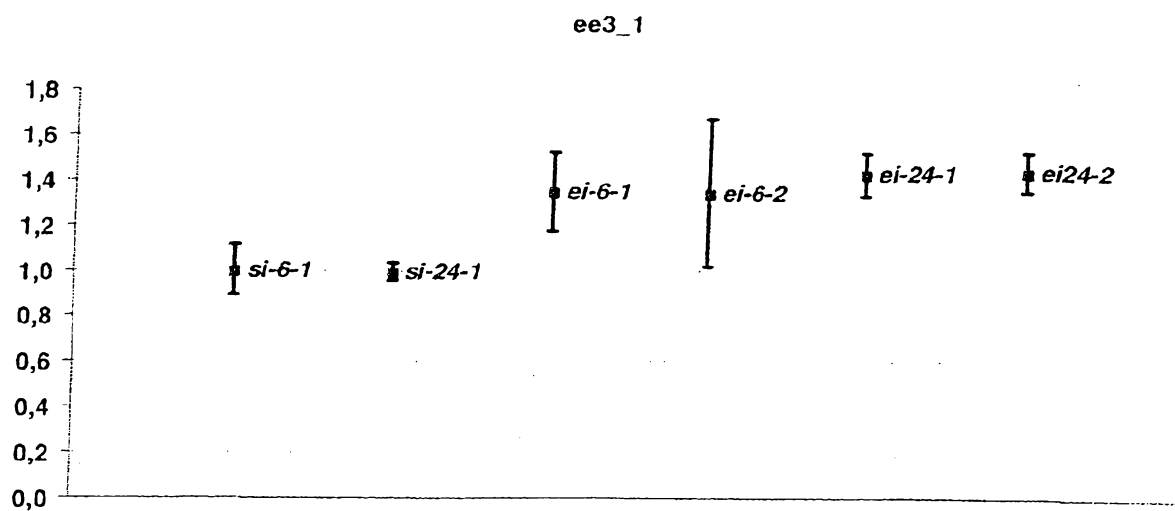
ttgggtaccgggccccccctcgagtttttttttttttttttttttgagacagagtctcactctgttgctcaggctacag
tgcagtggcagatcacagctcactgcatectccaactactgggcccagcaatcctcccacctcagccctgagtagctg
ggaccacaggtgtgtaccaccacaccccaactattttttgctttttttagagacggggtctccctgcccgtgccaggtgg
tcttgaactcctgggctcaagcaatccttctgcctcagtcctcctcaaagtgcctaggggttacaggcacatatcacctgccc
ggccagatgccttctcttataattgatagacaaagtagacaaaatcagtaaggatataaaaggggtgaacgttatcasc
aacttgacctaattagatatgtatagaacattccacccaatagcagactatgcattctcttcaagtgtacataacattta
tcaagacagaccacattctgggcccgaagacaagtctcaataaatttaaagggattcagtttaaataaatcaaaaaggtc
aggccacagtggaattaaattatcaataacagaaagatatctggaaaatccccaaatatttgagagtaataata
cgcttctaaagtatctcataggtcaaagaagtaattagaaagtatttgaattgaacgaaaatgaaaacacacatatcag
aatttgtggaatgccactaaagcagtgcttagagggaattcatagcagtaagcacctacattagaaaagaaagaaagag
ctgggacaggtgggtcagcgcctgtaattccaatacttttggaggccaaggcaggaggattgcttgagcccaggagctctà
agaccagcctgggcaacacagagagacccccatccccgcaataatttgaaacaattagctgggtgtggtggtatgcacc
tgtggtcccagccacctgagagaccggggcaggtacgtggatcccaggaagtcaaggatgcagtgagccatgattgtgcc
actgcacttaacatgggcaacagagtgaaaccttatctacaaaaaaagaaagaaaagaaaaggggttttgaaatca
atgacatcagcttctaccttaagaaactagaaaaagaaacaaATGAGAACTACCAGGGCAGTGAAGAACACACGTGACCAT
GGCCATCAGCTGGATAACGACTGTCATCGTGCCCTGCTCACCTTTGAAGTCCTGCTGGTTCACAGACTGGATGGCCGCAA
TACATTCTCCTGTATCTCCATATCTGTCCCTTTGGCTTTTGTTACTAACTTAAATGACCACAACATTTAGGCCAAAAA
GGGCAATCATTTGGTGGTTTGGTATTTCGAGAGACTTCTGCCAGTTTCTGCTTGAAATTTTCCATTTTTAGAGAATAT
GGGAACATTTTCATATGATCTCCATCAGGAAGATAGCGAAGGTGCTGAAGAAACATTGGTTCCAGAAGCTCCGAAAATTGC
TCCAGTGTTTGGGAAGACCAGGGTAGTTTTAATCCCTGGGAAATATGTTCCCCACCTCCCAAGTTAAATATTGATATGC
CAGATTAAactccttagagagggcccatacacagactccaccttgcccttgcctcttggttcattcataccaaacctggaaa
tggaacaggccacaaacactgtcatctcatacctgtttgagattgatgcctcatcagcatgcataaaatggagact
gtttcagcatgtgggtgtgtgtgtgtgtacctgggtaagagaacttgctttccacattcgtgcttttagatgtagctggg
ggcagtaagttgaactgttttagtaggtcctcaaaaggaataactacacagtggttttctttaaagtgtactgtacctta
tcgaaagtatcgtttaaaagtattttatacactgctagtacaaaattgtatttcagattgtgcctgttatgacataata
gcaaacgtaaaagaattctctgtttataaacctcacagtttggtttaaactgcataattgtctattgcagatgtctttaaaga
ttgcataaaacaatatgtgcctgggtgtggagcttaccgaagtactagacatgaacatagggactgcaaatcccatgggtg
ttaatatttaggtgttagtaaccgaggtctgcactgtgtgaaggtctctggtagtatccgttagtagaggagcagccac
cgcccttgcaacttgtagcatgtcttagttagtaccaggccataaagtgcactgtgttttagcaccctgaatttttc
cacacaggtagtaactgtccagaaacaatacaaaataagcaacaagtgggtttgtccatttctaagaatcttagaataatag
ttggttgtaatgtaaagcattacctgtcactggaaagctggagagagtgcccttaaccagaagtggccaacaatcaggta
ttattttaaggtctaaacctcgtgccgaattcctgcagccgggggatccactagtctagagcgccgccaccgaggag
ctccagcttt

