

(19)



(10) **LT IP910 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP910**

(51) Int. Cl. (2006): **C12N 5/16**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 08 30**

C12N 15/12

C12N 15/70

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 03 27**

C12P 21/00

C12Q 1/68

G01N 33/536

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **408172, 1989 09 15, US**
429517, 1989 10 31, US
570651, 1990 08 20, US
PCT/US90/05241, 1990 09 14, US
4895685, 1991 05 14, SU

(71) Pareiškėjas:

MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER WISSENSCHAFTEN
e. V., Bunsenstrasse 10, D-3400 Goettingen, DE
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., 777 Old Saw Mill Road, Tarrytown,
NY 10591-6707, US

(72) Išradėjas:

Piotr MASIAKOWSKI, US
Vivien WONG, US
Nikos PANAYOTATOS, US
Hans Friedrich Erwin THOENEN, DE
Kurt A. STOCKLI-RIPPSTEIN, DE
Michael SENDTNER, DE
Yoshihiro ARAKAWA, DE

Patrick Desmond CARROLL, DE
Rudolf George GOTZ, DE
George W. KREUTZBERG, DE
Dan LINDHOLM, DE
Friedrich LOTTSPEICH, DE
Nancy IP, US
Mark E. FURTH, US

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, J.Jasinskio g. 16A,
LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Biologiškai aktyvaus ciliarinio neurotropinio faktoriaus gamybos būdas ir
panaudojimas

(57) Referatas:

—

Kemp 8 IP
IP 910

C 12 N

BIOLOGIŠKAI AKTYVAUS CILIARINIO NEUROTROPINIO FAKTORIAUS GAMYBOS BŪDAS IR PANAUDOJIMAS

Šis išradimas skirtas rekombinantinės DNR molekulėms, koduojančioms ciliarinį neurotropinį faktorių (CNTF), ir peptidams bei proteinams, susidarantiems iš jo. CNTF ir jam giminingos molekulės, gautos pagal šį išradimą, gali būti panaudotos įvairių nervinių ligų gydymui.

Jau identifikuoti keli faktoriai, kurie daro įtaką nervų sistemos augimui ir vystymuisi. Manoma, kad šie faktoriai gali vaidinti svarbų vaidmenį neuroninių populiacijų išgyvenimo palaikymui subrendusioje, o taip pat nesubrendusioje sistemoje. Daugelio neuroninių populiacijų normaliam vystymesi yra tam tikras lastelėlių žuvimo laikotarpis, per kurį žuva dauguma pradinės populiacijos narių (Hamburger ir Levi-Montalcini, 1949, J. Exp. Zool. III: 457-501; Hamburger, 1958, Amer.J.Anat. 102: 365-410; Hamburger, 1975, J. Comp. Neurol. 160: 535-546; Cowan ir Wengler,

1968, J. Exp. Zool., 168: 105-124; Rogers ir Cowan, 1973, J. Comp. Neurol., 147: 291-320; Clarke ir Cowan, 1976, J. Comp. Neurol. 167: 143-164; Clarke ir kt., 1976, J. Comp. Neurol. 167: 125-142; Hollyday ir Hamburger, 1976, J. Comp. Neurol., 170: 311-320, Varon ir Bunge, 1978, Annual Rev. Neur. I, 327-362). Buvo parodyta, kad neuronų išgyvenimas proporcingas inervuotos teritorijos dydžiui: kuo mažesnė duotos neuronų populiacijos taikinio zona, tuo mažesnis skaičius neuronų, kurie išgyvens po neuronų žūties laikotarpio. Buvo padaryta prielaida, kad esančio šioje zonoje neuroninio faktoriaus kiekis gali būti susijęs su neuronų išgyvenimu.

Kol kas labiausiai apibūdintas iš šių neuroninių molekulių yra nervų augimo faktorius (NAF), ir in vitro bei in vivo parodyta, kad jis yra būtinas simpatinių ir nervinės keteros kilmės sensorinių neuronų išgyvenimui ir viščiuko, ir žiurkės ankstyvame vystymesi (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1963, Develor Biol. 7: 653-659; Levi-Montalcini ir kt., 1968, Physiol. Rev. 48: 524-569). Buvo nustatyta, kad išvalyto NAF injekcijos į besivystantį viščiuko embrioną sukelia masyvią hiperplaziją ir nugaros smegenų sensorinių neuronų bei simpatinių neuronų hipertrofiją (Levi-Montalcini ir Bucer, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 46: 373-384; Hamburger ir kt., 1981, J. Neurosci. I: 60-71). Priešingai, endogeninio NAF pašalinimas arba sekvestracija kasdieninėmis antikūnų prieš NAF injekcijomis naujagimėms žiurkėms galiausiai sukėlė simpatinės nervų sistemos destruktiją (Levi-Montalcini ir Bucer, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 46: 384-391; Levi-Montalcini ir Angeletti, 1966, Pharmacol. Rev. 18: 619-628). NAF veikimas antikūnais netgi ankstyvuoju vystymosi laikotarpiu arba antikūnų įvedimu į gimdą, arba pasyvaus transplacentinio motinos antikūnų pernešimo būdu, kaip buvo parodyta, sukelia žymią nervinės keteros sensorinių neuronų, tokių kaip nugaros smegenų sensoriniai neuronai bei dorsomedialiniai trišakiai neuronai, žūtį (Goedert ir kt., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 81: 1580-1584; Gorin ir Jhonson, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 76: 5382-5386). Dar neseniai beveik visi NAF

tyrinėjimai buvo sukoncentruoti apie jo vaidmenį periferinėje nervų sistemoje, bet dabar manoma, kad NAF taip pat daro įtaką centrinės nervų sistemos neuronų specifinių populiacijų vystymuisi ir palaikymui (Thoenen ir kt., 1987, Rev. Physiol. Biochem. Pharmac. 109: 145-178; Whittmore ir Seiger, 1987, Brain Res. Rev. 12: 439-464).

Neurotrofiniai faktoriai, kurie nebuvo taip gerai apibūdinti kaip NAF, apima smegenų neurotrofinį faktorių (SNTF) ir ciliarinį neurotrofinį faktorių (CNTF).

2.2. Ciliarinis neurotrofinis faktorius

Ciliariniai neurotrofiniai faktoriai (CNTF) yra proteinais, kurie specifiskai reikalingi viščiuko embriono ciliarinio ganglijo neuronų išgyvenimui *in vitro* (Mantorp ir kt., 1980, J. Neurochem., 34: 69-75). Anatomiškai ciliarinis ganglijas yra išsidėstęs akiduobės viduje ir guli tarp tiesiojo lateralinio raumens ir optinio nervo makšties; jis gauna parasimpatines nervines skaidulas iš akies judinamojo nervo, kuris inervuoja vyzdžio ciliarinį ir sutraukiamąjį raumenis, o taip pat lygiuosius raumenis, esančius akies kraujagysliniame apvalkale.

Buvo nustatyta, kad ciliarinio ganglijo neuronai priklauso neuroninėms populiacijoms, kurios turi tam tikrus ląstelinės žūties periodus. Buvo pastebėta, kad ciliariniame viščiuko ganglijuje pusė neuronų, turimų 8-tą embrioninio vystymosi (EV) dieną, žuvo E14 (Landmesser ir Pilar, 1974, J. Physiol., 241: 737-749). Per tą patį laikotarpį ciliarinio ganglijo neuronai sudaro junginius su jų taikinio audiniais, būtent, ciliariniu kūnu ir akies kraujagysliniu apvalkalu. Landmesser ir Pilar (1974, J. Physiol. 241: 715-736) pastebėjo, kad akies pašalinimas prieš ląstelinės žūties laikotarpį sukelia beveik visišką ciliarinių ganglijo neuronų žuvimą ipsilateraliniame ganglijuje. Priešingai, Narajan ir Narajan (1978, J. Embriol. Ex. Morphol., 44: 53-70) pastebėjo, kad implantuojant papildomą akies užuomazgą,

kartu padidinant turimo taikinio kiekį, ciliarinio ganglijo neuronų žūtis gali būti sumažinta. Šie rezultatai derinasi su neurotropinio faktoriaus, kuris veikia ciliarinio ganglijo neuronus, egzistavimu.

Nustatyta, kad ciliarinio ganglijaus (CG) neuronai kultūroje reikalauja faktoriaus arba faktorių išgyvenimui. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (arba faktorių) aktyvumas buvo rastas kondicionuotose terpėse su viščiuko raumenų ląstelėmis (Bennett ir Nurcombe, 1979, Brain Res. 173: 543-548; Nishi ir Berg, 1979, Nature 277: 232-234; Varon ir kt., 1979, Brain Res. 173: 29-45), raumenų ekstraktuose (McLennan ir Hendry, 1978, Neurosci. Lett., 10: 269-273; Bonhady ir kt., 1980, Neurosci. Lett. 18: 197-201), viščiuko embriono ekstrakto (Varon ir kt., 1979, Brain Res. 173: 29-45; Tuttle ir kt., 1980, Brain Res. 183: 161-180), ir terpėje, turinčioje širdies ląstelių (Helfand ir kt., 1976, Dev. Biol. 50: 541-547; Helfand ir kt., 1978, Exp. Cell. Res., 113: 39-45; svarstymui taip pat žiūr. Adler ir kt., 1979, Science, 204: 1434-1436 ir Barbin ir kt., 1984, J. Neurochem., 43: 1468-1478).

Adler (1979, Science, 204: 1434-1436) naudojo eksperimentinę sistemą, paremtą CG-neuronų mikrolunkinėmis kultūromis (pademonstruoti tai, kad akies vidaus raumenų audiniuose, inervuotuose CG-neuronais, yra turtingas CNTF šaltinis). Iš 8000 trofinių vienetų (TV), esančių embrione EI2, 2500 TV buvo rasta akies audinyje; aktyvumas pasirodė lokalizuotas dalyje (frakcijoje), turinčioje ciliarinį kūną ir kraujagyslinį apvalkalą, su specifiniu aktyvumu, maždaug 20 kartų didesniu negu embrioniniuose ekstraktuose apskritai.

Vėliau Barbin ir kt. pranešė (1984, J. Neurochem., 43: 1468-1478) apie CNTF iš viščiuko embriono akies audinio išvalymo metodiką. Taip pat buvo nustatyta, kad CNTF aktyvumas susijęs su ne-CG audiniais, įskaitant žiurkės sėdmeninį nervą (Williams ir kt., 1984, Int. J. Develop. Neurosci. 218: 460-470). Mantorp ir kt. (1986, Brain Res. 367: 282-286) paskelbė apie žinduolių CNTF

aktyvumo išvalymą iš suaugusios žiurkės sėdmeninio nervo ekstraktų, naudojant frakcionavimo metodiką, panašią į tą, kuri buvo naudojama CNTF aktyvumo išskyrimui iš viščiuko akies. Be to, Watters ir Hendri, 1987, J. Neurochem., 49: 705-713) aprašė CNTF maždaug 20000 kartų didesnio aktyvumo išvalymo iš veršiuko širdies raumens būdą nedenatūruotose sąlygose, naudojant heparino-afininę chromatografiją. CNTF aktyvumas taip pat buvo identifikuotas pažeistų smegenų audinyje (Mantorp ir kt. 1983, Brain Res., 267: 47-56; Nieto-Sampedro ir kt., 1983, J. Neurosci., 3: 2219-2229). Carnov ir kt. (1985, J. Neurosci., 5: 1965-1971) ir Rudge ir kt. (1987, Develop. Brain Res., 32: 103-110) aprašė CNTF aktyvumo iš audinių ekstraktų identifikavimo būdus po ląstelių ekstraktų, atskirtų elektroforeze, blotingo ant nitroceliuliozinio popieriaus (Western-blotingas) ir paskui baltymo juostų, turinčių CNTF aktyvumą, identifikavimą nitroceliuliozės inokuliavimu CG-neuronais ir ląstelių išgyvenimo zonų identifikavimu, naudojant vitalinius dažus. Šie būdai buvo naudojami aktyvių polipeptidų nevalytuose ekstraktuose molekulinės masės nustatymui. Naudodami šį būdą, Kanov ir kt. (1985, J. Neurosci., 5: 1965-1971) pastebėjo, kad suaugusios žiurkės sėdmeninio nervo CNTF-aktyvumas yra kitokių išmatavimų (24 Kd) negu viščiuko CNTF (20.4 Kd).

2.3. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus funkcinės savybės

Yra aprašyti keli CNTF biologiniai poveikiai, nors šių aktyvumų molekulinė prigimtis nebuvo gerai suprasta. Kaip buvo minėta aukščiau, CNTF anksčiau buvo aprašytas kaip aktyvumas, kuris palaiko viščiuko embriono E8 ciliarinio ganglijo, kuris yra parasimpatinės nervų sistemos dalis, neuronų išgyvenimą. Preparatų, turinčių CNTF aktyvumą, kitų biologinių savybių aprašymas yra toks:

Saadat ir kt. (1989, J. Cell. Biol., 108: 1807-1816) pastebėjo, kad svariausi žiurkės sėdmeninio nervo CNTF preparatai sukelia cholinerginę diferenciaciją naujagimių žiurkių viršutinio kaklo ganglijo neuronų kultūroje. Hoffman (1988, J. Neurochem. 51:

109-113) taip pat nustatė, kad CNTF aktyvumas iš viščiuko akies padidina cholin-O-acetiltransferazinio aktyvumo lygį tinklainės monosluoksnio kultūrose.

Hughes ir kt. (1988, *Nature* 335: 70-73) ištyrė bipotencialių glijos ląstelių-pirmtakų populiaciją perinatalių žiurkių akies nerve ir jų smegenyse; manoma, kad iš šios ląstelių populiacijos išsivysto visų pirma oligodendrocitai ir paskui 2 tipo astroцитai. Tyrinėjimuose daroma prielaida, kad oligodendrocitinė diferenciacija išsivysto ląstelėje-pirmtake 0-2A (Oligodendro-citas-2 tipo-astroцитas) nesant jokio ypatingo augimo faktoriaus, tuo tarpu 2 tipo astroцитų diferenciacija reikalauja specifinio proteino buvimo. Hughes ir kt. pastebėjo, kad proteinas, indukuojantis 2 tipo astroцитų atsiradimą, panašus arba identiškas CNTF (žiūr. taip pat Anderson, 1989, *Trends Neurosci.*, 12: 83-85).

Heymanns ir Unzicker (1987, *Proc. Natl Acad. Sci., JAV*, 84: 7758-7762) pastebėjo, kad didelio greičio neuroblastinių ląstelių ekstraktų supernatantai parodė poveikius, panašius į tuos, kurie susiję su viščiuko embriono akies arba sėdmeninio žiurkės nervo CNTF aktyvumu. Buvo nustatytas proteinas, kuris buvo panašus pagal molekulinę masę į CNTF, bet ne identiškas.

Ebendal (1987, *J. Neurosci. Res.* 17: 19-24) ieškojo CNTF aktyvumo daugelyje žiurkės ir viščiuko raumenų. Buvo stebimas gana platus aktyvumų, padedančių ciliarinių neuronų išgyvenimui, diapazonas žiurkių audiniuose, bet ne viščiuko raumenyse; buvo nustatyta, kad žiurkės kepenų ląstelės, blužnies T-ląstelės ir pažandikaulinės liaukos ląstelės susijusios su mažu aktyvumu, padedančiu CG išgyvenimui, tuo tarpu širdies, smegenų ir skeletinių raumenų audiniai buvo susiję su didesniu aktyvumu, padedančiu CG išgyvenimui. Tarp ištirtų audinių didžiausias CNTF aktyvumas buvo pastebėtas žiurkės inkste.

Nors aukščiau pateikti pavyzdžiai parodė, kad daugelis audinių ir ląstelių ekstraktų turi panašaus į CNTF savybes aktyvumo (t.y.,

Jie palaiko viščiuko embriono E8 ciliarinio ganglijo neuronų išgyvenimą bioeksperimentuose audinių kultūroje), negalima buvo daryti prielaidos, kad vienintelis arba identiškasis proteinas yra atsakingas už šiuos aktyvumus. Kaip parodyta fibroblastų augimo faktorių (FAF) šeimai, pvz., keletas skirtingų polipeptidų arba baltymų gali pasižymėti identišku biologiniu aktyvumu viename bioeksperimente.

Iš pradžių buvo nustatyta, kad viščiuko akies ir žiurkės sėdmeninio nervo CNTF neuroninis specifiškumas apima neuronų populiacijas, atsakingas (reguliuojančias) NAF. Tačiau tiriant CNTF ir NAF vaidmenį neuroninių populiacijų vystymesi labiau išryškėjo CNTF ir NAF charakteristikų skirtumai. Skaper ir Varon (1986, Brain Res. 389: 39-46) nagrinėjo DSG (viščiuko embriono dorsalinės šaknies ganglijo) neuronų išgyvenimo poreikius tarp embrioninių dienų E6.5 ir E15. Buvo pastebėta, kad DRG neuronai, iš pradžių reaguojantys tik į NAF, po to pradėjo reaguoti ir į CNTF, o galiausiai su amžiumi prarado reakciją į šiuos abu faktorius. Be skirtingo vaidmens vystymesi, CNTF gali skirtis nuo NAF molekulinė mase, izoelektriniu tašku, nesugebėjimu inaktyvuotis antikūnais prieš NAF ir CNTF sugebėjimu palaikyti in vitro NAF-nepriklausomų CG neuronų išgyvenimą (Barbin ir kt., 1984, J. Neurochem. 43: 1468-1478).

3. Trumpas išradimo aprašymas

Šis išradimas skirtas nukleino sekoms, koduojančioms ciliarinį neurotrofinį faktorių (CNTF), ir proteinams, peptidams bei dariniams, gaunamiems iš jo. Įvairiuose išradimo įgyvendinimuose nukleino sekos, proteinais ir peptidais pagal šį išradimą gali būti naudojami įvairių nervinių susirgimų ir sutrikimų gydymui, įskaitant, pvz., bet tuo neapsiribojant, Alzheimerio ligą ir Parkinsono ligą.

Papildomuose įgyvendinimuose CNTF nukleino rūgštys, proteinais ir peptidais pagal šį išradimą gali būti naudojami judinamųjų neuronų

ligų, įskaitant, pvz., bet tuo neapsiribojant, amiotrofinę lateralinę sklerozę (Lou Gehrig ligą), gydymui. Specifiniuose išradimo įgyvendinimuose CNTF gali būti naudojamas nugaros smegenų neuronų augimo palaikymui, tuo suteikiant būdą gydyti nugaros smegenų pažeidimus, sukeltus traumos, infarkto, infekcijos, maisto nepakankamumo arba toksiškų medžiagų.

Toliau šis išradimas pateikia naują chemiškai gryno CNTF gavimo būdą.

Išradimas taip pat susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, kurių sudėtyje yra efektyvus CNTF-geninių produktų kiekis ir kurios gali būti naudojamos nervinių ligų ir sutrikimų diagnostikai bei gydymui.