17. ábra

11. azonosítószámú szekvencia: humán ee3_5-protein aminosav-szekvenciája

MRTTRAVKNTDRDHGHQLDNDCHRALLTFEVLLVHRLDGRNTFSCISISVPLWLLLLTIMTTTFRPKRGNHWWFGI
RRDFCQELLEIFPELREYGNISYDLHQEDSECAEETLVPEAPKLPVFGKTRVVLIPGKYVPPPPKLNIDMPD

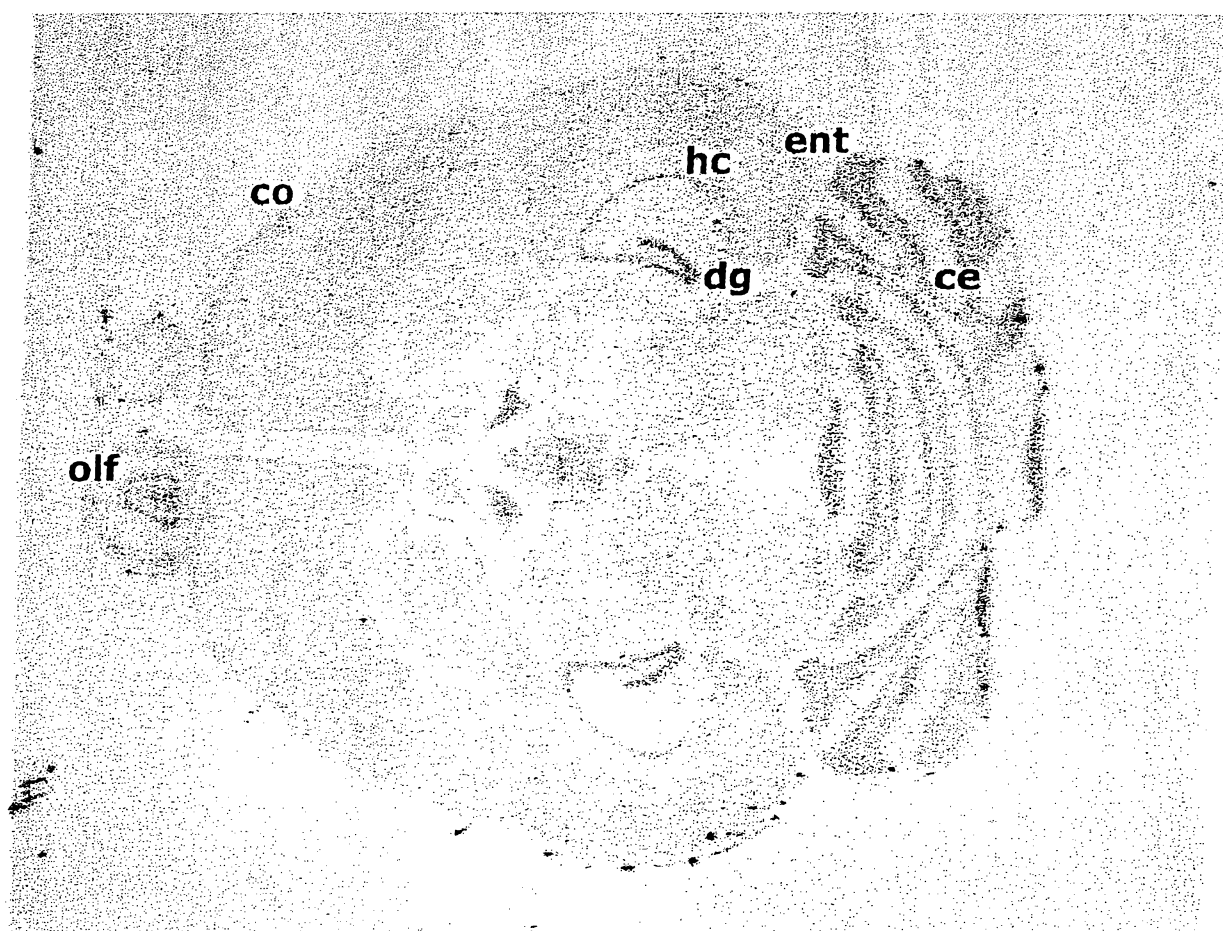
18. ábra



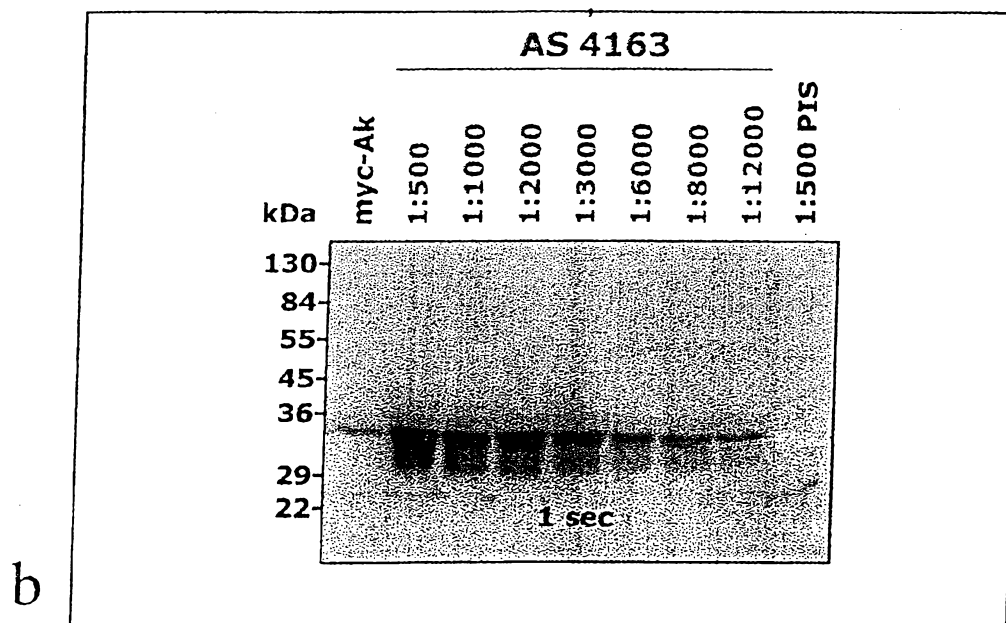
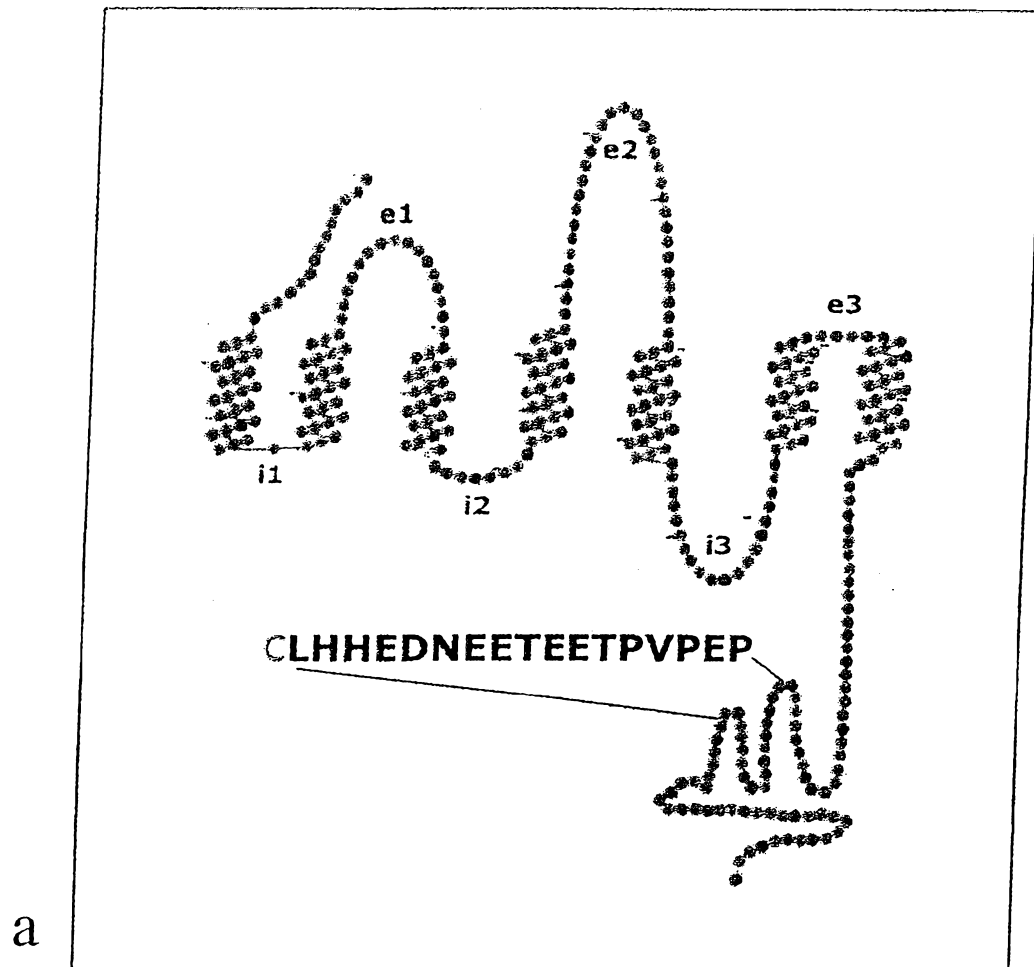
Átlag
Szórás

si-6-1	si-24-1	ei-6-1	ei-6-2	ei-24-1	ei24-2
1,00	0,99	1,35	1,34	1,43	1,44
0,11	0,04	0,18	0,33	0,09	0,09

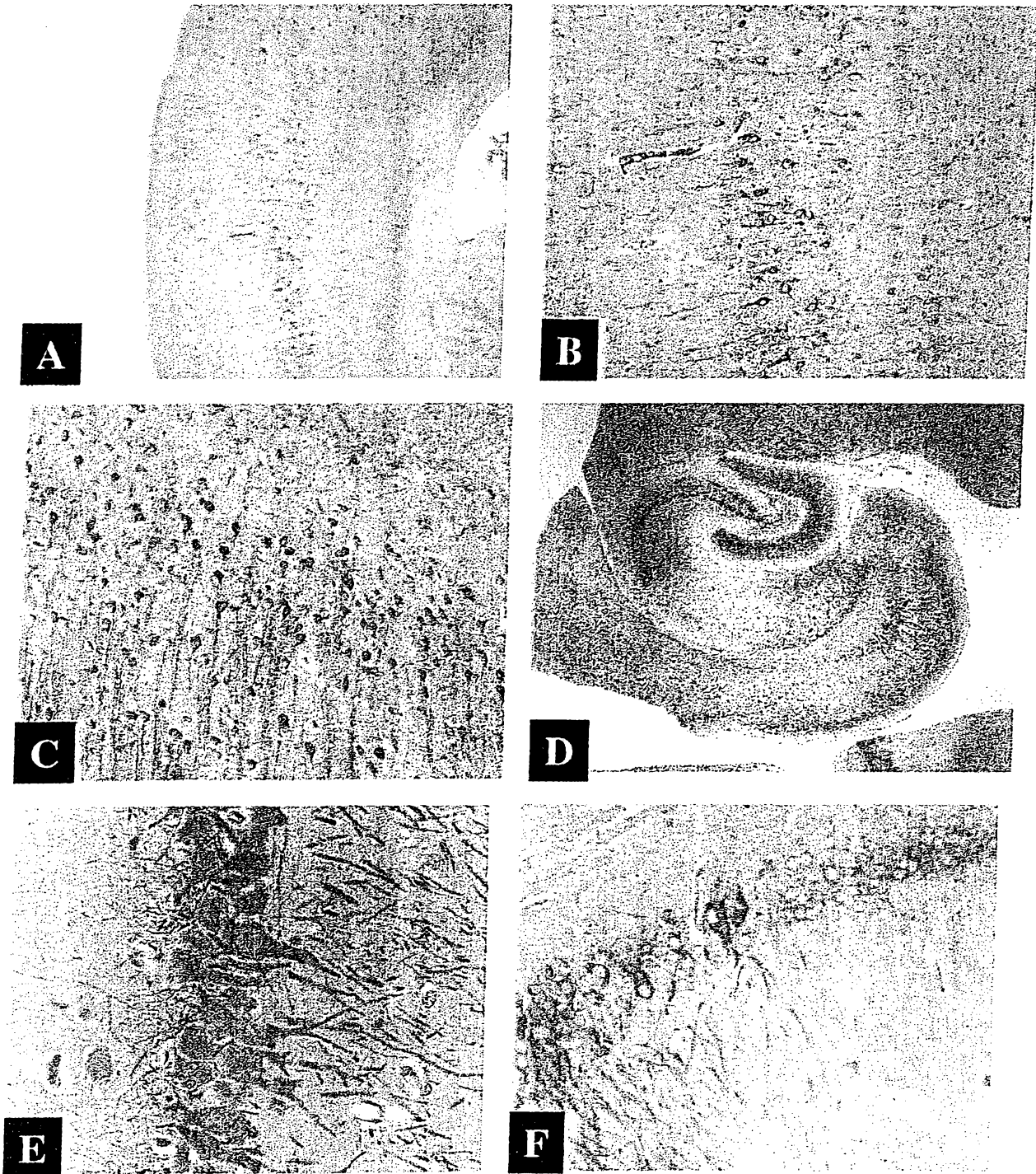
19. ábra



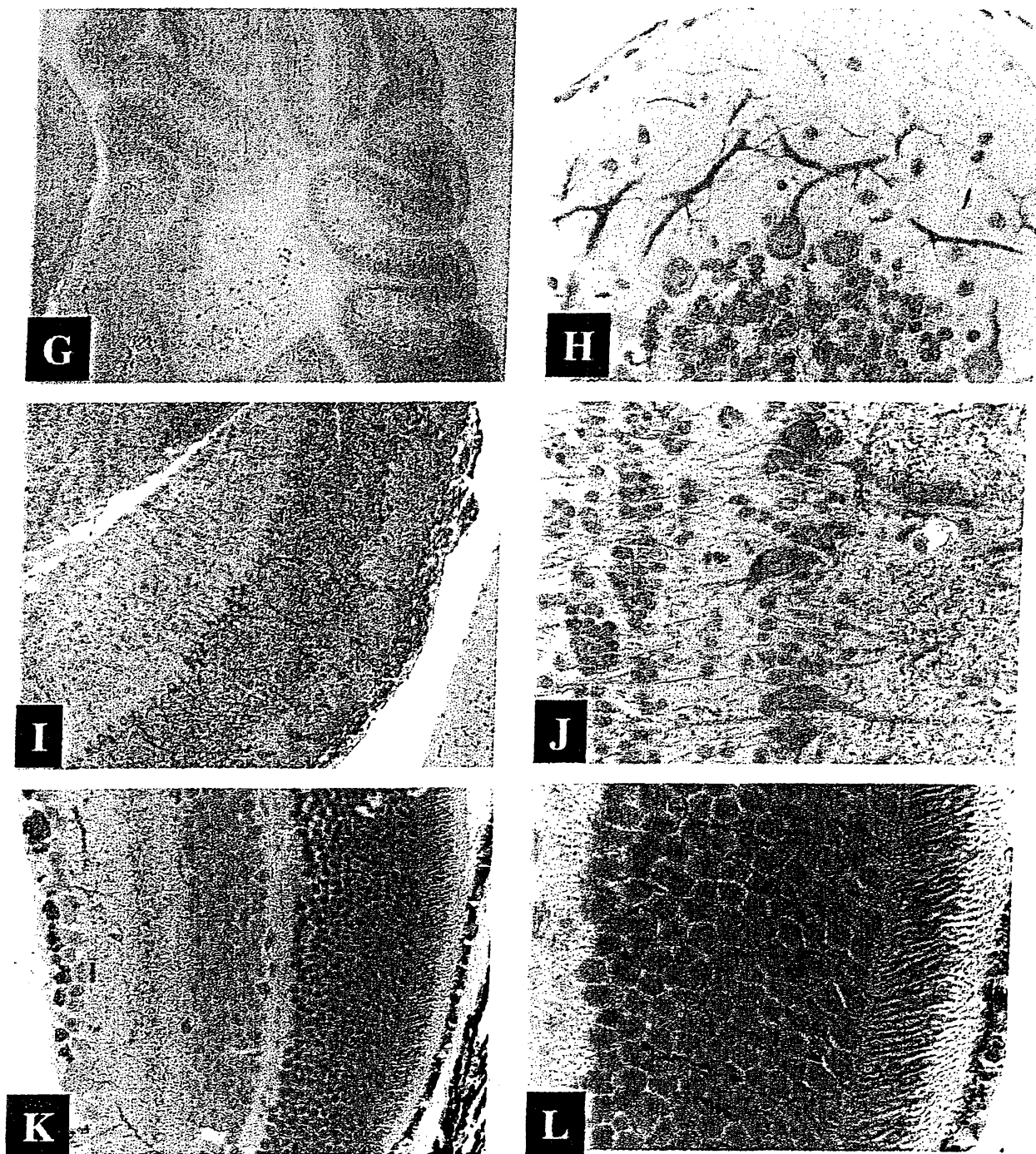
20. ábra



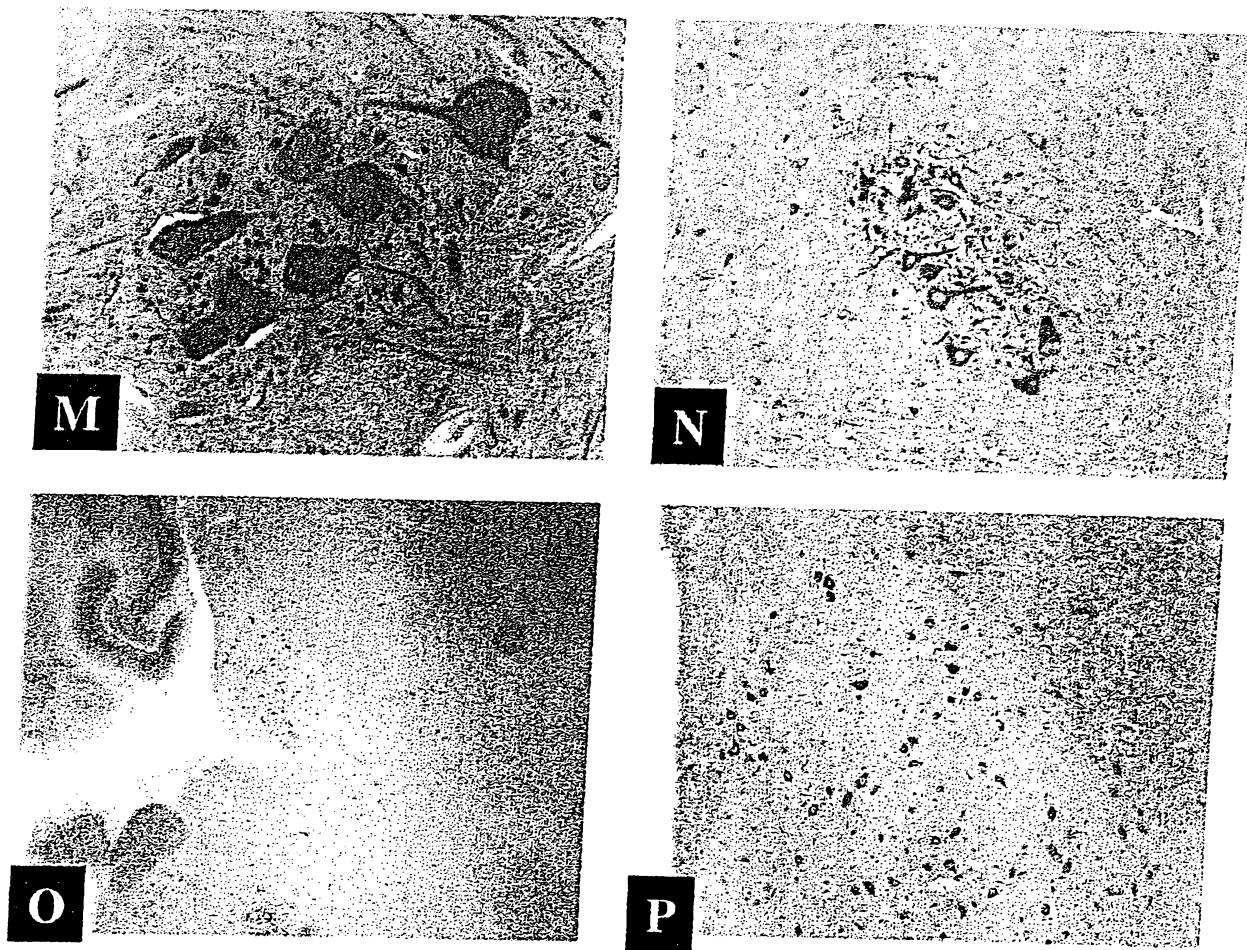
21. ábra