Šis išradimas skirtas CNTF klonavimui, sekos nustatymui ir ekspresijai ir pateikia pirmą kartą žmogaus CNTF gavimo būdą, naudojant žmogaus CNTF-koduojančias nukleino sekas. Toliau, CNTF-nukleino sekos gali būti naudojamos identifikavimui nukleino sekų, koduojančių CNTF arba homologines CNTF molekules įvairiuose gyvūnuose ir audiniuose. Papildomame specifiniame išradimo įgyvendinime buvo identifikuotas peptidinis fragmentas, turintis CNTF-aktyvumą, ir sudarytas antikūnas CNTF-peptidui, neutralizuojantis CNTF -aktyvumą.

3.1 Sutrumpinimai

BRCN	bromido cianogenas
CG	ciliarinis ganglijas
CNTF	ciliarinis neurotropinis faktorius
DŠG	dorsalinės šaknies ganglijas
E8, E9 ir t.t.	embrioninio vystymosi diena
GFRP	glijos fibriliarinis rūgštinis proteinas
NAF	nervo augimo faktorius
TV	trofinis vienetas; vienas toks vienetas mililitrui lygus CNTF-aktyvumo kiekiui, palaikančiam pusę

maksimalaus neuronų išgyvenimo 1-ame ml kultūrinės terpės.

4. Brėžinių aprašymas

1 brėž. kDNR klonavimas (a), nukleotidų ir gauta žiurkės CNTF aminorūgščių seka (b). Naudojami kaip pavyzdžiai oligonukleotidai parodyti (c), o jų atitinkamos pozicijos (b). (b) pabrauktos aminorūgštys atitinka peptidų sekas, gautas iš triptinių (T1-T8) ir BRCN (CB1-4) CNTF fragmentų. Nukleotidų lygyje sekos, atitinkančios koduojančią sritį, yra išskirtos, o signalinė poliadenilavimo seka pabraukta. Aminorūgščių kompozicija tokia, kaip gauta iš išvalyto CNTF ir kaip numatyta iš CNTF kDNR (d).

2 brėž. Dvimatė gelio elektroforezė CNTF, kuris buvo išgrynintas naudojant (a) DEAE-jonų mainų chromatografiją ir preparatyvinę SDS-poliakrilamidinio gelio elektroforezę; (b) DEAE-jonų mainų chromatografiją, preparatyvinę SDS-poliakrilamidinio gelio elektroforezę ir toliau chromatografiją, panaudojant kolonėlę Bakerbond Gold C4 Wdepore.

3 brėž. viščiuko embriono E8 ciliarinio ganglijo kultivuotų neuronų išgyvenimas, dalyvaujant transformuotų ląstelių Hela supernatantams ir ekstraktams: E8 ciliariniai neuronai augo, dalyvaujant supernatantams a) ir ekstraktams; b) ląstelėms Hela, transformuotoms plazmide be intarpo (Δ) ir plazmide, apimančia žiurkės CNTF kDNR kloną E prasminėje (o) ir neprasminėje (■) orientacijoje.

4 brėž. (a) CNTF-mRNR Northern-blot-analizė suaugusios žiurkės audiniuose (čia naudojami tokie pažymėjimai: BR-smegenys; LIV-kepenys; KID-inkstai; MC-raumuo; SK-oda; SCI-sėdmeninis nervas; SP-nugaros smegenys; (b) RNR, gauta iš žiurkės jauniklių tokio amžiaus: P0- naujagimių; P4- keturių dienų; P13-trylikos dienų.

5 brėž. Rekombinantinis rCNTF trijuose skirtinguose E.coli štamuose. Takelis I: standartiniai baltymų markeriai; nurodyta trijų proteinų molekulinė masė. Takeliai I-3: bendras baltymas, ekstrahuotas iš E.coli W3110 qF, E.coli HB1c1 ir E.coli MC1061,

kiekvienas-šeimininkas pCP-rCNTF-C-I. Ekstraktus ruošė ir analizavo ant 8-25% poliakrilamidinio gradientinio gėlo, kaip aprašyta aukščiau (Panayotatos ir Fontaine, 1988, J. Biol. Chem. 260: 3173-3177).

6 brėž. a) PCR-žmogaus CNTF generuotas zondas Southern-blot hibridizacijoje prie Eco RI žmogaus ir žiurkių genominių DNR suvirškinimams. b) Radioaktyvus žiurkės CNTF zondas Southern-blothibridizacijoje prie Eco RI žmogaus ir žiurkės genominių DNR suvirškinimams.

7 brėž. Dalinė CNTF-koduojanti seka iš žmogaus genominės DNR, amplifikuota PCR; palyginimas su žinoma žiurkės CNTF-koduojančia seka. Skirtumai tarp žmogaus ir žiurkės išskirtoje aminorūgščių sekoje parodyti žvaigždutėmis. Skirtumai DNR sekoje parodyti nelygybės ženklų (≠).

8 brėž. Žmogaus CNTF seka:

- a) žmogaus nukleino ir aminorūgščių seka;
- b) žmogaus ir žiurkės aminorūgščių sekų palyginimas;
- c) žmogaus ir žiurkės nukleotidų sekų palyginimas;
- d) Pilnas žmogaus genominės CNTF sekos restrikcijos žemėlapis;

9 brėž. Antikūnai prieš sintetinį peptidą (14 aminorūgščių -ISAL-ESHYGAQDKQ), paremtą CNTF seka (C-baigiamoji sritis), sugebantys inhibuoti biologinį išvalyto žiurkės CNTF aktyvumą po imunonusodinimo.

10 brėž. Sintetinio CNTF peptidinio fragmento iš 28 aminorūgščių neurotropinio aktyvumo demonstracija.

11 brėž. Netiesioginiai tyrinėjimai imunofluorescencija, naudojant žiurkės antikūnus prieš CNTF-biologiškai aktyvų peptidą iš 28 aminorūgščių, surištą su žiurkės sėdmeninio nervo fiksuotomis sekcijomis ir paskui sureagavusio su rodaminu žymėtu antižiurkiniu IgG. Didžioji rodyklė rodo peraksoninę apdažymą; nedidelė rodyklė rodo taškus prie žymėtų aksoninių struktūrų.

12 brėž. Žiurkių embrionų E14 mediodorsalinių nugaros smegenų ląstelių disociuotų kultūrų fazokontrastinės fotomikrografijos. Kultūros išaugintos per 72 valandas ant poliornitininio substrato, dalyvaujant:

A.kontrolinei terpei.

B.terpei, papildytai žiurkės nervo augimo faktoriumi (NAF) arba

C.terpei, papildytai žiurkės rekombinantiniu ciliariniu neurotropiniu faktoriumi (CNTF), gauto E.coli.

Reikia pažymėti platų neuronų išgyvenimą ir neuritų ataugimą, esant CNTF. Viena padala= 100 μ m.

13 brėž. Motoneuronų ir glijos ląstelių kitimai naujagimių žiurkių veido nervo branduoliuose su unilateraliniais veido nervo pažeidimais. Unilateralinis nervo pažeidimas, nešantis BSA-turintį *gelio-putų* implantantą:

(A) Nissl-apdažyti motoneuronai veido nervo branduolyje pažeistoje pusėje;

(B) Nissl-apdažyti motoneuronai veido nervo branduolyje nepažeistoje pusėje (kontrolė);

(C) veido nervo branduolys pažeistoje pusėje, apdažytas anti-GFAP antikūnu.

14 brėž. Motoneuronų ir glijos ląstelių kitimai naujagimių žiurkių (su unilateraliniais veido nervo pažeidimais) veido nervo branduoliuose. Unilateralinis veido nervo pažeidimas, nešantis CNTF-turintį *gelio-putų* pavidalo implantantą:

(A) Nissl- apdažyti veido nervo branduolio motoneuronai pažeistoje pusėje;

(B) Nissl- apdažyti veido nervo branduolio motoneuronai nepažeistoje pusėje (kontrolė);

(C) Veido nervo branduolys pažeistoje pusėje, apdažytas anti-GFAP antikūnu; ir

(D) Veido nervo branduolys nepažeistoje pusėje, apdažytas anti-GFAP antikūnu.

15 brėž. Kompiuteriu gautos hidrofiliškumo, paviršiaus tikimybės, lankstumo, antigeninio indekso, amfifilinės spiralinės, amfifilinės plokštelės schemos ir antrinė struktūra:

(a) žiurkės ir

(b) žmogaus CNTF.

16 brėž. Ekspresijos plazmidžių pagrindiniai požymiai. Promotorius (lacUV5), ribosomas surišantis taškas (rbs1), CNTF,

ampR ir kanR genai, o taip pat mutacijos cop1(0) ir kan1(0). Plazmidinėse konstrukcijose panaudoti restrikciniai saitali AseI, EaqI, NdeI ir PvuI, kaip aprašyta tekste.

17 brėž. Žmogaus CNTF ir PCR-praimeriai, naudojami klonavimui. Išskirta proteina kodojančios srities DNR seka, su išdėstyta aukščiau išvesta baltymo seka. Tamsios rodyklės rodo 1 ekzono paskutinį nukleotidą ir 2 ekzono pirmą nukleotidą; 5'- ir 3'-terminalinės introninės sekos parodytos skliausteliuose virš rodyklių. Rodyklėmis parodytos pasirinktų oligonukleotidinių praimerių poliarizavimo padėtys 5' ir 3'. Žvaigždutės nurodo nesuderinamumus. Praimerių (nuo 5' iki 3') oligonukleotidų sekos yra tokios:

CNTF.23: GCTTTCACAGAGCATTCAACG;
 CNTF.21: AGGCCCTGATGCTTCACATAGGATTCCGTAAGAG;
 CNTF.22: CTCTTACGGAATCCTATGTGAAGCATCABGGCCT;
 CNTF.10: CCAAGCTTCTAGAATTCGCAGGCATCCCATCAGCCT;
 CNTF.24: GAGACGGCCGTAAGTGTACATTTTCTTGTGTTAG;
 CNTF.11: GACTCGAGTCGACATCGGAGATGACTGAGGCAGA.

18 brėž. Žmogaus ir žiurkės CNTF ekspresijos palyginimas, naudojant įvairius vektorius. Bendras baltymas iš nurodytų štamų buvo analizuojamas ant 8-25% poliakrilamidinio gelio, apdažyto Koomasi. Nurodytos markerių molekulinės masės (šimtais) -M, o taip pat juostų, atitinkančių žmogaus CNTF, žiurkės CNTF, ampR ir kanR proteinus, pozicijos.

19 brėž. CNTF išvalymas. (A): žiurkės CNTF. (B): žmogaus CNTF. Lizatas: bendras ląstelinis proteinas; 8 M GuACl: dializuotas ekstraktas; 0,5, 5, 10, 50: proteino kiekis μ g, pakrauto ant kiekvieno takelio po DEAE-Sepharose arba Fast-S.

20 brėž. Nuo dozės priklausanti ciliarinių neuronų reakcija į natūralų ir rekombinantinį žiurkės CNTF. Viščiuko embriono E8 disociuotų ciliarinių neuronų išgyvenimas, esant didėjantiems žiurkės CNTF kiekiams, išmatuotas kaip aprašyta skyrelyje 12.7.

21 brėž. Viščiuko embriono E10 dorsalinės šaknies ganglijų (D5G) eksplantantinių kultūrų (A,B) ir disociuotų, viščiuko embriono E8 ciliarinių ganglijų (CG) praturtintų neuronais kultūrų (C,D,E) fotomikrografijos. A, B yra kontrolės (A) tamsaus lauko ir

apdorotų CNTF (B; 5mg/ml) eksplantantų DRG mikrografijos po 48 valandų kultūroje. C, D ir E yra kontrolės (C) ir CNTF-apdorotų (D, 100 mg/ml; E, 5 mg/ml) ciliarinio ganglijo neuronų disocijuotų kultūrų fazokontrastinės mikrografijos. Skalės mastelis = 400 μ m (A, B) ir 50 μ m (C,D,E).

22 brėž. Ištiesintos CNTF proteinų sekos. Parodytos žmogaus (hu), žiurkės (rt) ir triušio (rb) aminorūgščių sekos. Joms iš dešinės parodytas ekspresijos vektorius, koduojantis kiekvieną iš šių molekulių. Panelyje (A) taškais pažymėtos liekanos, identiškos tų pačių gyvūnų rūšių sekų laukiniam tipui. Liekanos, besiskiriančios nuo laukinio tipo, parodytos didžiosiomis raidėmis. Atliekamos prijungtos liekanos kaip svetimo peptido dalis parodytos mažosiomis raidėmis.

23 brėž. Ventralinių nugaros smegenų ląstelių fazokontrastinė mikrografija po 6 dienų kultūroje. Ląstelės buvo užsėtos 0.5×10^6 ląstelių į 35 mm indelį tankiu ir buvo laikomos terpėje F12 MEM HS₅ FCS₅ 20X.

24 brėž. Neurofilamentiniai (NF) lygiai ventralinių nugaros raumenų neuronų kultūroje. Kultūros pasėjimo dieną buvo apdirbtos CNTF (10 ng/ml) arba NAF (50 ng/ml) ir 7-tą dieną buvo tiriami NF-lygiai. NF-proteinai buvo randami NF-antikūnu (RT-97), reakcijos produktai buvo vizualizuojami, naudojant OPD kaip substratą, ir esant 490 nm matavo OD (vidurkis $\pm$ SEM), n=3.

25 brėž. CNTF poveikis AchE-turinčių neuronų išgyvenimui. Ventralinių nugaros smegenų neuronai buvo auginami kultūroje 7 dienas, po to apdirbami AchE histochemijai. Apdažytos ląstelės buvo skaičiuojamos, padidinus 32 kartus ir buvo išreiškiamos kaip bendras kiekis 35 mm indelyje, n=3.

26 brėž. A. Augimo faktorių poveikis CAT aktyvumui ventralinių nugaros smegenų kultūroje. Kultūros pasėjimo dieną buvo apdirbamos FAF (50 ng/ml), CNTF (10 ng/ml), NAF (50 ng/ml) arba PBS/BSA (0.5 mg/ml). CAT buvo išreikštas CPM/35 mm indelyje (vidurkis SEM), n=3.

B. Didėjančių CNTF poveikis CAT aktyvumui. Ventralinio rago ląstelės pasėjimo dieną buvo apdirbamos įvairiomis CNTF (ng/ml) dozėmis. 7-tą dieną kultūros buvo surenkamos CAT-

aktyvumo, išreikšto pmo1 (val.) matavimams 35 mm indelyje (vidurkis SEM), n=3 kiekvienai dozei.

27 brėž. CNTF poveikis CAT- aktyvumui, pridėjus su užlaikymu CNTF (10 ng/ml) 0.2 arba 6 dieną, ir surenkant kultūras CAT-aktyvumo matavimui atitinkamai 7,9 ir 13 dieną. CAT išreiškiamas CPM (ng proteino) 35 mm indelyje (vidurkis SEM), n=3.

28 brėž. CNTF (10 ng/ml) poveikis CAT-aktyvumui ventralinių nugaros smegenų su sumažinta glija kultūrose. Aga C (0.5 nM) buvo pridėjama prie kultūrų antrą dieną. Septintą dieną ląstelės buvo surinktos ir buvo tiriamas jų CAT- aktyvumas (išreikštas CPM) 35 mm indelyje (vidurkis SEM), n=3.

29 brėž. CNTF (10 ng/ml) ir NAF (50 ng/ml) poveikis CAT-aktyvumui su išvalytų ventralinių nugaros smegenų neuronų metrizamidiniu gradientu. CAT (vidurkis SEM) buvo išreikšta pmo1/val./16 mm, n=3.

30 brėž. Aukštaafininio GABA įsisavinimo padidėjimo laikinas pakitimas CNTF apdirbtose Amono rago kultūrose. Amono rago neuronai buvo patalpinti į kultūrą ir laikomi, esant arba nesant CNTF (10 ng/ml) tris skirtingus laiko tarpus, prieš pradėdant matuoti GABA (A) įsisavinimą ir neurofilamentinio proteino (B) lygius. Rezultatai yra aktyvumo apdirbtose kultūrose procentai, lyginant su neapdirbtomis kontrolinėmis kultūromis.

31 brėž. Priklausomybės nuo Amono rago neuronų CNTF dozės kreivės. Amono rago neuronai buvo kultivuojami, esant arba nesant įvairioms CNTF koncentracijoms (0.001 - 10ng/ml) 8 dienas. Kultivuojamo laikotarpio pabaigoje buvo matuojamas (A) aukštaafininis GABA įsisavinimas, (B) neurofilamentinis proteinas ir (C) CAD- fermentinis aktyvumas.

32 brėž. CNTF poveikis NSE-, CAD-, ir kalbindinui- teigiamų ląstelių kiekiui. Amono rago neuronai buvo laikomi kultūroje esant arba nesant CNTF (10 ng/ml) 8 dienas. Buvo atliktas NSE, CAD ir kalbindino imunoapdažymas, kaip parodyta A ir B.

33 brėž. Priklausanti nuo dozės GABA- ir AchE- imunoteigiamų neuronų reakcija į CNTF kiekius. Amono rago neuronai buvo auginami kultūroje, esant įvairioms CNTF koncentracijoms (0.001-10 ng/ml). Imunoapdažymas buvo atliekamas GABA ir AchE, kaip parodyta A ir B.

34 brėž. Uždelsto CNTF pridėjimo poveikis CNTF sukellamam aukštaafininio GABA įsisavinimo padidėjimui. A. CNTF (10 ng/ml) buvo pridėtas 0, 1, 2, 3 arba 4 dieną po Amono rago ląstelių patalpinimo kultūroje. Aukštaafininis GABA įsisavinimas buvo nustatomas 8 dieną kultūroje. B. CNTF (10 ng/ml) buvo pridėtas į Amono rago ląsteles po 0 arba 3 dienų, aukštaafininis GABA įsisavinimas buvo nustatomas 11 dieną kultūroje.

35 brėž. Uždelsto CNTF pridėjimo poveikis CNTF sukellamo neurofilamentinio proteino padidėjimui. A. CNTF (10 ng/ml) buvo pridedamas skirtingais laiko momentais (0, 1, 2 arba 3 dieną) po Amono rago ląstelių patalpinimo kultūroje. Neurofilamentinio proteino lygiai buvo matuojami 8 dieną. CNTF (10 ng/ml) buvo pridėta prie Amono rago ląstelių 0 ir 3 dieną, o 11 dieną buvo nustatomi neurofilamentinio proteino lygiai.

36 brėž. CNTF poveikis praturtintoms neuronais kultūroms. Amono rago kultūros buvo laikomos esant arba nesant įvairioms CNTF koncentracijoms (0.001-10 ng/ml) 8 dienas. 24 valandoms prie Amono rago kultūrų buvo pridėta citozino-arabinozido (0.3 nM), kad būtų sumažintas glijos kiekis.

37 brėž. CNTF sukellamo GABA- įsisavinimo ir neurofilamentinio proteino padidėjimo priklausomybė nuo pasėlių tankio. Amono rago ląstelės buvo pasėtos 71400 ląstelių cm^2 tankiu. Ląstelės buvo laikomos esant arba nesant CNTF (10 ng/ml) 8 dienas iki GABA įsisavinimo (A) ir neurofilamentinio proteino (B) matavimo.

38 brėž. Apsauginis CNTF poveikis gliutamato sukeltam toksiškumui Amono rago kultūrose. Amono rago neuronai buvo laikomi kultūroje esant arba nesant CNTF (10 ng/ml) 7 dienas. 15-ai min. buvo pridėta gliutamato skirtingomis koncentracijomis (100 - 1000 nM), po to ląstelės buvo kultivuojamos nesant gliutamato arba CNTF 20 valandų. Ląstelių išgyvenimas kultivavimo laikotarpio pabaigoje buvo vertinamas MTT- bandymu, paremtu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol-bromido) transformacija (konversija) į violetinį produktą gyvybingomis ląstelėmis. MTT- dažai buvo pridėti, esant galutinei 0.5 mg/ml koncentracijai. Dažai, įsisavinti gyvomis ląstelėmis, buvo ištirpinti pridedant

0.08 N HCl izopropanolyje po 5 valandų, ir buvo matuojama OD (esant 570-650 nm).

39 brėž. Didėjančių žiurkės CNTF koncentracijų poveikis mitotiniam žiurkės Amono rago astrocitų indeksui. Astrocitai buvo veikiami CNTF koncentracijomis, kaip nurodyta, 24 valandas ir žymimi ^3H -timidinu (1 ms/duobelei/150 μl) paskutines 2 inkubavimo valandas.

40 brėž. CNTF bandymai "sumuštinio" tipo antikūnais. Indeliai ELISA (Falcon 3915 probind) buvo padengti 50 μl /duobelei/4 μg /ml ožio anti-žiurkės IgG 2b (GAMig G2b, Caltag). Indeliai buvo inkubuojami 4°C temperatūroje iki ryto, perplauti ir blokuojami 2 valandas su "r.t." 50 mM bikarbonatiniame buferyje, pH 9. Po perplovimo į indelį pridėjo 50 μl /duobelei apimančio antikūno RP 3-I2 (kultūros iš hibridomos supernatanto skiedinys 1:5) ir inkubavo vieną valandą su "r.t.". Po perplovimo pridėdavo serijinius žmogaus CNTF standarto skiedinius (10 ng/ml-7 pg/ml ribose) arba serijinius bandomo pavyzdžio skiedinius. Po valandos su "r.t." ir perplovimo buvo pridėta 50 μl /duobelei pranešančio antikūno RPI2-2 (kultūros supernatanto skiedinys 1:5) ir inkubavo su "r.t.". Po perplovimo 50 μl /duobelei šarminės fosfatazės 1:1000 skiediniu buvo pridėta žymėtojo ožio anti-pelės IgGI (GAMIgGI, Caltag) reagento. Indelis buvo inkubuojamas 1 valandą su "r.t.", po to perplautas, išryškintas pNPP ir skaičiuojama su 405 nm skaitikliu ELISA (Molecular Devices Thermo Max).

41 brėž. Du žmogaus CNTF bandymai "sumuštinio" tipo antikūnais. Didėjančios rekombinantinio žmogaus CNTF kiekiai buvo tiriami, panaudojant monokloninius antikūnus RP3-I2 ir RPI2-2, reakcijoje, aprašytoje 40 brėž.

42 brėž. Viščiuko embriono nugaros smegenų motoneuronai, žymėti rodaminizocianatu. Ląstelės buvo fiksuotos 4% formaldehidu po 5 valandų kultūroje. (A) fazokontrastinės ir (B) fluorescencinės to pačio lauko nuotraukos. Skalės mastelis =25 μm . Pastebėkite, kad mažesnių išmatavimų ląstelės iš dešinės nežymėtos.

43 brėž. Viščiuko embriono nugaros smegenų motoneuronų

išgyvenimo kitimas laike (užtušuoti apskritimukai) dalyvaujant arba (neužtušuoti apskritimukai) nedalyvaujant rekombinantiniam žiurkės CNTF, 50 ng/ml.

44 brėž. Viščiuko embriono nugaros smegenų motoneuronai po 6 dienų kultūroje, dalyvaujant (A) arba nedalyvaujant (B) rekombinantiniam žiurkės CNTF, 1 mg/ml. Skalės mastelis =100 μ m.

45 brėž. Rekombinantinio žiurkės CNTF išgyvenimo aktyvumas viščiuko embriono nugaros smegenų motoneuronams kultūroje (A) ir priklausomybės kreivės nuo CNTF koncentracijos (B) ir FAF koncentracijos (C). Šie aktyvumai buvo tiriami po 3 dienų kultūroje. (B) heparinas (1 μ g/ml) buvo pridėtas į kultūrą tik pirmas 24 valandas tam, kad būtų išvengta ląstelių atsiskyrimo, sukellamo heparino pertekliumi, tuo tarpu rūgštinis FAF dalyvavo visas 3 dienas.

5. Smulkus išradimo aprašymas

Šis išradimas skirtas nukleino sekoms, koduojančioms ciliarinį neurotropinį faktorių (CNTF), taip pat CNTF- proteinams, peptidiniais fragmentais ir dariniais, gautiems iš jo dideliais kiekiais. Be to, išradimas skirtas farmakologinėms kompozicijoms, o taip pat terapiniam ir diagnostiniam ciliarinio neurotropinio faktoriaus panaudojimui. A/iškumui, bet ne apribojimui šis išradimas aprašomas tokiomis dalimis:

- (I) CNTF išvalymas
- (II) Bioeksperimentai su CNTF
- (III) CNTF sekų nustatymas
- (IV) DNR, koduojančios CNTF, klonavimas
- (V) CNTF geno ekspresija
- (VI) CNTF genai ir proteina
- (VII) Antikūnų prieš CNTF generavimas
- (VIII) Išradimo panaudojimas

5.1 Ciliarinio neurotropinio faktoriaus išvalymas

CNTF gali būti išvalytas iš bet kurio prieinamo šaltinio,

įskaitant, pvz., viščiuko embriono akį, sėdmens nervą ir sėdimąjį raumenį, panaudojant specialistui žinomą technologiją. Kaip pavyzdys, tuo išradimo neapribojant, CNTF gali būti gautas iš viščiuko embriono akies pagal būdą, aprašytą Barbin ir kt. (1984, J. Neurochem. 43: 1468-1478), ir šis darbas kaip nuoroda įeina į išradimą. Trumpai, kraujagyslinis apvalkalas, valvorykštinis-ciliarinis kūnas ir ten esantis pigmentinis epitelis visi kartu vadinami CIPE, gali būti išimami iš 15 dienų viščiuko embriono akies, kaip aprašyta Mantorp ir kt. (1960, J. Neurochem, 34: 69-75) ir surenkami subalansuotame druskos tirpale. Geriau, kai ekstraktai gaunami iš, pvz., 300 embrionų akių, kurie homogenizuojami, pvz., 76-iuose ml šalto vandens, panaudojant teflonstiklinį homogenizatorių ir paskui centrifuguojami su $10^5 \times g$ 1 valandą $4^{\circ}C$ temperatūroje. Paskui supernatantas gali būti surinktas ir padarytas 0.01 M NaH_2PO_4 , kurio pH 7, o paskui patalpintas į jonų mainų kolonėlę (pvz., Whatman DE52 celiuliozė, subalansuota fosfatiname buferyje). Kolonėlė paskui gali būti išplauta eliuentu su maždaug 30 ml/val. srauto greičiu, naudojant 20 ml kiekvienam išplovimui 0.07, 0.25 ir 0.5 M NaCl fosfatiname buferyje. 0.25 M NaCl eliuentas paskui gali būti koncentruotas iki maždaug 2 ml tūrio ultrafiltracija (pvz., naudojant 50 ml Amicon cell ir PM10 (atkarpa 10000 daltonų/ultrafiltracinės membranos). Retentatas paskui gali būti surinktas, sujungtas su dviem 0.5 ml laistelių išplovimais 0.25 M NaCl buferiu ir koncentruotas iki 0.4 ml (pvz., naudojant 3 ml Amicon Cell ir PM 10 filtrą). Išvalytas ekstraktas po to gali būti padėtas kaip sluoksnis ant sacharozės gradientų (pvz., 200 l ekstrakto 4.6 mililitrams 5-20% tiesinių sacharozės ingredientų) ir tada centrifuguotas (pvz., naudojant SW 65 rotorį su 65000 aps/min. 15 valandų $4^{\circ}C$ temperatūroje). 4.8 ml gradientų paskui gali būti surinkti penkiose frakcijose: I frakcija (2 ml), II frakcija (0.3 ml), III frakcija (1.2 ml), IV frakcija (0.3 ml) ir V frakcija (1.0 ml). III frakcija po to gali būti padaryta 0.1% tritone x-100 ir po to koncentruota iki 0.2 ml, panaudojant ultrafiltraciją, kaip aprašyta aukščiau.

Analitinei gėlio elektroforezei išvalytas CNTF gali būti išanalizuotas, panaudojant 15% skiriančią ir 45% renkančią SDS-poliakrilamidinio gėlio plokštelę. Išvalytiems CNTF arba molekulinų masių standartams gali būti atlikta elektroforezė, gėlis išpjautas ir apdirbtas taip: polipeptidai vizualizuojami be fiksacijos, nusodinant surištą su proteinu SDS gėlio inkubacijos 0.25 KCl metu ir užrašant CNTF standartų ir juostų pozicijas. Takeliai gali būti fiksuoti ir apdažyti žydruoju Koomasi. Kiti takeliai paskui gali būti supjaustomi gabalėliais, išplaunami eliuentu, inkubuojant Tritonu x-100, o po to gali būti tiriamas eliuato CNTF aktyvumas.

Sėdmeninio nervo ekstraktas gali būti frakcionuotas tomis pačiomis stadijomis (DEAE jonų mainų chromatografija, centrifugavimas su sacharozės tankio gradientu ir preparatyvinė SDS-PAGE), kurios buvo naudojamos CNTF išvalymui iš vištos embriono akies (žiūr. aukščiau), išskyrus tai, kad galimi trys šio būdo pagerinimai:

(I) po nervo ekstrakto pakrovimo DEAE jonų mainų kolonėlė gali būti periodiškai išplauta (eliucija) betarpiškai -15 M NaCl (vietoj perplovimo 0.07% NaCl ir eliucijos su 0.25 M NaCl);

(II) gabalėliai gali būti išpjauti iš 24 kD srities (vietoj 20 kD srities) preparatyvinio SDS gėlio; ir

(III) CNTF aktyvumas gali būti eliuuojamas iš individualių gėlio gabalėlių detergente 0.1% Tritone x-100, po to inkubuojamas iki ryto 4°C temperatūroje (greičiau, negu elektroforezine eliucija iki ryto per karbamidinius gėlius). Detergentas Tritonas x-100 po to gali būti pašalintas supernatanto inkubavimu su 100 μl ekstragėlio suspensijos (firma Pierce Chemicals, Rockford, II) (rutulėliais, 2 valandas 4°C temperatūroje). Proteino koncentraciją po to galima nustatyti pagal bet kurį žinomą specialistui būdą.

Aukščiau pateiktus būdus galima toliau patobulinti taip:

Po eliucijos iš preparatyvinio gėlio SDS-PAGE CNTF gali būti

išvalytas iki homogeninės struktūros ir atskirtas nuo SDS atvirkščios fazės chromatografija, naudojant kolonėlės FPLC arba HPLC, kuri yra biosuderinama skystinė sistema, esanti inertinės kolonos viduje; tinkamesniame įgyvendinime FPLC kolonėlė yra Bakerbord Cold C₄ Widepore kolonėlė (7.75 mm x 10 cm kolonėlė, padengta auksu ir sugebanti veikti, esant neigiamam 200-250 psi slėgiui vandeninėje mobilioje fazėje 1.0 ml/min. greičiu), eliuuojama acetonitrilo gradientu nuo 0 iki 60%. Buvo pastebėta, kad CNTF eliuojamas vieninteliu pikų su 50-55% acetonitrilo (žūr. 6 sk. žemiau). Šis vienintelis pikas, turintis CNTF, gali būti koncentruotas Speed Vac, kuriame oras pakeistas inertinėmis dujomis, tokiomis kaip argonas. Šios inertinės dujos, pasirodo, yra būtinos, kad būtų išvengta CNTF-aktyvumo praradimo, kuris būna dėl vieno ar daugiau metionino likučių oksidacijos. Labiausiai oksiduojasi CNTF, kai jis daugiau nebėra tirpale.

Analogiškai aktyvumas, padedantis ciliarinių neuronų išgyvenimui, gali būti gautas iš širdies audinio, naudojant heparino-afininę chromatografiją, kaip aprašyta Watters ir Hendry, 1987, J. Neurochem. 49: 705-713, būdu, kuris įeina į šį išradimą kaip nuoroda.

5.2. Bioeksperimentai su ciliariniu neurotropiniu faktoriumi

Ciliarinio neurotropinio faktoriaus aktyvumas gali būti įvertintas, naudojant jautrias CNTF sistemas in vitro ir in vivo, kurios žinomos specialistui. Pvz., bet tuo neapribojant išradimo, gali būti padarytos sistemos in vitro, kurios matuoja CNTF-aktyvumą, kiekybiškai nustatant 24 valandų viščiuko embriono E8 ganglijo ciliarinių neuronų išgyvenimą vienasluoksnėse kultūrose.

Pvz., ciliariniai ganglijai gali būti surinkti iš E8 viščiuko embrionų, disocijuotų (su maždaug 20 tūkst. ganglijų ląstelių išeiga) ir paskui atskiestų NEBM terpėje, turinčioje 20% arklio serumo, kaip aprašyta Varon ir kt., 1979, Brain Res. 173: 29-45. Aple 50 mikrolitrus ląstelinės suspensijos, turinčios 1000 neuronų

(2000 ląstelių) gali būti paskui pasėtos mikrotitravimo indeliuose ir paskui gali būti pridėtas numatomas CNTF aktyvumas. Kultivuojami indeliai paskui laikomi 37°C temperatūroje 5% CO₂ 24 valandas, po to kultūros gali būti fiksuotos, pridėdant 200 µl 2% gliutaraldehido NEBA terpėje, ir išgyvenusių neuronų kiekis gali būti nustatytas vizualiai, tiesiog paskaičiuojant per fazokontrastinį mikroskopą.

5.3. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus proteino sekų nustatymas

CNTF proteino sekos gali būti nustatytos tiesioginiu būdu arba iš pradžių suskaldant bet kokia proteaze arba kitu tam tikslui tinkamu junginiu, žinomu specialistui, įskaitant, pvz., bet neapsiribojant, Staphylococcus aureus V8, tripsiną ir bromido cianogeną. Peptidų sekos gali būti nustatytos, panaudojant automatizuotą Edmano degradaciją dujiname-faziniame sekvenatoriuje pagal Hewick ir kt. būdą (1981, J. Biol. Chem. 256: 7990-7997 ir Hunkapillar ir kt., 1983, Methods Enzymol. 91: 399-417).

Feniltiogidantoino aminorūgščių nustatymas gali būti atliktas pagal Lottspeich ir kt., 1985, Chromatography, 326: 321-327. Persidengiantys aminorūgščių sekos fragmentai gali būti nustatyti ir panaudoti mišrios sekos ilgesnių atkarpų išvedimui.

5.4. DNR, koduojančios ciliarinį neurotropinį faktorių, klonavimas

Tinkamo (pakankamo sekos nustatymui) CNTF proteino kiekio išvalymas iš žiurkės sėdmeninio nervo įgalino atlikti CNTF DNR klonavimą. Standartinė strategija tokiam klonavimui turėtų susidėti iš komplementaraus oligonukleotidinio zondo, paremto žinomos aminorūgščių sekos segmentu, sudarymu ir tokio zondo panaudojimo skринingui kDNR bibliotekų, gautų iš audinio, kuris, kaip manoma, sintetuoja mRNR, koduojančią CNTF. Tačiau ši strategija pasirodė problematinė dėl santykinai mažo mRNR turinio,

o taip pat dėl to, kad faktinė CNTF peptidų, nustatytų mikrosekvenavimu (1 brėž.), seka kiekvienu atveju pareikalautų nepageidaujamo aukšto lygio degeneracijos oligonukleotidiniuose zonuose, kad būtų pritaikyti visi galimi variantai (pasirinkimai) kodonų konkretiems aminorūgščių likučiams. Šis išradimas pateikia: geno klonavimą kDNR sintezavimo būdu, degeneruotų oligonukleotidų praimerių, paremtų CNTF peptidų mikrosekvenavimu, poros gavimą, šių praimerių panaudojimą CNTF koduojančios sekos segmento amplifikacijai, trečio degeneruoto oligonukleotido panaudojimą amplifikuotos sekos (segmento) identiškumo patvirtinimui, tikslios šio segmento nukleotidų sekos nustatymą ir tikslių oligonukleotidinių praimerių sintezę bei panaudojimą CNTF geno likučio amplifikacijai. Šiame būde pagal išradimą tinkamesnis jo įgyvendinimas numato audinių nukleorūgščių sekų amplifikacijos panaudojimą grandinine polimerazės reakcija (PCR) (Saiki ir kt., 1985, Science, 230: 1350-1354). Toliau pateikiamas smulkus šio būdo įgyvendinimo, kuriam teikiama pirmenybė, aprašymas.

Pirmiausiai amino rūgščių seka, gauta iš išvalyto CNTF proteino, gali būti panaudota dedukcija išvesti oligonukleotidinius praimerus jų panaudojimui reakcijoje PCR. Dėl genetinio kodo, kuriame keli tripletai gali apibrėžti vieną ir tą pačią aminorūgštį, degeneracijos, duotai aminorūgščių sekai turi būti sintezuoti keli oligonukleotidai, kad aprūpintų daugybines potencialios nukleotidų sekos kombinacijas; gauti oligonukleotidai toliau minimi kaip degeneruoti praimeriai.

PCR reikalauja praimerių ir kaip prasminių, ir kaip anti-prasminių DNR siūlų. Atitinkamai degeneruotas oligonukleotidinis praimeris, atitinkantis vieną CNTF aminorūgšties seką, gali būti naudojamas kaip praimeris kitam DNR siūlui (pvz., prasminiam), o kitas degeneruotas oligonukleotidinis praimeris, homologinis antram CNTF aminorūgščių sekos segmentui, gali būti naudojamas kaip praimeris antram DNR siūlui (pvz., anti-prasminiam). Geriau, kai šie praimeriai parenkami pagal mišrią žinomos aminorūgščių sekos atkarpą, taip kad atitinkamas DNR reakcijos produktas, gautas dėl

šių praimerių panaudojimo PCR, galėtų būti numatomo dydžio (t.y. turėti ilgį, pagal bazinių porų kiekį lygų dviejų praimerių ilgių sumai plius trigubas skaičius aminorūgščių likučių proteino segmente, surišto su segmentais, atitinkančiais šiuos du praimerus). Šie du praimeriai paskui gali būti panaudoti PCR su nukleorūgščių matrica, kuri, kaip numatoma, apima CNTF-koduojančios sekos, tokios kaip genominė DNR arba, geriau, kDNR, gauta iš mRNR, surinktos iš audinio arba ląstelių, kurios tinkamesniu atveju sintezuoja CNTF. Reakcijos DNR produktai paskui gali būti išanalizuoti elektroforeze, kad būtų nustatyta, ar DNR reakcijos produktas yra pagal masę panašus į numatytą. DNR reakcijos produktai toliau gali būti išanalizuoti hibridizacija su žymėtu zondų, gautu iš degeneruoto oligonukleotido, atitinkančio aminorūgščių sekas tarp dviejų praimerių, naudojamų PCR, segmentų. DNR reakcijos numatyto dydžio produkto seka gali būti palyginta su nustatyta aminorūgščių seka patvirtinti tai, kad amplifikuota nukleorūgščių seka iš tikrųjų gali koduoti CNTF peptidinį fragmentą. Nors gali būti panaudotas bet kuris specialistui žinomas nukleorūgščių sekos nustatymo būdas, geriau naudoti didezoksinukleotidinės grandinės terminacijos būdą (Sanger ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 72: 3918-3921). Sekos nustatymas gali būti atliktas, panaudojant gelio išvalytą arba, kas geriau, klonuotą DNR- reakcijos produktą. "Uodega", apimanti žinomas taikinio sekas išrinktoms restrikcinėms endonukleazėms, gali būti įterpta prie kiekvieno oligonukleotidinio praimerio, naudojamo PCR, 5' galo, kad palengvintų DNR- reakcijos produktų klonavimą.