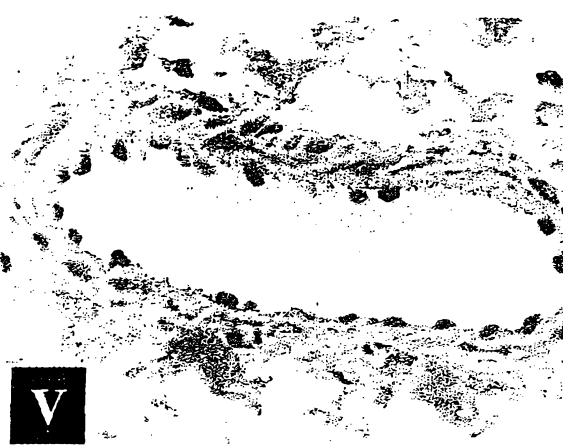
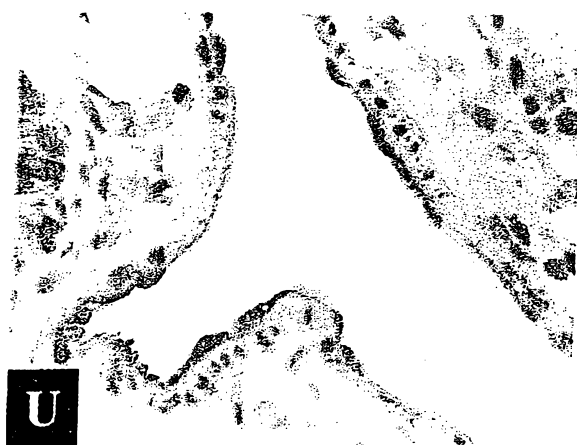
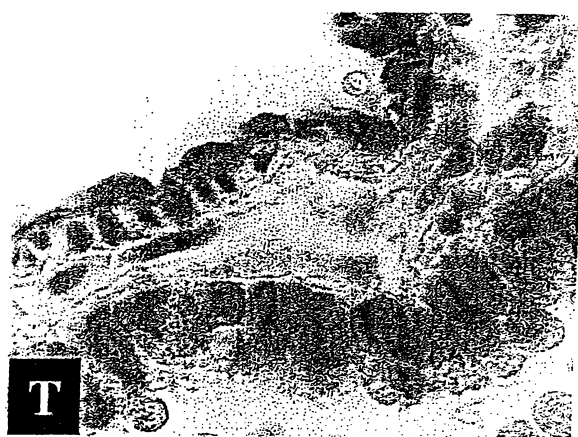
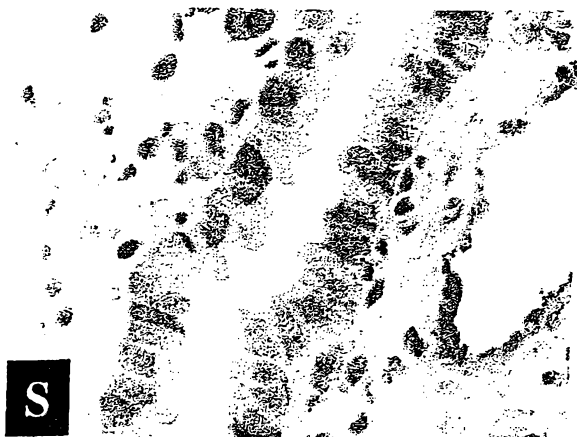
22. ábra (1. rész)