DNR- reakcijos produkto seka gali būti paskui panaudota oligonukleotidinio praimerio, atitinkančio tikslią CNTF-koduojančią seką, sudarymui. Šis praimeris paskui gali būti panaudotas kartu su antru primeriu PCR, kad būtų padidintas CNTF-koduojančios sekos dydis virš to, kurį nustato tikslios pradžioje nustatytos sekos fragmentas. Pvz., bet ne išradimo apribojimui "greito kDNR galų amplifikavimo" būdas (PAGE) (M.A. Frohman ir kt., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 85: 8998-9002) gali būti panaudotas segmentų iš žinomos tikslios sekos srities klonavimui

prie kDNR molekulių atitinkamai 5' ir 3' galų. Tuo būdu, kad gautume kloną, išplečiantį iki 3' galo, prasmnio siūlo praimeris gali atitikti tikslią CNTF nukleotidų seką, tuo tarpu antiprasminis praimeris gali būti homologinis segmentas žinomos sekos, kuri gali būti išdėstyta žemiau sekvenuojamo fragmento, pvz., mRNR 3' poliadenozino "uodega" kaip atgal perskaityta kDNR; praimeris tuo atveju apimtų atkarpą oligo-dT. Gali būti būtina panaudoti panašų būdą aukščiau sekvenuoto fragmento sekos atstatymui (gavimui iš naujo); pvz., antiprasminio siūlo praimeris gali atitikti tikslią CNTF nukleotidų seką, o prasmnio siūlo praimeris gali būti homologiškas aukščiau sekvenuoto fragmento sričiai, pvz., 5' poliguanozino "uodega", pridėta prie kDNR 5' galo, panaudojant terminalinę dezoksিনukleotidtransferazę (praimeris šiuo atveju apima atkarpą oligo-dc).

Amplifikuotiems fragmentams paskui gali būti nustatytos sekos arba geriau, kai jie klonuojami ir tada nustatomos sekos. Kadangi tikslios oligonukleotidai nuo kDNR 5' ir 3' galų jau nustatyti, tai šie tikslios nukleotidai gali būti panaudoti PCR- reakcijoje tarpinių nukleino rūgščių sekų gavimui, ir paskui gali būti klonuoti PCR reakcijos produktai.

DNR reakcijos produktai gali būti klonuoti naudojant bet kurį specialistui žinomą būdą. Gali būti panaudota labai daug žinomų sistemų vektorius- šeimininkas. Galimi vektoriai apima, pvz., bet jais neapsiriboja, kosmides, plazmides arba modifikuotus virusus, tačiau vektorinė sistema turi būti suderinta su panaudota ląstele-šeimininku. Tokie vektoriai apima, pvz., bet jais neapsiriboja, bakteriofagus, tokius kaip lambda dariniai, arba plazmides, tokias kaip pBR322, pUC arba BLUESCRIPT (STRATAGEN)- plazmidinius darinius. Rekombinantinės molekulės gali būti įvestos į ląsteles-šeimininkus transformacija, transfekcija, infekcija, elektroporacija ir t.t.

CNTF genas gali būti įterptas į klonuojantį vektorių, kuris gali būti naudojamas į atitinkančių ląstelių-šeimininkų

transformavimui, transfekcijai arba infekcijai taip, kad būtų gauta daug geninių sekų kopijų. Tai gali būti įgyvendinta liguojant DNR fragmentą į klonuojantį vektorių, kuris turi komplementarius lipnius galus. Tačiau jei komplementarus restrikcinių taškų, naudojamų DNR fragmentavimui, klonuojančiame vektoriuje nėra, tai DNR molekulių galai gali būti fermentiškai modifikuoti. Gali būti naudinga inkorporuoti restrikcinių endonukleazių taškus į oligonukleotidinius praimerius, naudojamus grandininėje polimerazės reakcijoje, kad būtų palengvintas įterpimas į vektorius. Alternatyviai bet kuris pageidaujamas saltas gali būti gautas nukleotidinių sekų (linkerių) legiravimu prie DNR galų; tie legiruoti linkeriai gali apimti specifinius, chemiškai sintezuotus oligonukleotidus, koduojančius restrikcinių endonukleazių atpažinimo sekas. Alternatyviame įgyvendinime suskaldytas vektorius ir CNTF genas gali būti modifikuoti homopolimeriniu priauginimu.

Specifiniuose įgyvendinimuose ląstelių-šeimininkų transformavimas rekombinantinių DNR molekulėmis, kad būtų inkorporuotas išskirtas CNTF genas, kDNR arba sintezuota DNR seka, įgalina generuoti daugybines geno kopijas. Tuo būdu genas gali būti gautas dideliais kiekiais, išauginant transformantus, išskiriant iš transformantų rekombinantinės DNR molekulę ir, kai būtina, atstatant įterptą geną iš išskirtos rekombinantinės DNR.

Pagal tinkamesnį išradimo įgyvendinimą, kadangi iš kDNR jau gautas klonas, koduojantis CNTF, galima išskirti binominį kloną, koduojantį CNTF, panaudojant standartinius specialistui žinomus būdus. Pvz., žymėtas nukleorūgščių zondas gali būti gautas iš CNTF klono ir panaudotas genominių DNR bibliotekų skринingui nukleorūgščių hibridizacijos būdu, naudojant, pvz., būdą, sukurtą Benton ir Davis (1977, Science, 198: 180) bakteriofagų bibliotekoms, bei Grunstein ir Hogness būdą (1975, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 72: 3961-3965) plazmidinėms bibliotekoms. Atstatyti klonai paskui gali būti analizuojami sudarant restrikcinius-fragmentinius žemėlapius būdais, gerai žinomais

specialistams. Be to, iš kDNR bibliotekos gali būti identifikuoti papildomi kDNR klonai, naudojant sekas, gautas pagal apibrėžimą.

5.5. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus geno ekspresija

Nukleotidų seka, koduojanti CNTF proteiną arba jo dalį, gali būti įterpta į atitinkamą ekspresijos vektorių, t.y. vektorių, kuris turi elementus, būtinus įterptos proteiną koduojančios sekos transkripcijai ir translacijai. Būtinai transkripciniai ir translaciniai signalai gali būti taip pat tiekiami natūralaus CNTF geno ir/arba jo flankuojančioms sritims. Įvairios sistemos vektorius-šeimininkas gali būti panaudotos proteiną koduojančios sekos ekspresijai. Šios sistemos apima, pvz., bet jomis neapsiriboja, žinduolių ląstelių sistemas, infekuotas virusu (pvz., karvės raupų virusu, adenovirusu ir t.t.); vabzdžių ląstelių sistemas, infekuotas virusu (pvz., bakulovirusu); mikroorganizmus, tokius kaip mielės, turinčius mielių vektorius, arba bakterijas, transformuotas DNR bakteriofago, plazmidine DNR arba kosmidine DNR. Šių vektorių ekspresijos elementai skiriasi pagal jėgą ir specifiškumą. Priklausomai nuo naudojamos sistemos vektorius-šeimininkas gali būti naudojamas bet koks iš žinomų daugybinių transkripcinių ir translacinių elementų.

Bet kuris iš anksčiau aprašytų DNR fragmentų įterpimo į vektorių būdų gali būti panaudotas sukonstruoti ekspresijos vektorius turinčius chimerinį geną, susidedančius iš atitinkamų signalų, kontroliuojančių transkripciją/translaciją ir proteiną koduojančias sekas. Šie būdai gali apimti DNR rekombinacijos ir sintezės technologijas in vitro, o taip pat rekombinacijas in vivo (genetines rekombinacijas). Nukleinorūgščių sekų, koduojančių CNTF proteiną arba peptidinį fragmentą, ekspresija gali būti reguliuojama antra nukleinorūgščių seka taip, kad CNTF proteinas arba peptidas išskiriamas šeimininke, transformuotame rekombinantinės DNR molekule. Pvz., CNTF ekspresija gali būti reguliuojama bet kuriuo promotoriniu/ padidinančiu elementu, žinomu specialistams.

07

Promotoriai, kurie gali būti naudojami CNTF ekspresijos valdymui, apima, pvz., bet tuo neapsiriboja, SV40 ankstyvąją promotoriaus sritį (Bernoist ir Chamben 1981, 290: 304-310); promotorių, esantį 3' ilgame terminaliniame Rauso sarkomos viruso pakartojime (Jamamoto ir kt., 1960, Cell, 22: 787-797), herpes viruso timidino-kinazės promotorių (Vagner ir kt., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 78: 144-1445), metalotionino geno reguliacinės sekas (Brinster ir kt., 1982, Nature, 296: 39-42); prokariotinius ekspresijos vektorius, tokius kaip beta-laktamazės promotorius (Villa-Kamaroff ir kt., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 75: 3727-3731) arba tac promotorius (DeBoer ir kt., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 80: 21-25, žiūr. taip pat "Scientific american", 1960, 242:74-94, straipsnį "Useful proteins from recombinant bacteria"); augalinius ekspresijos vektorius, apimančius nopalin-sintetazės promotorių (Aerrera-Estrella ir kt., Nature, 3035: 209-213) arba spalvotų kopūstų 35S mozaikinės ligos viruso RNR promotorių (Gardner ir kt., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871) ir promotorių fotosintetiniam fermentui ribulozo- bifosfat-karboksilazei (Herrera- Estrella ir kt., 1984, Nature 310: 115-120); promotorinius elementus iš mielių arba kitokių grybelių, tokių kaip Gal4 promotorius, ADS- (alkoholinės dehidrogenazės) promotorių, PGK- (fosfoglicerin-kinazės promotorių), šarminės fosfatazės promotorių, ir tokios transkripcijos valdymo sritis gyvūnuose, kurios išryškina audinių specifiškumą, ir buvo naudojamos transgeniniuose gyvūnuose: elastazės I geno kontroliuojančią sritį, kuri yra aktyvi skrandžio liaukos ląstelėse (Swift ir kt., 1984, Cell, 38: 639-646; Ornitz ir kt., 1986, Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-403; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); insulino, kuris aktyvus pankreatitinėse beta-ląstelėse, geno valdymo sritį (Hanahan, 1985, Nature, 315: 115-122), imunoglobulino, kuris aktyvus limfoidinėse ląstelėse, geno valdymo sritį (Cros-scheld ir kt., 1984, Cell, 38: 647-658; Adames ir kt., 1985, Nature, 318: 533-538, Alexander ir kt., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444), pelės pieno liaukos auglio viruso, kuris aktyvus lytinėse liaukose ir pieno liaukos ląstelėse bei limfoidinėse ląstelėse, valdymo sritį (Leder ir kt.,

28

1986, Cell, 45: 485-495); albumino, kuris aktyvus kepenyse, geno valdymo sritį (Pinkert ir kt., 1987, Genes ir Devel, 1: 268-276), alfa-fotoproteino, kuris aktyvus kepenyse, geno valdymo sritį (Krumlauf ir kt., 1987, Science, 235: 53-58); alfa-1-antitripsino, kuris aktyvus kepenyse, geno valdymo sritį (Kelsey ir kt., 1987, Genes ir Devel, 1:161-171); beta-globino, kuris aktyvus mieloidinėse ląstelėse, geno valdymo sritį (Mogam ir kt., 1985, Nature, 315: 338-340; Kollias ir kt., 1986, Cell, 46: 89-94); mielino pagrindinio proteino, kuris aktyvus galvos smegenų oligodendrocituose, geno valdymo sritį (Readhead ir kt., 1987, Cell, 48:703-712), lengvos grandinės-2 miozino, kuris aktyvus skeletiniuose raumenyse, geno valdymo sritį (Sani,, 1985, Nature, 314: 285-286); ir išlaisvinančio genadotropinio hormono, kuris aktyvus pagumburyje, geno valdymo sritį (Masen ir kt., 1986, Science, 234: 1372-1378).

Ekspresijos vektoriai, kurie apima CNTF geno interpus, gali būti identifikuoti trimis pagrindiniais būdais:

- (a) DNR-DNR hibridizacija;
- (b) markerinio geno funkcijos buvimu arba nebuvimu; ir
- (c) įterptų sekų ekspresija.

Pirmame būde svetimo geno, įterpto į ekspresijos vektorių, buvimas gali būti aptiktas DNR-DNR hibridizacija, panaudojant zondus, apimančius sekas, kurios yra homologinės CNTF genui. Pagal antrą būdą sistema rekombinantinis vektorius/šeimininkas gali būti identifikuota ir gali būti atlikta jos selekcija pagal tai, ar markerinio geno funkcijos yra, ar nėra (pvz., timidin- kinazės aktyvumo, pasipriešinimo antibiotikams, transformaciniam fenotipui, okliuzijos kūnų susidarymui bakuloviruse ir t.t.), iššaukiamų svetimo geno įterpimu į vektorių. Pvz., jei CNTF genas įterptas į vektoriaus markerinio geno seką, tai rekombinantai, turintys interpą CNTF, gali būti identifikuoti markerinio geno funkcijos nebuvimu. Pagal trečią būdą rekombinantiniai ekspresijos vektoriai gali būti identifikuoti svetimo geno produkto ekspresijos šiuo rekombinantu dėka. Šio produkto tyrinėjimai gali būti paremti, pvz., CNTF geno produkto fizinėmis ir funkcinėmis

28

savybėmis bloeksperimento sistemose, kaip aprašyta skyrelyje 5.2.

Kadangi konkreti rekombinantinės DNR molekulė identifikuota ir išskirta, tai dabar jos dauginimui gali būti panaudoti keli specialistams žinomi būdai. Kai sukurta tinkama šeimininko sistema ir augimo sąlygos, ekspresijos vektoriai gali būti padauginėti ir gauti dideliais kiekiais. Kaip anksčiau buvo aiškinama, ekspresijos vektoriai, kurie gali būti panaudoti, apima tokius vektorius ir jų darinius (bet jais neapsiriboja):

- žmogaus arba gyvūnų virusus, tokius kaip karvės raupų virusas arba adenovirusas;
- vabzdžių virusus, tokius kaip bakulovirusas;
- mielių vektoriai;
- bakteriofaginiai vektoriai (pvz., lambda), o taip pat plazmidinės ir kosmidinės DNR.

Be to, ląstelės-šeimininko štamai gali būti parinkti toks, kad moduluotų įterptų sekų ekspresiją arba modifikuotų ir gamintų geno produktą specifiniu norimu būdu. Tam tikri promotoriai gali sustiprinti ekspresiją, esant tam tikriems faktoriams, taip CNTF proteino, gauto genų inžinerija, ekspresiją galima kontroliuoti. Be to, įvairios ląstelės-šeimininkai pasižymi būdingais ir specifiniais mechanizmais proteinų transliaciniam ir potransliaciniam apdirbimui ir modifikavimui (pvz., glikozilinimas, suskaldymas). Gali būti parinktos tinkamos šeimininkų sistemų ląstelinės linijos, kad būtų pasiekta išskiriamo svetimo proteino pageldaujama modifikacija ir apdirbimas. Pvz., gali būti panaudota ekspresija bakterinėje sistemoje, kad būtų gautas neglikozilintas šerdis proteino produktas. Ekspresija mielėse duos glikozilintą produktą. Ekspresija žinduolių ląstelėse gali būti panaudota atlikti "natūralų" heterologinio CNTF proteino glikozilinimą. Be to, įvairios ekspresinės sistemos vektorius-šeimininkas gali turėti įtakos technologinėms reakcijoms, tokioms kaip proteolitinis suskaldymas iki tam tikro lygio.

Specifiniame išradimo įgyvendinime koduojanti CNTF DNR gali būti klonuojama į plazmidę pCMV, amplifikuojama ir po to naudojama Hela ląstelių transformavimui DEAE-dekstrino būdu, po to CNTF-aktyvumas gali būti surinktas iš ląstelių ekstraktų (žiūr. 6 skyrelio pvz. žemiau).

Kitame specifiniame išradimo įgyvendinime DNR, koduojanti CNTF, gali būti inkorporuota į atitinkamą ekspresijos vektorių ir panaudota *E. coli* transformavimui, taip gaunant biologiškai aktyvų CNTF (žiūr. 7 skyrelio pvz. žemiau).

Atskiruose išradimo įgyvendinimuose CNTF ekspresija *E. coli* geriau atliekama panaudojant vektorius, kurie apima vieną iš tokių vektorių: lac UV5 promotorius, kuris gali būti kontroliuojamas laktozinio operono; stiprus ribosomų surišimo saitas, pvz., ribosominis surišantis bakteriofago T7 saitas; mutacija plazmidės valdymo replikacija srityje, kuri gali padidinti kopijų skaičių; arba mutacija, kuri apriboja proteino ekspresiją pasipriešinimu antibiotikui. Tinkamesniame konkrečiame įgyvendinime CNTF ekspresija pagal šį išradimą atliekama, naudojant vektorių pRPN12, kuris gali 30-50 kartų padidinti CNTF ekspresiją, lyginant su kitais vektoriais (12 skyrelis žemiau). Kitame tinkamame išradimo įgyvendinime ekspresijos vektorius pRPN38 gali būti naudojamas CNTF gamybai *E. coli*. Kituose tinkamuose įgyvendinimuose žmogaus CNTF gali būti išskiriamas *E. coli*, panaudojant vektorių pRPN40. Išradimas taip pat pateikia molekules, kurios yra funkciniai ekvivalentiškos plazmidėms pRPN12, pRPN38, pRPN39 ir pRPN40, kurios apima ekvivalentinius elementus (promotorių, ribosomas surišantį saitą ir t.t.), kurie veda prie palyginamų CNTF ekspresijos lygių.

5.5.1. Išskirto geno produkto identifikavimas ir išvalymas

Kai identifikuotas rekombinantas, išskiriantis CNTF geną, reikia analizuoti geno produktą. Tai galima pasiekti eksperimentais, paremtais fizinėmis ir funkcinėmis produkto savybėmis. Kai

identifikuotas CNTF proteinas, jis gali būti išskirtas ir išvalytas standartiniais būdais, apimančiais chromatografiją (pvz., jonų mainų, afininę ir kolonėlės chromatografiją išmatavimų nustatymui), centrifugavimą, diferencialinį ištirpinimą arba bet kurią kitą žinomą proteinų išvalymo būdą. Funkcinės savybės gali būti įvertintos, panaudojant bet kurią žinomą CNTF tyrimo būdą, įskaitant, pvz., eksperimentus su viščiuko embriono ciliarinio ganglijo neuronais.

Svarbu pažymėti, kad pagal būdą, numatytą CNTF gavimui iš sėdmeninio nervo audinio, gaunamas CNTF, kuris bus nevysiškai aktyvus dėl likusio SDS buvimo, kadangi šie būdai kaip paskutinę savo stadiją apima preparatyvinę gelio elektroforezę. Priešingai, šis išradimas pateikia CNTF su optimaliu biologiniu aktyvumu išvalymo būdą, kuris tinkamas baltyminiams sekvenavimui, panaudojant HPLC; šis išradimas taip pat įgalina rekombinantinio CNTF, gauto iš rekombinantinių nukleorūgščių molekulių arba chemiškai sintezuoto, kuris yra laisvas nuo SDS ir visiškai aktyvus, išskyrimą.

5.6. Ciliarinio neurotrofinio faktoriaus genai ir proteinais

Naudojant smulkiai aprašytus aukščiau būdus, o taip pat būdus, aprašytus žemiau, buvo nustatytos tokios nukleorūgščių sekos ir gautos jų atitinkamos aminorūgščių sekos. Buvo nustatyta žiurkės CNTF kDNR seka ir ji parodyta I brėž. Buvo nustatyta žmogaus genomine CNTF-seka, kuri parodyta 8 brėž. Kiekviena iš šių sekų (arba jų funkciniai ekvivalentai) gali būti panaudota pagal šį išradimą. Be to, išradimas skirtas CNTF genams ir proteinams, gautiems iš kiaulės, avies, karvės, arklio, paukščio, katės ir šuns, o taip pat iš primatų ir bet kurių kitų šaltinių ir gyvūnų rūšių, kuriose yra CNTF-aktyvumo. Išradimas toliau skirtas CNTF-nukleorūgščių posekams, apimančioms bent 10 tokių posekių nukleotidų, kurie apima sugėbančias hibridizuotis CNTF sekos atkarpas, kurios naudojamos, pvz., nukleorūgščių hibridizacijos bandymuose, Southern bei Northern blotinguose ir t.t. Išradimas

taip pat pateikia CNTF proteinus, fragmentus ir jų darinius pagal aminorūgščių sekas, pateiktas 1 ir 8 brėž. arba jų funkcinius ekvivalentus. Išradimas taip pat pateikia CNTF- proteinų fragmentus ir darinius, kurie apima antigeninį determinantą (us) arba kurie yra funkciniai aktyvūs. Panaudotas čia terminas "funkciniai aktyvūs" gali reikšti "pasirūpinantis teigiamu aktyvumu" žinomų CNTF funkcijų eksperimentuose, pvz., viščiuko embriono ciliarinio ganglijo bandymuose.

Pvz., nukleorūgščių sekos, parodytos 1 ir 8 brėž., gali būti pakeistos pavadinimų, pridėjimų ir delecijų būdu, po kurių gaunamos funkciniai ekvivalentiškos molekulės. Dėl nukleotidinių koduojančių sekų degeneracijos pagal šį išradimą praktikoje gali būti panaudotos kitos DNR sekos, kurios koduoja iš esmės tas pačias aminorūgščių sekas, kaip parodyta 1 ir 8 brėž. Šios sekos apima, pvz., bet jomis neapsiriboja, nukleotidų sekas, apimančias 1 ir 8 brėž. parodytus CNTF genus pilnai arba jų dalis, kurios gali būti pakeistos pavaduojant įvairius kodonus; kurios koduoja funkciniai ekvivalentinius aminorūgščių likučius tos sekos viduje, tuo būdu atlikdamos tylią mutaciją. Panašiai CNTF proteinais arba fragmentais, arba jų dariniais pagal šį apibrėžimą apima, pvz., bet jais neapsiriboja, tokius, kuriuose kaip pirminė aminorūgščių seka, yra dalis arba visa aminorūgščių seka, iš esmės taip, kaip parodyta 1 ir 8 brėž., įskaitant pakeistas sekas, kuriose pavaduoti funkciniai ekvivalentiški aminorūgščių likučiai sekos viduje veda prie tylios mutacijos. Pvz., vienas ar daugiau aminorūgščių likučių sekos viduje gali būti pavaduoti kitu aminorūgščių panašiu poliariskumu, kuris veikia kaip funkcinis ekvivalentas, vedantis prie tylaus pakeitimo. Pavadinimai aminorūgščių sekos viduje gali būti parinkti iš dviejų tos pačios klasės, kuriai priklauso duota aminorūgštis, narių. Pvz., nepoliarinės- hidrofobinės aminorūgštys apima alaniną, izoleuciną, valiną, proliną, fenilalaniną, triptofaną ir metioniną. Poliarinės neutralios aminorūgštys apima gliciseriną, treoniną, cisteiną, tiroziną, asparaginą ir gliutaminą. Teigiamai pakrautos aminorūgštys (šarminės) apima argininą, liziną ir histidiną.

Neigiamai pakrautos (rūgštinės) aminorūgštys apima asparagino ir gliutamino rūgštis. Į išradimą taip pat įtraukti CNTF proteinais arba fragmentais, arba jų dariniais, kurie diferenciališkai modifikuoti transliacijos metu arba po jos, pvz., glikozilinimo metu, proteolitinio suskaldymo, antikūno ligavimo prie molekulės arba kito ląstelinio ligando metu ir t.t. 8 skyrelyje žemiau pateiktas biologiškai aktyvaus rekombinantinio CNTF ekspresijos E. coli pavyzdys, kartu nurodant, kad neglikozilintas CNTF yra biologiškai aktyvus.

Be to, rekombinantinį CNTF koduojančios nukleorūgščių sekos pagal šį išradimą gali būti sukonstruotos taip, kad pagerintų CNTF apdirbimą ir ekspresiją. Kaip pavyzdys, tuo neapsiribojant, signalinė seka gali būti įterpta aukščiau koduojančios CNTF sekos, tuo leidžiant CNTF išskyrimą ir tuo pačiu palengvinant CNTF surinkimą arba jo bioprieinamumą.

Be to, duotas CNTF gali būti mutuoamas in vitro arba in vivo transliacijos, imitacijos ir/arba užbaigimo sukūrimui ir/arba sugriovimui, arba dėl variantų koduojančiose srityse sudarymui ir/arba naujų restrikcinių saitų endonukleazėms sudarymui, arba egzistuojančių saitų išardymui, kad būtų palengvintas tolesnis modifikavimas in vitro. Gali būti panaudota bet kokia specialistui žinoma technologija, įskaitant, pvz., bet tuo neapsiribojant, in vitro nukreipto taško mutagenezę (Hutchinson ir kt., 1978, J. Biol. Chem., 253: 6551), ištiesintojų pritaikymą ("Farmacija") ir t.t.

5.7. Antikūnų prieš ciliarinį neurotrofinį faktorių sukūrimas

Pagal išradimą CNTF proteinas arba jo fragmentai ar dariniai gali būti panaudoti kaip imunogenas antikūnų prieš CNTF generavimui. Ribotų CNTF kiekių problemos buvo išvengta, suradus galimybę gaminti palyginus gausius CNTF-proteino kiekius, panaudojant proteino sintezės būdus CNTF nukleorūgščių sekų pagal šį išradimą pagrindu.

Tolesniam imuninės reakcijos prieš CNTF gerinimui CNTF aminorūgščių seka gali būti išanalizuota, kad būtų identifikuotos molekulės dalys, kurios gali būti susijusios su padidėjusiu imunogeniškumu. Pvz., aminorūgščių seka gali būti išanalizuota kompiuteriu, identifikuojant paviršinius epitopus, kaip pailiustruota 15(a) ir (b) brėžiniuose, kurie rodo kompiuteriu gautas atitinkamai žiurkės ir žmogaus CNTF hidrofiliškumo, paviršinės tikimybės, lankstumo, antigeninio indekso, amfifilinės spiralinės, amfifilinės plokštumos ir antrinės struktūros diagramas. Alternatyviai, CNTF iš įvairių gyvūnų rūšių aminorūgščių sekos galėtų būti lyginamos tarpusavyje, kartu identifikuojant santykinai nehomologines sritis; šios nehomologinės sritys būtų su didesne tikimybe imunogeninės tarp įvairių gyvūnų rūšių.

Gaunant monokloninius antikūnus, nukreiptus prieš CNTF, gali būti panaudota bet kokia technologija, pagal kurią gaminamos antikūno molekulės stabiliais ląsteliniiais štamais kultūroje. Pvz., į šį išradimą įjungtos tokios technologijos, kaip hibridominė technologija, pirmą kartą sukurta Koler ir Milshtein (1975, *Nature*, 256: 495-497), o taip pat žmogaus B-ląstelinė hibrodomos triominė technologija (Kozbor ir kt., 1983, *Immunology Today*, 4:7) ir EBV-hibridominė technologija žmogaus monokloninių antikūnų gamybai (Cole ir kt., 1985, "Monoklonal Antibodies and cancer Therapy", p.77-96) ir kitos panašios technologijos.

Monokloniniai antikūnai terapiniam naudojimui gali būti žmogaus monokloniniai antikūnai arba chimeriniai žmogaus, žiurkės (arba kitų rūšių gyvūnų) monokloniniai antikūnai. Žmogaus monokloniniai antikūnai gali būti sukurti pagal bet kurią iš daugelio specialistams žinomų technologijų (Pvz., Teng ir kt., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci., JAV*, 80:7308-7312; Kozbor ir kt., 1983, *Immunology Today*; 4:72-79; Ollson ir kt., 1982, *Meth. Enzymol.*, 92: 3-16).

Chimerinės antikūnų molekulės gali būti gautos, išlaikant jose

žiurkės antigeną surišančią domeną žmogaus pastoviomis sritimis (Morrison ir kt., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci, JAV, 81:6851; Takeda ir kt., Nature, 1985, 314: 452).

Įvairūs specialistui žinomi būdai gali būti panaudoti polikloninių antikūnų CNTF epitopams gamybai. Antikūnų gamybai įvairūs gyvūnų šeiminkai gali būti imunizuojami CNTF- proteino (arba jo fragmento ar darinių) injekcijomis, įskaitant, pvz., bet jais neapsiribojama, triušius, peles, žiurkes ir t.t. Imunologinės reakcijos padidinimui gali būti panaudoti įvairūs priedai, atsižvelgiant į gyvūno- šeiminko rūšį, įskaitant, pvz., bet tuo neapribojama, Freindą (pilną ir nepilną), mineralinius gelius, tokius kaip aliuminio hidroksidas; paviršiaus aktyvias medžiagas, tokias kaip lizolecitinas, plirono poliolai, polianijonai, peptidai, aliejinės emulsijos, tipo "keyhole limpet" hemocianinai, dinitrofenolis; ir potencialiai naudingus žmogaus adjuvantus, tokius kaip BCG (BCG-Bacille Calmette Guerin) ir Corynebacterium parvum.

Molekulinis antikūno prieš CNTF epitopą klonas gali būti gautas žinomais būdais. Nukleinorūgščių sekos, kuri koduoja monokloninį antikūną, arba jos antigeną surišančios srities sudarymui gali būti naudojamas rekombinantinės DNR būdas (žiūr. laboratorinį Maniatis vadovėlį "Molekulinis klonavimas", 1962, Cold Spring Harbor, New York).

Antikūnų molekulės gali būti išvalytos žinomais būdais, pvz., imunoabsorbicija arba imunoafinine chromatografija, tokiais chromatografiniais būdais, kaip HPLC (didelio efektyvumo skystinė chromatografija), arba jų deriniais ir t.t.

Taip pat žinomais būdais gali būti generuojami antikūnų fragmentai, kurie turi molekulės idiotipą. Pvz., tokie fragmentai, (išradimas jais neapsiribojama) apima $F(ab')_2$ fragmentą, kuris gali būti gautas pepsininiu antikūno molekulės virškinimu; Fab' fragmentus, kurie gali būti gauti sumažinant disulfidinių

fragmento $F(ab')_2$ tilteilių kiekį; ir fragmentus 2Fab arba Fab, kurie gali būti gauti apdirbant antikūno molekules papainu ir redukuojančiu (atstatančiu) agentu.

9 skyrelio pavyzdys aprašo gavimą polikloninio antiserumo, nukreipto prieš peptidinį CNTF proteino, sudaryto iš 14 aminorūgščių, fragmentą.

17 skyrelio pavyzdys aprašo keturis monokloninius antikūnus prieš CNTF, kuriuos pateikia šis išradimas, būtent, RP3-I2, RPI2-I, RPI2-2 ir RPI2-9.

5.8. Išradimo panaudojimas

Šis išradimas skirtas CNTF nukleino rūgščių sekoms, o taip pat gryniems proteinams, peptidiniams fragmentams arba dariniams, gautiems iš jų. CNTF proteinais, peptidais ir dariniais, antikūnais prieš CNTF ir CNTF nukleinorūgščių zondais gali būti panaudoti diagnostiniuose terapiniuose taikymuose. Diagnostiniams ir terapiniams tikslams geriau naudoti CNTF genus arba genų produktus iš tų pačių gyvūnų rūšių, nors specifiniuose įgyvendinimuose gali būti naudingi ir skirtingų rūšių CNTF panaudojimai.

5.8.1. Diagnostiniai panaudojimai

Šis išradimas, kuris skirtas nukleinorūgštims, koduojančioms CNTF, proteinams, peptidiniams fragmentams arba gautiems iš jų dariniams, o taip pat antikūnams, nukreiptiems prieš CNTF-proteinų, peptidus arba jų darinius, gali būti naudojamas nervinės sistemos sutrikimų, kurie gali būti susiję su pakitimais CNTF ekspresijoje, diagnostikai.

Įvairiuose išradimo įgyvendinimuose CNTF genai ir atitinkamos nukleino sekos ir posekės, įskaitant komplementarias sekas, gali būti naudojami diagnostinės hibridizacijos bandymuose. CNTF nukleinorūgščių sekos arba jų posekės gali būti naudojamos kaip

hibridizaciniai zondai (posekės turi apimti bent 10 nukleotidų). Hibridizaciniai eksperimentai gali būti naudojami suradimui, prognozavimui, diagnostikai ir monitoringui būklių, sutrikimų arba ligų, susijusių su CNTF ekspresijos pakitimais, įskaitant, atskiru atveju, būklės, vedančias prie neuronų, kurie, kaip žinoma, atsako į CNTF, tokių kaip parasimpatiniai neuronai, cholinerginiai neuronai, nugaros smegenų neuronai, neuroblastų ląstelės ir antinksčių smegenų ląstelės, pažeidimo ir degeneracijos. Tokios ligos ir būklės apima (bet išradimas jomis neapsiriboja), pvz., CNS traumą, infarktą, infekciją, degeneratyvinių nervinių susirgimų, piktybinį darinį arba pooperacinius pakitimus, įskaitant (bet išradimas tuo neapsiriboja) Alzheimerio ligą, Parkinsono ligą, Chantingtono chorėją ir amiotropinę lateralinę sklerozę. Pvz., bendra RNR iš audinio pavyzdžio, paimto iš ligonio, gali būti ištirta, ar yra mRNR CNTF, ir mRNR CNTF kiekio sumažėjimas rodo neuroninę degeneraciją.

Alternatyviuose išradimo įgyvendinimuose antikūnai, nukreipti prieš CNTF proteiną, peptidinius fragmentus ir jų darinius, gali būti naudojami nervų sistemos ligų ir sutrikimų diagnostikai, įskaitant, atskiru atveju, tas neuronų populiacijas bei klinikinius susirgimus ir sutrikimus, kurie buvo išvardinti aukščiau. Antikūnai, nukreipti prieš CNTF proteinus pagal šį išradimą gali būti panaudoti, pvz., imunohistocheminiam CNTF aktyvumo identifikavimui audinių gabalėliuose arba biopsijai iš paciento, jei toks įvertinimas reikalingas. Kitas pavyzdys yra antikūno pagal šį išradimą panaudojimas ELISA procedūrose CNTF, esančio audinių arba skysčių pavyzdžiuose, suradimui ir/arba jo kiekio išmatavimui; analogiškai antikūnai pagal šį išradimą gali būti naudojami Western-blot analizėje CNTF, esančio audiniuose arba skysčių pavyzdžiuose, suradimui ir/arba išmatavimui. Antikūnas pagal šį išradimą, kuris suriša CNTF ir imunonusodina jį, aprašytas 11 skyrelyje žemiau.

Tolimesniuose išradimo įgyvendinimuose CNTF proteinas, peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti panaudoti nervų sistemos ligų

ir sutrikimų diagnostikai. Atskirame įgyvendinime (išradimas tuo neapribojamas), pvz., žymėti CNTF proteinas arba peptidiniai fragmentai gali būti panaudoti audinių ir ląstelių, kurios išskiria CNTF receptorių, identifikavimui, kad būtų identifiukuoti CNTF receptoriaus ekspresijos nukrypimai ir, vadinasi, potencialūs nukrypimai nuo normos audinių arba ląstelių reakcijoje CNTF.

Šis išradimas taip pat pateikia imunologinius tyrimus CNTF kiekio matavimui skysčio pavyzdyje, kuris yra antikūninis "sumuštinio" būdas, numatantis pirmo antikūno prieš CNTF surišimą su tvirtu pagrindu. Surišto pirmo antikūno poveikimas tirpalu, kuriame yra CNTF, sąlygose, įgalinančiose pirmo antikūno surišimą su CNTF, paskui surišto su pirmu antikūnu CNTF poveikimas antikūnu prieš CNTF, kuris tinkamesniu atveju nukreiptas į kitą CNTF epitopą negu pirmas antikūnas, sąlygose, įgalinančiose CNTF surišimą su antru antikūnu, po to antro antikūno surišimo su CNTF suradimas, naudojant specialistui žinomus būdus, įskaitant (bet išradimas tuo neapribojamas), pvz., antro antikūno surišimą su anti-imunoglobulino antikūnu, sujungtu su indikatorine medžiaga, tokia kaip fluorescencinis junginys, arba su junginiu, turinčiu radioizotopų, arba su fermentu, kuris gali produkuoti signalą kolorimetriniame bandyme. Tinkamesniame išradimo įgyvendinime monokloniniai antikūnai RP3-I2 ir RPI2-2 gali būti panaudoti tokiuose antikūnų tyrinėjimuose, kaip "sumuštinio" tipo žmogaus CNTF tyrinėjimai (žiūr. 17 skyrelį žemiau). Toks būdas gali būti panaudotas kaip jautrus eksperimentas CNTF lygių matavimui, ir gali būti panaudotas nervinių susirgimų, susijusių su nenormalia CNTF ekspresija, diagnostikoje.

5.8.2. Terapiniai panaudojimai

Šis išradimas, kuris skirtas nukleorūgštims, koduojančioms CNTF, ir proteinams, peptidiniams fragmentams arba dariniams, gautiems iš šių sekų, o taip pat antikūnams, nukreiptiems prieš CNTF-proteiną, peptidus arba darinius, gali būti panaudotas nervų sistemos ligų arba sutrikimų, kurie gali būti susiję su pakitimais

CNTF ekspresijoje arba kurie gali būti sukelti CNTF arba antikūnų prieš CNTF poveikio, gydymui.