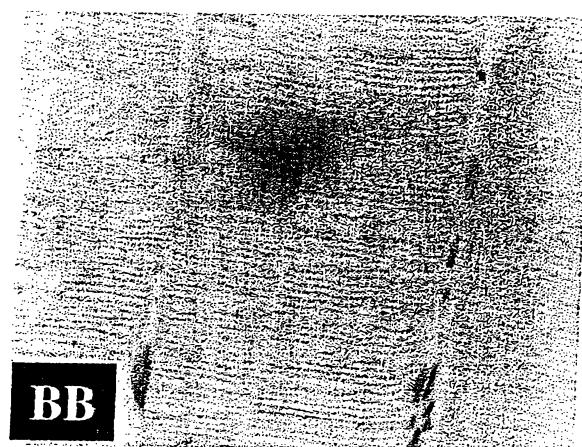
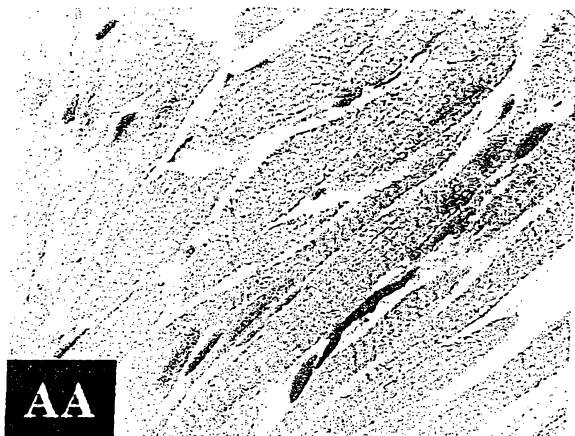
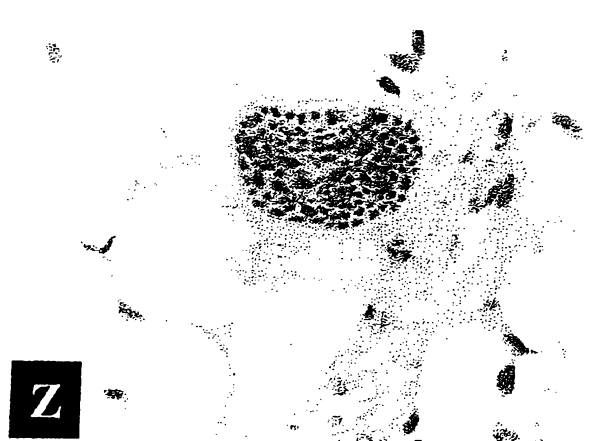
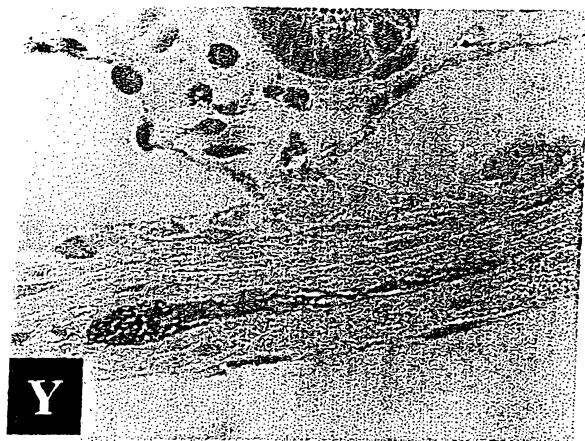
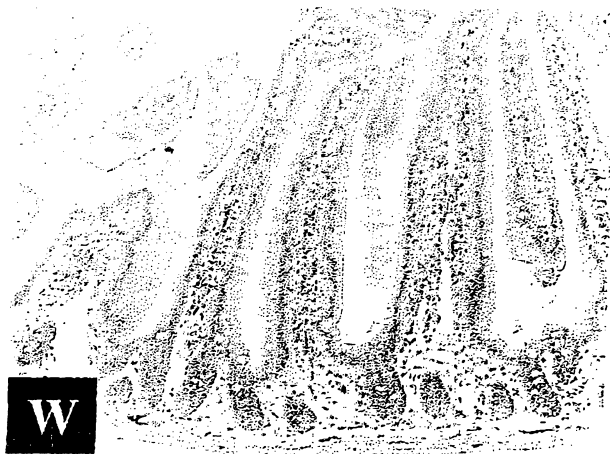
22. ábra (2. rész)



22. ábra (3. rész)

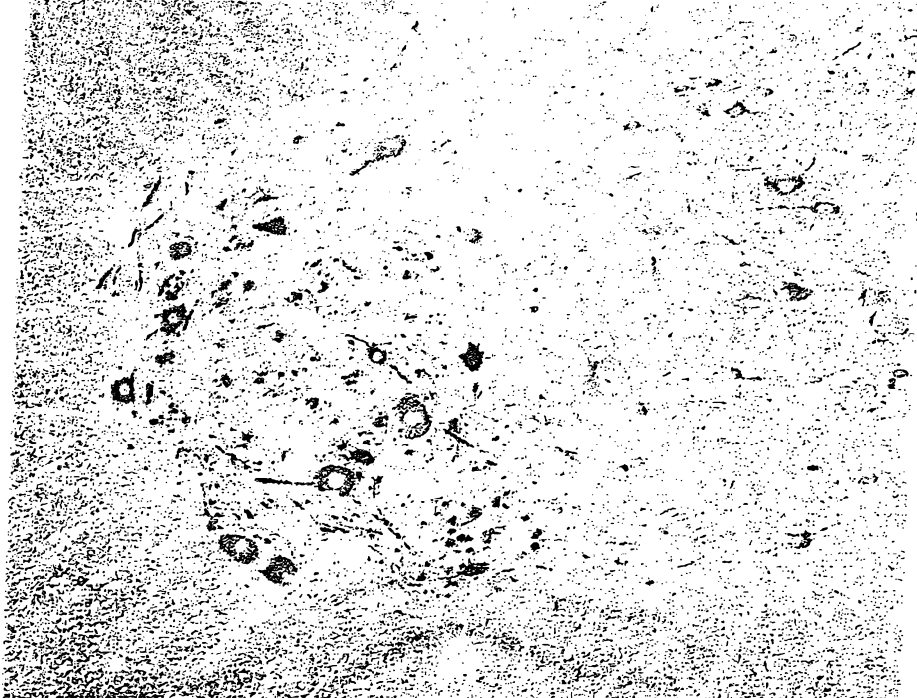


22. ábra (4. rész)