Įvairiuose išradimo įgyvendinimuose CNTF proteinas, peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti įvedami pacientui, kurio nervinė sistema buvo pažeista traumos, chirurgijos, ischemijos, infekcijos (pvz., poliomiellito arba AIDS), medžiagų apykaitos ligų, maisto nepakankamumo, piktybinių darinių, toksinių agentų arba dar nežinomos kilmės degeneracinės ligos. Įvairiuose specifiniuose išradimo įgyvendinimuose CNTF gali būti įvedamas prie nugaros smegenų neuronų, kurios gali būti pažeistos, pvz., traumos, infarkto, infekcijos, degeneracinės ligos arba chirurginio įsikišimo; 10 skyriaus pavyzdyje pailustruotas CNTF panaudojimas nugaros smegenų neuronų išgyvenimui padėti.

CNTF nukleinorūgštys, peptidai ir dariniai pagal šį išradimą gali būti naudojami motoneuronų sutrikimų gydymui. 11 skyrelio pavyzdys iliustruoja nuostabų CNTF efektyvumą, padedant išgyventi neuronams perpjautame veido nerve. Atitinkamai atskiruose išradimo įgyvendinimuose CNTF arba peptidai ar jo dariniai gali būti panaudoti Bela paralyžiaus (CNTF) arba paralyžiaus, apimančio veido nervą, gydymui, taip pat kitų judamosios neuronų sistemos, įskaitant (bet išradimas tuo neapsiriboja), pvz., amiotropinę lateralinę sklerozę, progresyviąją nugaros raumenų atrofiją, progresyvų bulbarinį paralyžių, pirminę lateralinę sklerozę ir nugaros raumenų atrofiją (Berdningo-Hofmano liga ir Kugelbergo-Belanderio liga) ir po-poliomielitinį sindromą.

Motoneuronų degeneracija ir žūtis nugaros raumenų ventraliniame rage yra patofiziologinio proceso pagrindinis aspektas, sergant amiotropine lateraline skleroze (ALS; Lui Geringo liga), nugaros smegenų pažeidimais ir atitinkamomis ligomis. Žemiau pateikti rezultatai 10 ir 14 skyreliuose rodo, kad CNTF gali būti naudojamas tokių susirgimų gydyme nugaros smegenų motoneuronų išgyvenimo padidinimui ir cholinerginės ekspresijos sustiprinimui.

Be to, kaip patvirtinta duomenimis, pateiktais 18 skyrelyje žemiau, farmacinės kompozicijos, apimančios pagrindinį fibroblastų augimo faktorių, arba geriau CNTF ir pagrindinį fibroblastų augimo faktorių, gali būti panaudotos judamųjų neuronų išgyvenimo padidinimui, o taip pat aukščiau nurodytų motoneuronų ligų gydymui.

Šis išradimas taip pat gali būti panaudotas, pvz., pacientų, sergančių diabetinėmis neuropatijomis, pvz., mononeuropatijos multipleksu arba impotencija, išgijimo pagreitinimui. Kituose įgyvendinimuose CNTF proteinas arba peptidiniai fragmentai ar jų dariniai gali būti panaudoti įgimtų ligų arba neurodegeneracinių sutrikimų, įskaitant (išradimas jais neapsiriboja), pvz., Alzheimerio ligą, senėjimą, periferines neuropatijas, Parkinsono ligą, Chantingtono chorėją ir motoneuronų ligas bei sutrikimus; atskiru atveju, išradimas gali būti panaudotas įgimtų neurodegeneracinių sutrikimų, susijusių su cholinerginiais neuronais, gydymui;

Buvo parodyta, kad Alzheimerio liga apima selektyvią cholinerginių neuronų žūtį bazalinėse priekinėse smegenyse ir, kaip parodyta, 35% sergančiųjų parkinsonizmu kamuoja Alzheimerio tipo demencija; CNTF, gautas pagal šį išradimą, gali būti naudingas kaip vienintelis terapinis agentas šiam kompleksiniam susirgimui. Analogiškai CNTF, gautas pagal šį išradimą, gali būti naudojamas terapiškai Alzheimerio ligos kartu su Dauno sindromu gydymui. CNTF, gautas pagal šį išradimą, gali būti naudojamas įvairių demencijų, kaip ir įgimtų apmokymo sutrikimų, gydymui.

Kaip parodyta 15 ir 16 skyreliuose žemiau, buvo pastebėta, kad CNTF pasižymi keliais aktyvumais Amono rago ląstelėse, įskaitant padidintą GABA išsiviniimą, neurofilamentinio proteino ir GAD-fermento ekspresijos sustiprinimą, GABAerginių neuronų išgyvenimo padidėjimą, Amono rago neuronų išgyvenimo padidinimą ir Amono rago astrocitų išgyvenimo padidinimą. Atitinkamai įvairiuose išradimo įgyvendinimuose CNTF gali būti panaudotas nervinių

susirgimų su pasireiškiančiu jo poveikiu Amono rago ląstelėse, gydymui, įskaitant gydymą (bet išradimas tuo neapribojamas), pvz., Alzheimerio ligos, infarkto ir toksinių pažeidimų.

CNTF, CNTF peptidai, antikūnai arba dariniai pagal šį išradimą taip pat gali būti naudojami gydyti auglius, prasidedančius nervų sistemos audinyje, įskaitant glioblastomą ir melanomą, kylančią iš melanocitų, išsivysčiusių iš nervinės kėtos.

Gali būti pageidautinas CNTF giminingų peptidų arba CNTF proteino įvedimas absorbcija ant membranos, pvz., silastiko membranos, gelio arba putos, kurie gali būti implantuoti arti prie pažeisto nervo. Specifiniame išradimo įgyvendinime CNTF proteino, peptidinių fragmentų arba darinių įvedimas gali būti panaudotas kartu su chirurgine audinių arba kitų uždelsto medikamento atpalaidavimo substancijų, įskaitant mikrosferas, mikrokapsules arba sintetinius implantantus, implantacija, gydant Alzheimerio ligą, amiotropinę lateralinę sklerozę arba kitas motoneuronų ligas (įskaitant, pvz., Verding-Hofmano ligą) ir Parkinsono ligą.

Tolimesniuose išradimo įgyvendinimuose CNTF proteinas, fragmentai arba dariniai gali būti panaudoti kartu su kitais citokinais, norint pasiekti norimą neurotrofinį efektą. Pavyzdžiui, bet neapribojimui, pagal šį išradimą CNTF gali būti panaudotas kartu su NAF, norint pasiekti stimuliuojantį poveikį augimui ir neuronų išgyvenimui. Nustatyta, kad CNTF gali veikti sinergetiškai su kitais, susidaranciais CNS peptidiniais faktoriais, kurie dar nepilnai apibūdinti, augant, vystantis ir išgyvenant plačiam neuroninių subpopuliacijų diapazonui centrinėje ir periferinėje nervų sistemoje.

Remiantis pilna CNTF molekulės charakteristika nustatyta, kad gali būti sukurti nauji CNTF peptidiniai fragmentai, dariniai arba mutantai, kurie sugeba veikti kaip kai kurių arba visų biologinių CNTF funkcijų agonistai arba antagonistai.

Kituose tolesniuose išradimo įgyvendinimuose antikūnai, nukreipti prieš CNTF proteiną arba peptidinius fragmentus ar jo darinius, gali būti įvedami pacientams, kenčiantiems nuo įvairių nervinių sutrikimų ir ligų, ir kuriems toks gydymas reikalingas. Pvz., pacientams, sergantiems CNTF gamybos pertekliumi, gali reikėti tokio gydymo. Antikūnai prieš CNTF gali būti naudojami apsaugai nuo sensorinių neuronų aberantinės regeneracijos (pvz., pooperacinės) arba chroniškų skausmų sindromo gydymui.

5.8.3. Farmacinės kompozicijos

Aktyvios kompozicijos pagal šį išradimą, į kurias gali įeiti visas arba dalis CNTF geninio produkto, įskaitant proteiną, peptidinius fragmentus arba darinius, gautus iš jo, arba antikūnai (arba antikūnų fragmentai), nukreipti prieš CNTF proteiną, peptidinius fragmentus arba darinius, arba CNTF darinys su kitu agentu, tokiu kaip NAF, gali būti įvedamos bet kokiame steriliame biosuderinamame nešėjuje, įskaitant, pavyzdžiui, bet ne apribojimui, fiziologinį tirpalą, dekstrozę ir vandenį.

CNTF proteinas, peptidinis fragmentas arba darinys gali apimti aminorūgščių seką arba jos posėkį, kaip parodyta 1 brėž. (žiurkės) ir 8 brėž. (žmogaus seka). CNTF gali būti gautas iš sekos, atitinkančios bet kokio tinkamo gyvūno, įskaitant, bet išradimas tuo neapriojamas, žmogų, kiaulę, žiurkę, viščiuką, karvę, šunį, avį, ožį, katę, triušį ir t.t., CNTF genus.

CNTF proteino, peptidinio fragmento, darinio arba antikūno kiekis, kuris bus efektyvus gydant konkretų susirgimą ar būklę, gali būti nustatytas standartiniais klinikiniais būdais. Kai galima, pageidautina nustatyti reakcijos kreivę, priklausančią nuo dozės ir ištirti farmacines kompozicijas pagal šį išradimą pirmiausiai in vitro, t.y. CNTF-bioeksperimentinėse sistemose, aprašytose aukščiau, o paskui naudingose gyvūnų modelinėse sistemose, prieš pradedant jas naudoti žmonėms. Remiantis duomenimis, gautais in vitro, specifiniame šio išradimo įgyvendinime farmacinė

kompozicija, kuri efektyvi ciliarinių ganglijų neuronų išgyvenimo padidinimui, gali duoti vietinę CNTF proteino koncentraciją apie 2 mg/ml. Papildomame specifiniame išradimo įgyvendinime farmacinė kompozicija, kuri efektyvi cholinerginio tipo neuronų išgyvenimo padidinimui, gali duoti vietinę CNTF proteino koncentraciją apie 40 trofinių vienetų mililitrui.

Įvedimo būdai apima (bet tuo išradimas neapribojamas), pvz., įvedimus į odą, į raumenis, į pilvą, intraveninius, poodinius, oralinius ir intranazalinius būdus. Be to, gali būti pageidaujama įvesti farmacinės kompozicijas pagal šį išradimą į centrinę nervų sistemą bet kuriuo tinkamu būdu, įskaitant įvedimą į skrandį ir intrarektalinę injekciją. Injekcija į skrandį gali būti palengvinta kateteriu, pvz., pritvirtintu prie rezervuaro, tokio kaip Omažo rezervuaras.

Be to, gali būti pageidautina naudoti farmacinės kompozicijas pagal išradimą vietoje, srityje, kuriai toks gydymas reikalingas; tai gali būti pasiekta, pvz. bet išradimas tuo neapribojamas, vietine infuzija chirurginės operacijos metu arba injekcija, arba kateteriu, arba implantavimo būdu, ir tada implantantas gali būti porėtas, neporėtas arba į želatiną panaši medžiaga, įskaitant membranas, tokias kaip sialastiko membranos arba pluoštai.

Išradimas taip pateikia farmacinės kompozicijas, įskaitant CNTF proteinus, peptidinius fragmentus arba jų darinius, įvedamus liposomomis, mikrodalelėmis arba mikrokapsulėmis. Įvairiuose išradimo įgyvendinimuose gali būti naudinga naudoti tokias kompozicijas, kad būtų pasiektas palaipsnis CNTF arba jam giminingų produktų atpalaidavimas.

Numatoma galimybė įvesti ląsteles, aktyviai produkujančias CNTF, CNTF giminingas substancijas, CNTF-antagonistus, antikūnus prieš CNTF srityje, kuriai reikalinga sumažinta arba padidinta CNTF koncentracija.

5.8.4. Molekuliniai zondai pagal šį išradimą gali būti naudojami naujų CNTF- homologiškų molekulių identifikavimui

Molekulės, pasižyminčios CNTF-aktyvumu, bet besiskiriančios pagal molekulinę masę, buvo identifikuotos įvairiose gyvūnų ir audinių rūšyse, įskaitant viščiuko embriono akį, žiurkės sėdmeninį nervą, pažeistą smegenų audinį, širdies ląsteles, neuroblastinių ląstelių supernatantus (Heymanns ir Unsicker, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 84: 7758-7762) ir antinksčių smegenų sluoksnį (Unsicker ir kt., 1985, Neurosci. Lett. 60: 127-132). Nežinoma, kiek iš jų yra identiškų arba skiriasi nuo CNTF, aprašyto čia; gali būti, kad bus rasti papildomi CNTF šaltiniai ir rūšys. Rekombinantinės DNR molekulės pagal šį išradimą arba antikūnai, nukreipti prieš CNTF proteinus arba peptidinius fragmentus pagal išradimą, gali būti panaudoti naujų homologinių CNTF molekulių charakterizavimui.

Pavyzdžiui, bet ne išradimo apribojimui, CNTF- koduojančios rekombinantinės DNR molekulės gali būti panaudotos kaip zondai naujų molekulių, kurios yra homologiškos, bet ne identiškų CNTF molekulėms, aprašytoms 1 ir 8 brėž., identifikavimui. Tos molekulės gali pasižymėti arba nepasižymėti CNTF aktyvumu, ir gali susidaryti iš tų pačių arba kitų genominių sekų, kaip molekulės, pateiktos 1 ir 8 brėž. Šios naujos molekulės galėjo būti identifikuotos panaudojant CNTF- koduojančių sekų, parodytų 1 ir 8 brėž., dalis kaip oligonukleotidinius praimerius PCR reakcijoje, panaudojant kaip matricą arba genominę DNR, arba ląstelių RNR, kurios geriau išskiria CNTF-homologą.

Panašiai antikūnai prieš CNTF gali būti naudojami polisomų, sintezuojančių CNTF homologinius proteinus, nusodinimui, ir tokiu būdu surinkta RNR paskui gali būti PCR-amplifikuota, panaudojant oligonukleotidinius praimerius pagal šį išradimą. Manoma, kad naudojant šį būdą galima identifikuoti ir klonuoti keletą CNTF-giminingų molekulių.

6. Pavyzdys: Molekulinis klonavimas, žiurkės ciliarinio

neurotrofinio faktoriaus (CNTF) ekspresija ir regioninis pasiskirstymas.

6.1. Medžiagos ir būdai

6.1.1. CNTF išvalymas ir suskaldymas

CNTF buvo valomas, kaip aprašyta anksčiau (Laadat ir kt., 1989, J. Cell. Biol. 108: 1807-1816). Papildomai po elektroeliucijos su preparatyviniu poliakrilamidiniu geliu CNTF buvo patalpinamas 7.75 x 100 x mm Bakerbond Gold C4 Widepore kolonėlėje ir eliuotas 0.1 % trifluoracto rūgštimi bei acetonitrilu su 0-60% gradientu. Biologiškai aktyvus proteinas buvo išplautas eliucija viename pike su 50-55% acetonitrilo. 4 μ g išvalyto CNTF, kurio pirmas išmatavimas buvo izoelektrinis fokusavimas pH 3.5-10.0 gradientu, o antras išmatavimas buvo 12% SDS poliakrilamidinio gelio elektroforezė, 2D-gelio analizė parodė, kad šis proteinas migravo kaip vienintelė dėmė (Saadat ir kt., 1989, J. Cell. Biol. 108: 1807-1816, žiūr. 2 brėž.). Lygiagrečiai buvo atliekama CNTF, kuriam nebuvo atliekama papildoma valymo stadija Bakerbond Gold C4 Widepore kolonėlėje, 2D-gelio analizė.

Vienintelis pikas, turintis CNTF, koncentravosi "Speed vake", kuriame oras buvo pakeistas argonu. Buvo nustatyta, kad argonas svarbus, užkertant kelią CNTF-aktyvumo praradimui, kuris atsiranda, oksiduojantis vienam ar daugiau metionino likučių.

BRCN- suskaldymui į 30 μ g išvalyto CNTF buvo pridėta skruzdžių rūgšties (su galutine 70 tūrio % koncentracija) ir BRCN (10 tūrio %) Po trijų valandų kambario temperatūroje buvo pridėta 500 μ l H_2O , ir medžiaga buvo koncentruota iki 50 μ l bei nedelsiant patalpinta Bakerbond Gold C4 Widepore kolonėlėje. Triptiniam suskaldymui 30 μ l chromatografiškai išvalyto CNTF buvo išdžiovinta, vėl ištirpinta 50 μ l 0.1 M tris-HCl (pH 8.0), kuriame buvo 10 mM $CaCl_2$ ir 3 μ g TPK tripsino (sigma), ir inkubuojama iki ryto 37°C temperatūroje. Gauti fragmentai buvo pakrauti į

Bakerbond Gold C4 Wdepore kolonėlę ir eliuuojami, panaudojant tas pačias sąlygas (srauto greitis 1 ml/min^{-1} , 0-60% acetonitrilo gradientas 60 min., monitoringas su 214 nm). Pikai buvo surenkami ranka. Peptidų aminorūgščių sekos buvo nustatytos automatizuotu sekvenatoriumi (Applied Biosystems, Eserskorn ir kt., 1988, Elektroforezė, 9: 830-838).

Išvalyto CNTF aminorūgščių kompozicija buvo nustatyta $5 \mu\text{g}$ CNTF hidrolize ir derivatizacija ninhidrinu (Tsugita ir kt., 1987, Biochem., 102: 1593-1597).

6.1.2. CNTF kDNR klonų generavimas

kDNR buvo sintezuojamos iš kultivuotų žiurkės astrocytų bendros RNR (Okayama ir kt., 1987, Methods Enzymology, 154: 3-29), panaudojant oligopraimerius b5 (oligonukleotidiniai praimeriai pateikti 1C brėž.) ir atvirkštinę transkriptazę (Bethesda Research Laboratories). Pirmas kDNR siūlas buvo kaip matrica specifinių CNTF segmentų amplifikacijai, panaudojant PCR (Saiki ir kt., 1988, Science, 239: 487-491). Klonas A buvo generuotas, panaudojant degeneruotus praimerus oligo-1 ir 2, o PCR praimeris buvo identifikuotas oligo-11, subklonuotas ir nustatyta jo seka. Šio dalinio klonų seka buvo naudojama praimerių 3 ir 4 sintezavimui kDNR galų amplifikacijai (RACE) pagal anksčiau aprašytus būdus. Gautos kDNR buvo subklonuotos į vektorių Bluescript SK⁺ ir buvo nustatytos jų sekos (klonai B ir C). Oligonukleotidas 7 buvo gautas iš genomino klonų sekos (Carroll, dar nepublikuoti rezultatai). Šis praimeris buvo naudojamas klonų D sukūrimui, panaudojant tą patį RACE būdą, kaip ir klonui C. Pilno ilgio kDNR klonas (E) ekspresijai eukariotinėse ląstelėse buvo gautas naudojant praimerus 9 ir 10 PCR reakcijai.

6.1.3. Northern-blot analizė

RNR buvo ekstrahuojamos iš įvairių žiurkės audinių, panaudojant guanidin-tiocianatinės ekstrakcijos būdą (Cmomezynski ir Sacchi,

1987, Anal. Biochem. 162: 156-159). Toks pat kiekis RNR (30 mg RNR, išskyrus mRNR iš raumenų, kurios buvo 50 µg) buvo glikozilintas ir buvo atlikta elektroforezė ant 1.2 % agarozinio gelio (Lindholm ir kt., 1988, Biol. Chem. 263: 16348-16351). Išplėstinės mRNR CNTF ekspresijos sėdmeniniame žiurkės nerve įvertinimui buvo atliekama 25 µg bendros RNR, išskirtos iš žiurkės sėdmeninio nervo, elektroforezė. P0, P4 ir P13 brėž. 4 (b) skirti RNR, gautas iš naujagimių, 4 dienų ir 13 dienų žiurkių sėdmeninio nervo. Žinomiems kiekams 847 bp CNTF transkripto (sintezuoto in vitro panaudojant ribozondinę sistemą Promega) taip pat buvo atlikta elektroforezė atskiruose takeliuose tam, kad būtų identifikuota CNTF- mRNR pavyzdžiuose. Po elektroforezės buvo atliktas vakuumo blotingas ant neiloninių filtrų (Hybond-N, Amersham) ir filtrai buvo hibridizuojami 50°C temperatūroje 50% formamide (Lindholm, aukščiau), panaudojant dvisių ³²P-žymėtą kDNR zondą koduojančią CNTF sričiai (600 bp). Paskui filtrai buvo perplauti, 60 valandų veikiami x-spinduliais, po to buvo fotografuotos autoradiogramos.

6.1.4. Rekombinantinio CNTF ekspresija

Ekspresijos vektorius su citomegalo-virusiniu promotoriumi (Devido Raselo dovana) buvo panaudotas subklonuoti CNTF pilno ilgio kloną abiejose orientacijose. Transfekcijai buvo naudojamos Hela ląstelės, kadangi šioms ląstelėms nebuvo rasta bazalinio ekspresijos aktyvumo, padedančio ciliarinių neuronų išgyvenimui. Kiekvieną 100 mm kultivavimo indelį transfektavo 10 µg vektoriaus DEAE-Dekstrano būdu (Spandidos D. A., Wilkie N.M., 1984, Transcription and translation. A Practical approach, 1-48). Po 48 valandų kultūroje supernatantai buvo pašalinti, ir ląstelės buvo perplautos triskart šaltu PBS ir lizuotos 5 mM fosfatiniame buferyje, turinčiame 30 mM NaCl (pH 7.0). Po lizato ultracentrifugavimo (100 000x g, 30 min.) buvo nustatytos proteino koncentracijos ir prie kultivuotų E6-ciliarinių neuronų buvo pridėta įvairios koncentracijos supernatantų. Išgyvenę neuronai buvo suskaičiuoti po 24 valandų kultūroje, kaip buvo aprašyta

anksčiau (Hughes ir kt., 1988, Nature, 335: 70-73). Kiekvienas taškas 3 brėž. rodo trijų nustatymų vidurkį; juostos yra standartinės klaidos.

6.2. Rezultatai

6.2.1. CNTF aminorūgščių sekos nustatymas

CNTF buvo išvalytas iš žiurkės sėdmeninio nervo kaip aprašyta aukščiau. Dėl aminorūgščių, bromido cianogeno (BRCN) ir triptinų fragmentų (N-galas blokuotas) kiekybiniam įvertinimui buvo būtina papildoma valymo stadija Bakerbond Gold kolonėlėje. Įvairių fragmentų aminorūgščių seka buvo nustatoma dujiniu-faziniu mikrosekvenavimu, pateikusi daugiau kaip 50% bendros sekos, tai puikiai derinasi su tuo, kas išvesta iš kDNR ir sudaro nukleotidų seką, parodytą 1 brėž. Išvalyto CNTF aminorūgščių sudėtis parodyta 1 (d) brėž.

6.2.2. CNTF kDNR klonų sudarymas ir sekos analizė

Žiurkės smegenų astroglijos ląstelių kultūros buvo naudojamos kaip RNR šaltiniai molekuliniam klonavimui; šios ląstelės jau žinomos kaip esminių CNTF kiekių gamintojai (Lillien ir kt., 1988, Neuron, 1: 485-494). Po įvairių PCR-etapų (naudojant kaip pralimerius sintetinius oligonukleotidus, gautus iš aminorūgščių duomenų, gautų kaip aprašyta 6.2.1 skyrelyje žemiau) klonų A, B ir C nukleotidų sekos nustatė trumpą netransliuotą seką iš 77 bp ir atvirą skaitymo rėmelį iš 600 bp, numatydami 200 aminorūgščių ilgio proteiną su 3' netransliuota sritimi iš 436 bp, kuri baigiasi Poli (A) gale (1 brėž.). Vienas rėmelyje esantis transliacijos iniciacijos saitas buvo lokalizuotas 78-80 nukleotidų sekos pozicijoje. Stop-kodonas, išdėstytas 5' prie šio iniciacijos saito 72-74 pozicijoje, ir C 75 ir 81 pozicijoje, tenkina patogaus transliacijos iniciacijos saito reikalavimus pagal Kozak (1989, J. Cell. Biol. 108: 229-241). Stop-kodonas 678-680 eina po sekos koduojančios peptidą CB2. Paskutinė rūgštis,

nustatyta mikrosekvenavimu, buvo homoserinas, rodantis, kad metioninas, numatytas iš nukleotidų sekos, kuris buvo po translacijos modifikuotas, sudaro C-galą.

Nors dvibazinė (Arg-Arg) seka 13 ir 14 numatytos sekos pozicijose sudaro potencialų potranslacinio suskaldymo saitą, išvalyto CNTF aminorūgščių sudėtis (1(d) brėž.) kalba prieš tokį suskaldymą: aminorūgštys fenilalaninas, argininas ir alaninas, esančios N-terminalinėje srityje, neredukuotos kitų aminorūgščių atžvilgiu, kurių šioje srityje nėra (pvz., izoleucino). Be to, numatyta molekulinė masė aminorūgščių sekai iš 200 aminorūgščių (22.8 kD) yra kaip tik tai, kas įvertinta pagal PAGE analizės rezultatus (22.5 kD) (Saadat ir kt., žiūr. aukščiau). Tuo būdu CNTF aminorūgščių seka rodo citozolinio proteino požymius, t.y. be signalinio peptido, be konsensuso sekų glikozilinimui ir tik vienas cisteino likutis 17 pozicijoje. Nustatytos CNTF sekos palyginimas su sekomis pagal kompiuterio duomenis be FIR ir EMBO nenustatė ryškaus panašumo su bet kuriuo iš žinomų baltymų. Atskiru atveju, nebuvo homologijos su nervų augimo faktoriumi (NAF), smegenų neurotropiniu faktoriumi (SNF) arba fibroblastų augimo faktoriumi (FAF) ir Purpurinu, kiekvienas iš kurių yra susijęs su išgyvenimu, su aktyvumu, panašiu CNTF (Unsicker ir kt., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 84: 5459-5463; Schubert ir kt., 1986, J. Cell. Biol. 102: 2295-2301).

6.2.3. Rekombinantinio CNTF ekspresija

Tikimybė, kad CNTF yra citoplazmatinis proteinas, buvo patvirtinta stebėjimais, kad pilno ilgio kDNR klonų ekspresija Hela ląstelėse privedė prie to, kad aktyvaus CNTF ekspresija vyko, bet jis nebuvo išlaisvintas į kultūrinę terpę (3 brėž.). Todėl manoma, kad CNTF yra molekulė, panaši į FAF ir Interleukiną-I (IL-I), kurie giliai veikia ląsteles, bet kurie yra citozoliniai proteinais. FAF nebuvo nustatytas išlaisvinimo mechanizmas (Abraham ir kt., 1986, Science 233: 545-548). Priešingai, IL-I, kaip buvo pademonstruota, išsilaisvina iš stimuliuotų makrofagų nekonvenciniu mechanizmu po

suskaldymo specifiniu fermentu (konvertaze) (Kostura ir kt., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., JAV, 86: 5227-5231). Ypatingo dėmesio vertas nesenas atradimas, kad makromolekulės gali būti įneštos (eksportuotos) iš mielių citozolio nešėjais, kurie rodo struktūrinę homologiją su vaistinio pasipriešinimo glikoproteinu žinduolių ląstelėse (McGrath ir Varshasky, 1989, Nature, 340: 400-404). Belieka dar išsiaiškinti, ar šis glikoproteinas gali veikti taip pat, kaip nešėjas žinduolių ląstelėse.

6.2.4. Northern-blot-analizė

CNTF-mRNR pasiskirstymo suaugusios žiurkės audiniuose Northern-blot-analizė (4 brėž.) surado vienintelę apie 1.2 kb dydžio juostą. Kol kas stipriausias iš surastų signalų buvo signalas sėdmeninio nervo Northern-blotuose, ir silpnas signalas dalyvavo nugaros smegenų ekstraktuose. Tačiau nustatomo signalo nerado raumenų ir odos mRNR, t.y. mažiau 2 ng CNTF-mRNR 50-tyje μ g bendros RNR. Žemi CNTF-mRNR lygiai raumenyse ir odoje rodo, kad didelis CNTF kiekis, esantis sėdmeniniame nerve, nėra CNTF, retrogradiškai transportuotas iš periferijos, kaip NAF atveju, bet yra lokaliai sintezuotas CNTF.

Be to, CNTF-mRNR ekspresijos eiga (pagal vystymosi laiką) skiriasi nuo tokios NAF ekspresijos eigos (Thoenen ir kt., 1987, Biochem. Pharmacol. 109: 145-178). CNTF-mRNR nebuvo rasta sėdmeniniame naujagimių žiurkių nerve, ir pasidarė pastebima tik 4-tą dieną (4(b) brėž.). Išplėstinė laikinė CNTF-mRNR ekspresijos eiga numato, kad CNTF neįtrauktas į neuroninio išgyvenimo reguliavimą perinataliniame laikotarpyje, kadangi raumenų reguliuojamos ląstelinės žūties laikotarpis jau baigiasi, kada prasideda CNTF sintezės padidėjimas (Oppenheim, 1986, J. Comp. Neurol., 246: 281-286; Johnson ir kt., 1980, Science, 210: 916-918).

6.3. Aptarimas

Aukščiau aprašyti CNTF išvalymo būdai pirmąkart pateikia priemones gaminti CNTF tokiais kiekiais, kurių pakanka aminorūgščių sekų nustatymui. Neatliekant paskutinės valymo stadijos kolonėle Bakerbond Gold C4 Widedore, CNTF preparate buvo keletas užterštų peptidų, kaip parodyta 2(a) brėž. Bet po išvalymo FPLC/HPLC kolonėlėje Bakerbond Gold C4 Widedore buvo identifikuota tik viena dėmė 2D gelio elektroforeze (2(b) brėž.), tuo parodydama, kad valymas faktiškai baigtas. Reikia pažymėti, kad norint išvalyti CNTF, buvo išbandyta keletas HPLC kolonelių, kol buvo rasta, jog kolonėlė Bakerbond Gold C4 Widedore yra efektyvi. Iškelta hipotezė, kad auksinio padengimo inertiskumas padeda CNTF išvalymui.

Nors CNTF-aktyvumas buvo iš pradžių apibūdintas kaip viščiuko ciliarinių neuronų išgyvenimo in vitro faktorius (Adler ir kt., 1979, Science 204: 1434-1536), neseniai buvo parodyta, kad aktyvumai, aprašyti kaip CNTF, susidarantys ir viščiuko audinyje, ir žiurkės audinyje, padeda įvairių kitų tipų neuroninių ląstelių išgyvenimui (Barbin ir kt., 1984, J. Neurochem. 43: 1468-1478 ir Manfhorpe ir kt., 1986, Brain res. 367: 282-286) ir buvo parodyta, kad žiurkės sėdmeninio nervo CNTF įtakoja viščiuko embriono simpatinių neuronų diferenciaciją, blokuodamas jų replikacijas ir indukuodamas VIP (vazointestinalinio peptido) imunoreaktyvumą ir cholin-acetiltransferazės aktyvumą (Chat) (Ernsberger ir kt., 1989, Neuron, 2: 1275-1284), o taip pat naujagimių žiurkių simpatinės grandinės ganglijų neuronuose (Saadat ir kt., 1989, J. Cell. Biol. 108: 1807-1816). Be to, išvalytas iš sėdmeninio žiurkės nervo CNTF padėjo biopotencialių O2A ląstelių-pirmtakų diferenciacijai į 2 tipo astroцитus (Hughes, 1988, Nature, 335: 70-73) in vitro. Kad būtų nustatyta, kokios CNTF funkcijos pasireiškia in vitro, būtina nustatyti jo pirminę struktūrą, ląstelinę ekspresiją, išplėstinę reguliaciją ir lokalizaciją. Išvesta iš kDNR aminorūgščių seka ir pilno ilgio kDNR klonų ekspresija rodo, kad CNTF yra citozolinis proteinas. Tas faktas kartu su regioniniu CNTF pasiskirstymu ir jo išplėstinę ekspresija

patvirtina, kad CNTF gali nebūti neurotropinio veikimo taikinio faktorius. Tokiu būdu manoma, kad CNTF rodo neurotropines ir diferencialines savybes tik po to, kai jis išsilaisvina arba pažeidžiant ląsteles, arba dėl dar nevisai aiškių mechanizmų veikimo.

Susumuojant tai, kas pasakyta, CNTF skiriasi nuo žinomų neurotropinių faktorių NAF ir BDNF konstruktyvaus išlaisvinimo mechanizmo nebuvimu, ekspresijos trukme vystymosi laikotarpiu ir regioniniu pasiskirstymu. Gali būti, kad CNTF vaidina fiziologinę vaidmenį kaip diferencialinis faktorius, ir jo neurotropinė funkcija, gal būt, pasireiškia tik patofiziologinėse būsenose labiau negu embrioninio vystymosi laiku.

7. Pavyzdys: CNTF ekspresija E.coli

7.1. Medžiagos ir būdai

7.1.1. CNTF ekspresijos vektoriaus konstravimas

Ziurkės CNTF genas (rCNTF) buvo įterptas į ekspresijos vektorių pCP93, panaudojant sintetinį oligodezoksiribonukleotidinį praimerį, komplementarų sekai, jungiančiai 5' geno galą ir antrą praimerį, komplementarų sekai, jungiančiai priešingo DNR siūlo geno 3' galą. Abu praimeriai buvo sukurti pažinimo sekos restrikcinio fermento BspMI įjungimui. Jų sekos pateiktos žemiau:

5' CAGTTACCTGCGGGGATGGCTTTCGCAGAGCAAACAC 3'

5' CAGAGGTATGAGCAGGTGGCTACATCTGCTTATCTTTGG 3'.

Šie praimeriai buvo gauti standartinėje grandininėje polimerazės reakcijoje, panaudojant pCMV-rCNTF-C-I DNK kaip matricas ir komercinį PCR rinkinį, kelis mikrogramus 637 bp fragmento, kuris buvo išvalytas elektroforeze ant 5% poliakrilamidinio gelio, po to ėjusia elektroeliucija. Eliuotas fragmentas paskui buvo virškinamas BspMI ir gautas 619 bp fragmentas buvo vėl išvalytas tuo pačiu būdu. Po bukų ir lipnių BspMI galų sukūrimo

standartinėje reakcijoje, panaudojant Klenovo polimerazę, fragmentas buvo liguojamas į vienintelį vektoriaus pCP93 restrikcinį saitą, kuris buvo padarytas bukas apdirbant S1 nukleaze standartinėje reakcijoje.

7.1.2. Bakterijos, turinčios CNTF ekspresijos vektorių, identifikavimas.

E.coli W3110i^qF kompetentinės ląstelės buvo transformuotos šia liguota DNR ir buvo atliktas atrinkimas pagal plazmidžių dydį, po to jos buvo charakterizuojamos DNR restrikcine analize ir sekvenavimu, panaudojant standartinius būdus (Panayotatos N., 1987, In Plasmids: A Practical Approach, Hardy K.G., ed. IRL Press, Oxford).

7.2. Rezultatai ir svarstymas

Buvo nustatyta, kad viena iš plazmidžių (pCP-RCNTF-C-I) neša pilną rCNTF geną, įterptą teisinga orientacija ir transliaciname skaitymo rėme prie ribosominio vektoriaus surišančio signalo. Šios plazmidės duodamų kopijų kiekis buvo triskart didesnis negu motininės plazmidės dėl 1400 bp DNR vektoriaus delecijos.

Ląstelės E.coli W3110i^qF-/rCNTF-C-I buvo auginamos skystoje kultūroje, dalyvaujant laktalai (taip, kad aktyvi transkripcija ir transliacija vyktų per rCNTF geną, ir buvo nustatyta, kad jie turi labai daug (2-5% bendro ląstelinio proteino) biologiškai aktyvaus rCNTF. Tai buvo nustatyta elektroforeze ant poliakrilamidinių gelių su 8-25% gradientu, po to apdažymu Koomasi, kaip parodyta 4 brėž. Papildomai dar buvo pagaminti proteino ekstraktai iš tų pačių ląstelių, lizuotų apdirbant lizocinu su trimis po toėjusiais užšaldymo ir atitirpdymo ciklais. Baltymas, ekstrahuotas šiuo būdu iš kelių mikrolitrų kultūros, padėjo neuritų išgyvenimui ir ataugimui iki 50% žiurkės embriono E10 ciliarinio ganglijo neuronų ir apie 30% E8 dorsalinės šaknies ganglijo neuronų po 24 ir 48 valandų in vitro. Maksimalus aktyvumas buvo stebimas mažiau

kaip 1 nanogramui rCNTF. Toks aktyvumas nebuvo rastas kontroliniuose ekstraktuose ir tose pačiose ląstelėse – šeiminiukuose, nešančiose šį plazmidinį vektorių be rDNR geno.

Žmogaus CNTF seka, pakeista genų inžinerija, prarandant intronines sekas, buvo įterpta į vektorių pCP93 ir panaudota kompetentinio *E.coli* transformavimo. Buvo nustatyta, kad transformuota bakterija, nešanti rekombinantinę žmogaus CNTF seką, išreiškė atitinkamos molekulinės masės proteiną žmogaus CNTF; o baltymų ekstraktai pasižymėjo CNTF aktyvumu eksperimentuose ant DPG.

8. Pavyzdys: žmogaus geno klonavimas

8.1. Medžiagos ir būdai

8.1.1 Plazmidiniai ir faginiai DNR vektoriai

Žmogaus genominei DNR buvo gauta iš žmogaus DNR placentos (Clontech firma). pBLUESCRIPT plazmidinis vektorius buvo gautas iš Stratagene firmos. Bakteriofaginis vektorius EMBL-3 SP6/T7 buvo gautas iš Clontech firmos.

8.1.2. Polimerazės grandinės reakcija (PCR)

PCR buvo vykdoma standartinėse sąlygose, kaip siūloma pagal Perkins- Elmer/ Cetus 40 ciklų, kiekvienam ciklui susidedant arba iš inkubacijos 1 minutę 94°C temperatūroje, 2 minutes 40°C ar 50°C temperatūroje, arba 1 minutę 50°C temperatūroje ir 2 minutes 72°C temperatūroje.