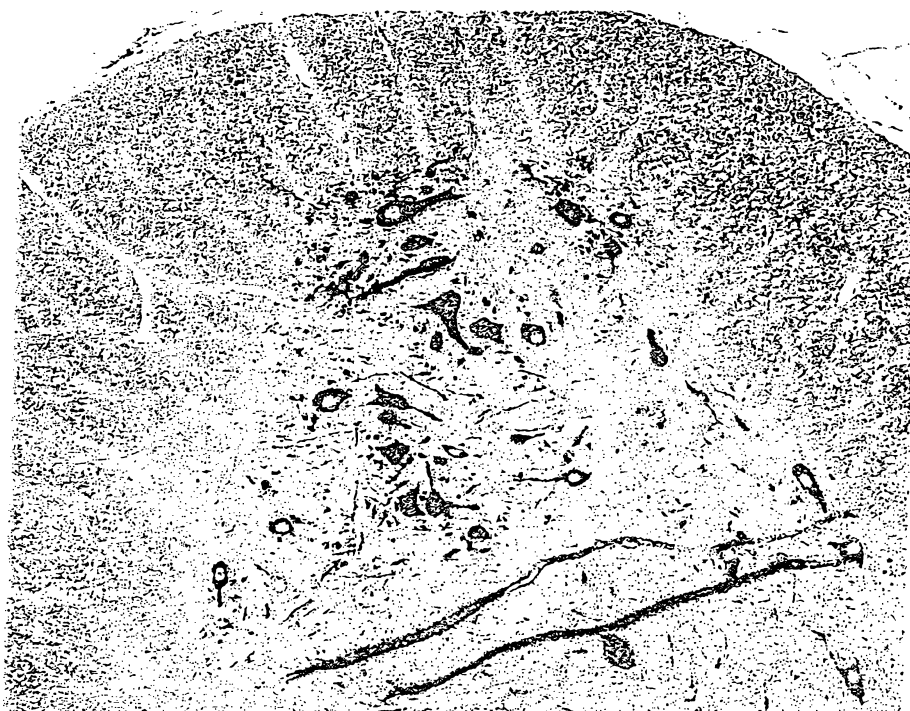


22. ábra (5. rész)

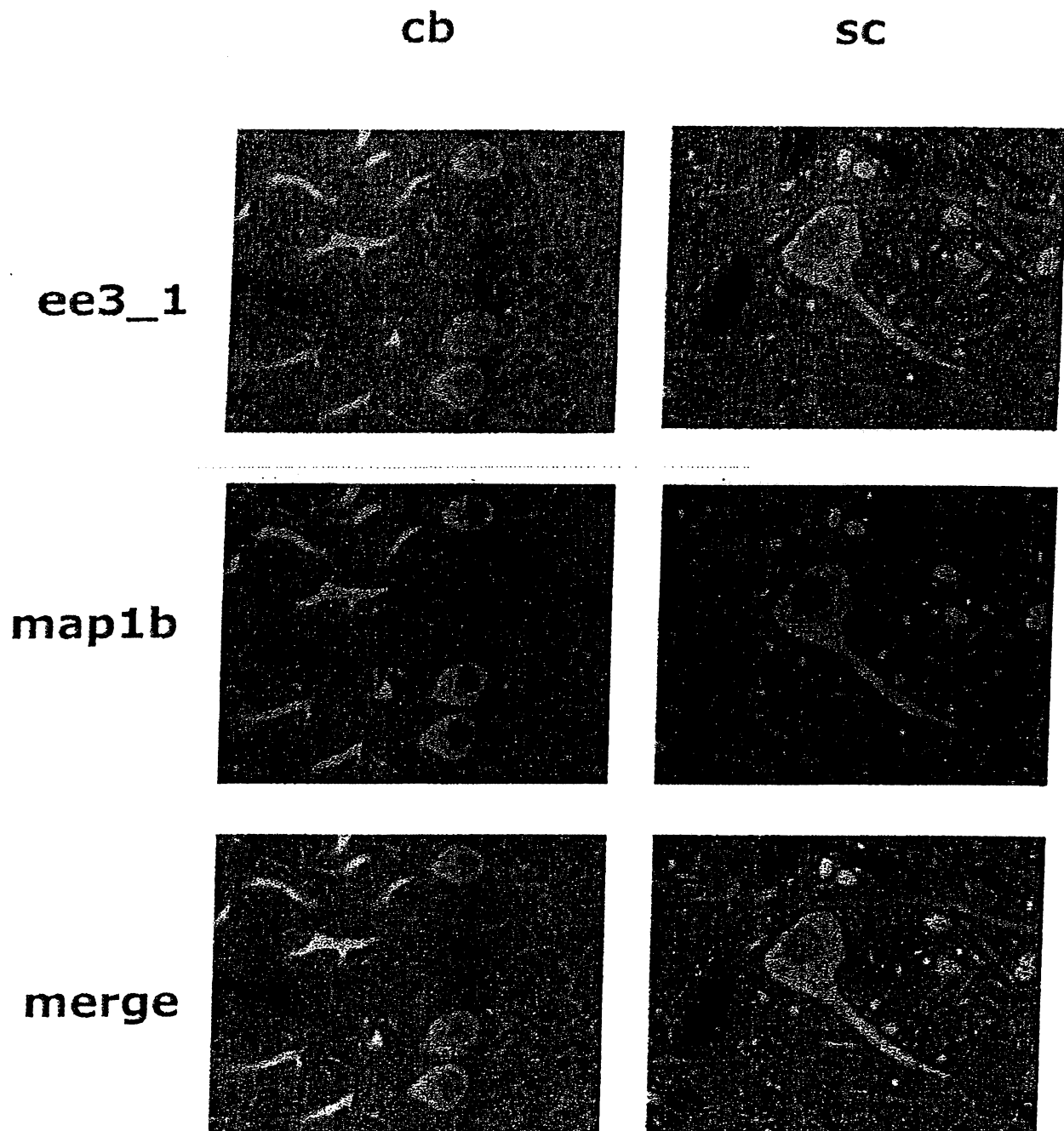
Vad típusú egér, gerincvelő



EPO-transzgénes, párhuzamosan kezelt egér



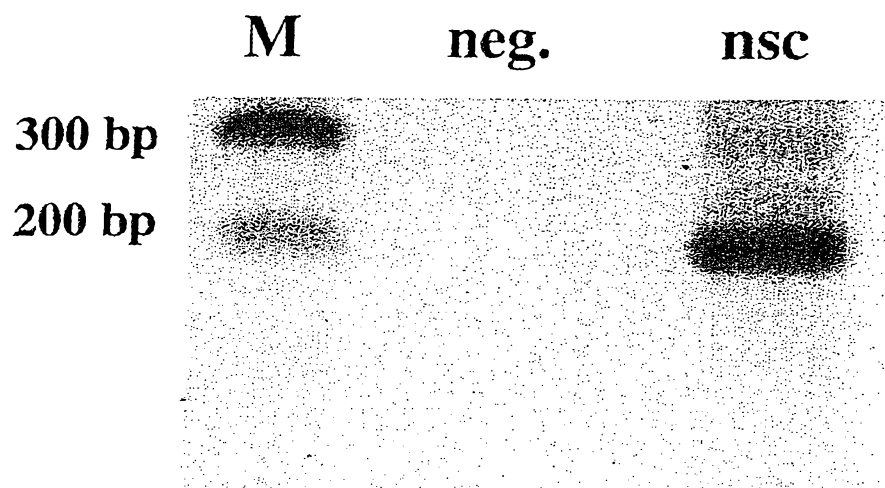
23. ábra



24. ábra



25. ábra



26. ábra

```

      10      20      30      40      50      60
h_ee3_2 ---MNRGLFQDFNISKFLIYTCLLLFVLLRLDGIQWSYNAVTAIWLWKKLLVAVG
h_ee3_1 ---MNLRLGLFQDFNISKFLIYACLLLFVLLALRLDGIQWSYNAVTAIWLWKKLMVIVG
m_ee3_2 ---MNRGLFQDFNISKFLIYACLLLFVLLRLDGIQWSYNAVTAIWLWKKLLVIVG
m_ee3_1 ---MNLRLGLFQDFNISKFLIYACLLLFVLLALRLDGIQWSYNAVTAIWLWKKLMVIVG
xl_ee3  ---MNLRLGLFQDFNISKFLIYACLLLFVLLSLRLDNIQWSYNAVTAIWLWKKLMVIVG
dr_ee3  ---MNLRGVTFQDFNISKFLIYACLLLFVLLSLRLDGIQWSYNAVTAIWLWKKLMVIVG
dm_ee3  ---MNLESIFRDYFNCKFIYVHCSLFIFVTLFALRLDNYIDWYMAIFTLNIWKCTAILG
ce_ee3  MVELSLGVFSRFSYNASKVILCACLLIFTALTFLKLDGKVSFSYAFVFAIWLWACNLLVIVG

      70      80      90     100     110     120
h_ee3_2 ASVGAGVWARNRYRTEGEACVEFKAMLIIVGIIHLLLMFEVLVCDRVERG-----TH
h_ee3_1 ASVGTGVWARNQYRAEGETCVBFKAMLIIVGIIHLLLMFEVLVCDRIERG-----SH
m_ee3_2 ASVGAGVWARNRYRTEGEACVEFKAMLIIVGIIHLLLMFEVLVCDRVERG-----TH
m_ee3_1 ASVGTGVWARNQYRAEGETCVBFKAMLIIVGIIHLLLMFEVLVCDRIERG-----SH
xl_ee3  ASVGTGVWARNQYRAEGETCVBFKAMLIIVGIIHLLLMFEVLVCDRIERGN-----HY
dr_ee3  ASVGTGVWAHNQYRAEGETCVBFKAMLIIVGIIHLLLTFFVLVCERVERAS-----IF
dm_ee3  AIVGAIIVWCRYRHYRLEGDAYTQFKAMLIISLALSLILLMTFELLACDKLTSD-----RH
ce_ee3  AIVGICSPFCSPKSRNEIVMRVDFPSAMLITATERHIFLCTFVSLVFIKLEFPDYLFEGYEL

      130     140     150     160     170     180
h_ee3_2 FWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALKLDRIIHWFWLV
h_ee3_1 FWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIHWFWLV
m_ee3_2 LWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIHWFWLV
m_ee3_1 FWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDKIHWFWLV
xl_ee3  FWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALRLDSIITWFWLV
dr_ee3  YWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALKLDGIISWFWLV
dm_ee3  LWLLVFMPLFFVSPVSVAAACVWGFRHDSLELEILCSVNILQFIFIALKLDRIIHWFWLV
ce_ee3  FWTIVFCPLFSLSLSIGIAIWSLRHDKCFEFEFFYAINIVQLVFLAFKLDKQVDWTWAV

      190     200     210     220     230     240
h_ee3_2 VFVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSLFLRSLDVVAEQRRTHVTMAISWITIVVPLTTFEVL
h_ee3_1 VCVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSVFLRSMDVIAEQRRTHITMAISWMTIVVPLTTFEIL
m_ee3_2 VFVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSLFLRSLDVVAEQRRTHVTMAISWITIVVPLTTFEVL
m_ee3_1 VCVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSVFLRSMDVIAEQRRTHITMAISWMTIVVPLTTFEIL
xl_ee3  VCVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSVFLRSMDVIAEQRRTHITMAVSWMAIVVPLTTFEIL
dr_ee3  VCVFLWILMSFLCLVVLVYIIVWSVFLRSMDVIAEQRRTHITMAISWMTIVVPLTTFEIL
dm_ee3  VFVFMWIVICLSLVSVLYNIIFCGIMMRTREVSLQOKKAALNAAGVNICTVLPLLCFQVV
ce_ee3  VFTFLWVVLSLAAVGVLYALVLSVVLIRSRHFTAHRRQHVSAILHTFFVIFALVCLVL

      250     260     270     280     290     300
h_ee3_2 LVHRLDGHNT-----FSYISIFVFLWLSLLTLMATTFRRKGG-----NHWVFGIRK
h_ee3_1 LVHKLDGHNA-----FSCIPIFVFLWLSLITLMATTFGQKGG-----NHWVFGIRK
m_ee3_2 LVHRLDDHNT-----FSYISIFVFLWLSLLTLMATTFRRKGG-----NHWVFGIRK
m_ee3_1 LVHKLDGHNA-----FSCIPIFVFLWLSLITLMATTFGQKGG-----NHWVFGIRK
xl_ee3  LVHRLDGHNT-----LSNIPFVFLWLSLITLMATTFGQKGG-----NHWVFGIRK
dr_ee3  LVHKLDNHYS-----FNYVVFVFLWVSLVTLMTTTFGQKGG-----NHWVFGIRK
dm_ee3  ICDKLDGELK-----FPIYIVVFSLLVSIILALIVLSSSAKGG-----NHWVFGIRK
ce_ee3  LTGKLDSMNWEDKGSVSELSTTLAMAPLQVSFFFMASAGFGGSSSTQCTNIWVFLGRK

      310     320     330     340     350     360
h_ee3_2 DFCQFLLEIFFFFLREYGNISYDLHHED-----SEDAEETSVFEAP-
h_ee3_1 DFCQFLLEIFFFFLREYGNISYDLHHED-----NEETEETVFEAP-
m_ee3_2 DFCQFLLEVFFFFLREYGNISYDLHHED-----SEDAEDASVSEAP-
m_ee3_1 DFCQFLLEIFFFFLREYGNISYDLHHED-----SEETEETVFEAP-
xl_ee3  DFCQFLLEIFFFFLREYGNISYDLHHED-----SEDAEETVFEAP-

```