8.2. Rezultatai ir svarstymas

8.2.1. Žmogaus CNTF geno egzistavimo akivaizdumas

Southern blot hibridizacija griežtose žmogaus genominės DNR, suvirškintos EcoRI restrikcine endonukleaze, sąlygose nustatė, kad

vienintelis maždaug 10 kb DNR fragmentas parodė silpną homologiją su žiurkės CNTF zonu (6 brėž., panelis b). Norint molekuliariai klonuoti numatomą žmogaus CNTF geną, buvo stengiamasi sustiprinti tokio geno segmentus polimerazės grandinės reakcija (PCR), panaudojant oligonukleotidinių praimerių, atitinkančių tiksliai žiurkės CNTF geno sekas, poras. Kad šis būdas pavyktų, reikėtų, kad žiurkės ir žmogaus CNTF genų du trumpi segmentai būtų identiški arba beveik identiški DNR sekoje.

Buvo tiriamas penkių oligonukleotidų, kurių kiekvieno ilgis nuo 17 iki 21 bazių porų, sugebėjimas sukelti amplifikuojančią DNR segmentų sintezę PCR būdu, panaudojant bendrą genominę DNR kaip matricą. Visos penkios oligonukleotidinės poros buvo parinktos iš antro žiurkės CNTF geno ekzono. Buvo iškelta hipotezė, kad žmogaus CNTF genas turėjo turėti panašią intron-ekzoninę struktūrą kaip žiurkės genas. Tik viena praimerių, pažymėtų CNTF 10 ir CNTF 11, pora sukėlė DNR fragmento iš žmogaus genomines DNR tokio pat dydžio amplifikaciją, kokia būtų buvusi gauta iš tų pačių praimerių, naudojant žiurkės DNR-matricas (270 bp). Didelis amplifikacijos laipsnis ir mažesnis fonas buvo stebimi, kai PCR buvo atliekama kartu su DNR sinteze, atliekama aukštesnėje (griežtesnėje) temperatūroje (50°C). CNTF 10 ir CNTF 11 sekos buvo tokios:

CNTF 10 (36-mat., antiprasminio siūlo, aminorūgštims "EADGMPA"; po 2 bazes kiekvienas terminalinėms aminorūgštims; galas su daugybiniais klonuojančiais taškais)

5' -CCAAGCTTCTAGAATTCCGAGGCATCCCATCAGCCT- 3'

CNTF 11 (34-mat., prasminis, aminorūgštims EMTEAE; 2 bazės terminalui aa, baigtinis A; daugybinis klonuojantis saitas prie oligonukleotido 5' galo)

5' -GACTCGAGTCGACATCGGAGATGACTBAGGCAGA-

(Sekos, atitinkančios žiurkės CNTF, pabrauktos; papildomi nukleotidai buvo pridėti daugybinų klonavimo saitų aprūpinimui tolesnėms klonavimo stadijoms).

PCR reakcijos produktai buvo atskirti elektroforeze ant 2% agarozinio gelio (su žema lydymosi temperatūra; NuSieve). Teigiama maždaug 270 bp juosta buvo išpjauta ir reamplifikuota PSR, panaudojant tą pačią praimerį porą už 35 ciklų (30 sek. 93°C, 1 min. 50°C, 1 min. 72°C). Reamplifikuotas DNR fragmentas vėl buvo valomas elektroforeze ant 2% agarozinio gelio, ir naudojo kaip matricas DNR sekų nustatymui didezoksinukleotidų grandinės užbaigimo būdu, panaudojant komerciškai prieinamą rinkinį (rinkinys "FASTaq" iš firmos IBI). Praimeriai sekų nustatymui buvo CNTF 10 ir CNTF 11, o taip pat du vidiniai praimeriai, parinkti pradinių duomenų apie seką pagrindu, gautų terminaliniais prameriais. Pilna žmogaus amplifikuoto segmento seka parodyta 6 brėž. Ši seka apima atvirą skaitymo rėmelį polipeptido segmentui, labai panašiam į žiurkės CNTF.

8.2.2. Žmogaus CNTF geno , amplifikuoto PCR, fragmento klonavimas

Žmogaus CNTF geno amplifikuotas fragmentas buvo subklonuotas į plazmidinį vektorių pBLUESCRIPT perpjaunant jį EcoRI ir XhoI, ir liguojant prie DNR, perpjautos tais pačiais fermentais, vektoriaus. DNR buvo įvesta į kompetentines štamo XL-I-Blue (Stratagen) E.coli ląsteles, o transformantai buvo atrenkami pagal pasipriešinimą ampicilinui. Plazmidinė DNR buvo valoma standartiniais būdais, įterpti žmogaus DNR fragmentai buvo išpjauti EcoRI ir XhoI, išskirti ir pažymėti naudoti kaip hibridizacijos zondą. Žymėjimas buvo atliktas, naudojant PCR su DNR maždaug 20 ng kiekiu kaip matricą ir oligonukleotidus CNTF 10 ir CNTF 11 kaip pramerius reakcijos mišinyje, turinčiame Tag DNR polimerazę (Perkin-Elmer/Cetus), dATPP, dGTP, dTTP ir ³²P-dCTP šešius ciklus po 1 min. 94°C, 2 min. 50°C ir 3 min. 72°C. Žymėtas fragmentas buvo atskirtas nuo neinkorporuoto dCTP standartiniais chromatografiniais būdais.

Tam, kad nustatytume, ar turi DNR fragmentas, surastas žmogaus genomineje DNR žiurkės CNTF zondų, seką, kuri galėtų būti amplifikuota PCR su prameriais CNTF 10 ir CNTF 11, radioaktyviai

žymėtas žmogaus fragmentas buvo naudojamas kaip zondas Southern-blot hibridizacijoje žmogaus ir žiurkės genominese DNR, suvirškintose EcoRI (6 brėž.m panelis (a)). Zondas buvo stipriai hibridizuotas maždaug 10 kb juostoje, kuri hibridizavosi prie žiurkės CNTF zondo. Priešingai, žmogaus zondas hibridizavosi silpnai prie maždaug 4 kb juostos žiurkės genomineje DNR, neatskiriamai nuo juostos, kuri hibridizavosi stipriai su žiurkės CNTF zonu. Šie rezultatai kartu su sekvenavimo rezultatais patvirtina, kad žmogaus DNR turi žiurkės CNTF geno homologą.

8.2.3. Žmogaus CNTF geno klonavimas iš genomines bibliotekos

Radioaktyviai žymėtas žmogaus CNTF, aprašytas aukščiau, buvo panaudotas žmogaus DNR genomines bibliotekos skrinimui bakteriofago vektoriuje EMBL-3 SP6/T7. Ši biblioteka turėjo žmogaus placentarinės DNR, gautos daliniu restrikcines endonukleazės Sau3a suvirškinimu, fragmentus, įterptus į vektorių prie saito BamHI. Bakteriofagai buvo pasėti E.coli štame LE392, ir maždaug 750 000 dėmių buvo išrūšiuota hibridizacijos būdu dublikate su zonu ir naudojant sąlygas, kaip aprašyta Benton ir Davis (1977, Science, 196: 180-182) ir Mahmoadi ir Lin, 1989, Biotechniques, 1: 331-333). Buvo identifikuota tik viena teigiama dėmė, ir rekombinantinis fagas buvo išskirtas trimis vienos dėmės išskyrimo ciklais, naudojant hibridizaciją su žmogaus CNTF zonu pozityvų identifikavimui. Rekombinantinis bakteriofagas, nešantis žmogaus CNTF geną, buvo pažymėtas λhCNTF-C-I. Buvo gauti štamai tolesnei analizei išauginant skystoje kultūroje, panaudojant bakterijas LE392 kaip šeimininką.

Žmogaus CNTF sekos, buvusios λhCNTF-C-I, buvo analizuojamos toliau PSR amplifikacija ir DNR sekų nustatymu. Amplifikacija su pora praimerių, vidinių prie 270 bp žmogaus fragmentui, pirmiausiai sekvenavo (žiūr. aukščiau) ir naudojo patvirtinimui, kad teisingas fragmentas dalyvauja išvalytame fago klone. Šie oligonukleotidai buvo pažymėti CNTF 13 ir CNTF 16 (sekos pateiktos žemiau). Kaip ir buvo laukta, PCR reakcijoje, naudojant

λ hCNTF-C-I kaip matricą ir šiuos praimerius, buvo amplifikuotas apie 128 bp praimeris. PCR buvo atliekama kaip aukščiau, bet su 35 ciklais, sudarytais iš 1 min. 94°C, 2 min. 50°C temperatūroje, 2 min. 72°C temperatūroje.

CNTF 13: 5' -GCAGCGACTTGGAGAAG- 3' (antiprasminis)

CNTF 16: 5' -TACCTTCCATGTTTTGTTGG- 3' (prasminis)

(šie praimeriai taip pat turėjo 5' "uodegą", turinčią sekas daugybiniam klonavimo taškui- čia tik dalis sekos CNTF).

Tam, kad būtų nustatyta, ar klonas λ hCNTF-C-I turėjo CNTF koduojančios sekos 5' ir 3' galus, buvo atliekama PCR reakcija, panaudojant tikslią seką, t.y. nedegeneruotus praimerius, atitinkančius žiurkės sekos, koduojančios CNTF, galus. Reikia pastebėti, kad sugebėjimas amplifikuoti DNR iš žmogaus genomino klonu rodytų buvimą atitinkamos žmogaus geno srities, bet DNR nepavykusi amplifikacija galėjo įvykti arba dėl koduojančios sekos galo nuo klonu nebuvimo, arba dėl divergencijos tarp žiurkės ir žmogaus nebuvimo. Praimeriai, naudoti bandymui, ar yra galimas žmogaus CNTF-koduojančios sekos 5' galas, buvo CNTF 13 (žiūr. aukščiau) ir CNTF 14. Paskutinis oligonukleotidas turėjo 22 bazes, atitinkančias žiurkės CNTF koduojančios sekos 5' galą (prasminis siūlas) ir taip pat turėjo papildomas negiminingas sekas prie 5' galo (nenurodyta), turinčias daugybinius restrikcinių endonukleazų pažinimo taškus amplifikuotų fragmentų potencialaus klonavimo palengvinimui.

CNTF 14: 5' -ATGGCTTTCGCAGAGCAAACAC-3'.

Su nukleotidų pora CNTF 13 ir CNTF 14 buvo amplifikuotas maždaug 1.4 kb fragmentas, maždaug 1.4 kb nuo matricos λ hCNTF-C-I. Šis dydis yra lauktas, su sąlyga, kad žmogaus CNTF genas turi introną maždaug tokio pat dydžio, kaip ir tas, kuris buvo rastas žiurkės CNTF gene. Nesėkmingi buvo analogiški bandymai amplifikuoti sritį tarp žinomos vidinės žmogaus CNTF geno sekos ir koduojančios sekos 3' galu. Praimeriai buvo CNTF 16 (žiūr. aukščiau) ir CNTF 15, kuris turi žiurkės koduojančios sekos 3' galo seką (antiprasminis):

CNTF 15: 5' -CTACATCTGCTTATCTTTGG- 3'.

Sekos analizė buvo atliekama su klonuoto žmogaus CNTF geno galais, ir patvirtino panašumą su žiurkės CNTF genu, bet buvo rasti keli aminorūgščių pakeitimai koduotame proteine. DNR sekos analizės rezultatai žmogaus CNTF koduojančios sekos viduje ir palyginimas su žiurkės seka parodyti 8 brėž. Duomenys suderinami su žmogaus genu, turinčiu panašų introną toje pačioje pozicijoje, kaip ir žiurkės CNTF genas; Yra ilga aminorūgščių identiškumo, jungiančio intron-ekzoninius junginius, atkarpa (ESYVKHQGLNKH). Introno viduje žmogaus sekos žymiai skyrėsi nuo žiurkės, su ryškiu kontrastu prie esminės koduojančios srities konservacijos. Yra viena sritis, kurioje penkios ar šešios aminorūgštys skiriasi žmogaus ir žiurkės CNTF (žmogus: HVLLAR; žiurkė: QGMLTK); ir dar dvi atkarpos, kuriose skiriasi trys iš keturių aminorūgščių (žmogus: TEHS; žiurkė: AEQT, pozicijos 4-7, ir žmogus: NNKK, žiurkė: KDFQ pozicijose 196-199, 8(B) brėž.).

9. Pavyzdys: Susidarančių CNTF peptidinių fragmentų panaudojimas

9.1. Medžiagos ir būdai

9.1.1. Peptidų sintezė

Peptidai buvo sintezuojami kietafaziniu peptidiniu tipo "Applied Biosystems" sintezatoriumi, panaudojant f-moc chemiją.

9.1.2. Ląstelių kultivavimas

Viščiuko embriono ciliarinio ganglijo kultūros buvo sukurtos ir palaikomos Hughes ir kt. būdu (1988, Nature, 335: 70-73).

9.1.3. Imunizacijos procedūra

Antikūnai prieš CNTF peptidą iš 14 aminorūgščių (SALESHYGAKDDKQ) buvo gauti, imunizuojant triušius peptidais, sujungtais su KLH (chemocianinas "keyhole limpet"). Kad būtų gautas junginys cKLH, 14

aminorūgščių peptidas buvo C-gale išplėstas Cys likučiu. KLH ir peptido susiuvimas buvo pasiektas, naudojant 100-kartinį peptido perteklių ir MBS (m-maleimidobenzoil-n-hidroksisukcinimidil-eteris) kaip susiuvantį agentą.

Triušiui buvo įleista 1 mg konjugato (KLH-peptido) pilname Freido adjuvante. Po trijų savaitių triušiui buvo įleista dar 1 mg konjugato nepilname Freido konjugate ir dar po dviejų savaitių ši injekcija buvo pakartota. Dar po dviejų savaitių buvo paimtas gyvūnų kraujas ir gaminamas serumas. Buvo nustatyta, kad šis serumas imunonuosodina abu imunogenus, o taip pat išvalytą žiurkės sėdmeninio nervo CNTF.

9.2. Rezultatai ir svarstymas

9.2.1. Antikūnų, nukreiptų prieš A sintetinį peptidą, sugebėjimas neutralizuoti CNTF aktyvumą

Prisotinančius CNTF kiekius inkubavo su surištais su protein-A-sefarozės antikūnais ir iš triušio, imunizuoto sintetiniu peptidu iš 14 aminorūgščių (ISALESHYGAKDKQ), priešimuninio serumo, ir iš jo imuninio serumo. Po inkubavimo ir centrifugavimo supernatantai buvo tiriami dėl jų sugebėjimo palaikyti viščiuko embriono E8 ciliarinio ganglijo neuronų augimą. Normali reakcija į CNTF dozes matyti kontroliniuose supernatantuose. Faktiškai nebuvo rasta CNTF aktyvumo po imunonuosodinimo antikūnais prieš CNTF peptidinį fragmentą (9 brėž.).

9.2.2. Sintetinio CNTF peptidinio fragmento neurotropinis aktyvumas

Viščiuko embriono E8 ciliarinio ganglijo neuronai buvo kultivuojami 2 dienas, dalyvaujant įvairioms sintetinio peptido iš 28 aminorūgščių, gauto iš pirminės CNTF sekos, koncentracijoms, ir buvo skaičiuojamas neuronų išgyvenimas. Buvo stebima priklausomybė

nuo dozės tarp peptido koncentracijos ir neurotropinio aktyvumo (10 brėž.). Buvo naudojama seka MVLLEQKIPHEADGMPATVGDGGLFEK.

9.2.3. Antikūnų, nukreiptų prieš sintezuotą peptidą, sugebėjimas identifikuoti ląsteles, turinčias CNTF

Antikūnai, nukreipti prieš 28-aminorūgščių peptidą, buvo panaudoti imunofluorescensiniuose žiurkės sėdmeninio nervo audinio bandymuose. Triušio antikūnai, nukreipti prieš šį 28-aminorūgščių peptidą, buvo inkubuojami su fiksuotais žiurkės sėdmeninio nervo gabalėliais ir tie nervų gabalėliai paskui reagavo su rodaminu žymėtais anti-triušio IgG antikūnais. Kaip parodyta 11 brėž., buvo stebimas periaksoninis apdažymas, kartu matant, kad CNTF gal būti sintezuojamas Švano ląstelėmis. Be to, buvo vizualizuotos struktūros, esančios aksoninėje citoplazmoje (11 brėž., maža rodyklė), kurios būtų suderintos su aksonine sinteze arba CNTF transportu į aksonus. Žymėjimas galėjo būti blokuotas, pridodant CNTF peptido perteklių. (parodyta aukščiau).

10. Pavyzdys: Ciliarinis neurotropinis faktorius padeda nugaros smegenų neuronų išgyvenimui

10.1. Medžiagos ir būdai

10.1.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams naudojo žiurkės HSD (Sprague-Dawley). Nėščias žiurkes dusino anglies dvideginiu ir embrionus greitai išimdavo bei patalpindavo lediniame fiz. tirpale Pucko tolesnei dissekcijai.

10.1.2. Audinių kultivavimas

Nugaros smegenis aseptiškai pašalindavo iš 14 dienų amžiaus viščiuko embrionų. Nugaros smegenis pjovė kuadraliai galvelei, išlaisvindavo iš sensorinių ganglijų ir smegenų apvalkalo

(meningo). Nugaros smegenis paskui padalindavo į ventralinius ir dorsalinius segmentus atskiroms kultūroms. Nugaros smegenų audinį susmulkindavo į mažus gabalėlius ir mechanškai disocijuodavo sutrindami per Pastero pipetę nustatytoje terpėje, susidedančioje iš 50% bazinės terpės Eagle, BME(Zibko) ir 50% maitinančio mišinio F12 Nan (Zibko), pridedant 33 ml gliukozės, gliutamino (2 mM), NaHCO_3 (15 mM), Hepes (10 mM), insulino (25 $\mu\text{g/ml}$), transferino (100 $\mu\text{g/ml}$), putresino (60 μM), prohesterono (20 nM), Na selenito (30 nM), penicilino G (0.5 $\mu\text{g/mg}$), streptomicino (0.5 $\mu\text{g/ml}$) ir veršiuko serumo albumino (2.5 $\mu\text{g/ml}$). Susmulkinimą kartojo dukart, supernatantus surinko į bendrą indą ir filtravo per neiloninį filtrą (Nitex, Tetko) (40 μM). Ląstelių bendro kiekio išeiga buvo nustatoma hemocitometru, paskaičiuojant metu dalyvaujant mėlynajam tripanui. Disocijuotos ventralinės ląstelės paskui buvo pasėtos 0.5 mln. ląstelių 35 mm indeliui, padengtam poli-D-lizinu (10 $\mu\text{g/ml}$), tankiu. Disocijuotos neurodorsalinės ląstelės buvo pasėtos 1.5 mln. 35 mm indeliui, padengtam poli-D-lizinu (10 $\mu\text{g/ml}$), poli-L-ornitinu (10 $\mu\text{g/ml}$) ir poli-L-ornitinu su limninu (5 mg/ml), tankiu. Šių kultūrų apdirbimas buvo atliekamas juos užsėjant. Kultūros buvo laikomos 37°C 95% oro ir 5% CO_2 mišinyje, esant beveik 100% drėgnumui. Kultūrinė terpė buvo keičiama kas trečią arba ketvirtą dieną. Per savaitę šios kultūros turėjo pirmiausiai neuronus (apdažytus neurofilamentiniu monokloniniu antikūnu RT 97 (Wood ir Anderton, 1981, Biosci. Rep. I: 263-268) ir tik su keliais astrocitais, apdažytais fibriliarinio rūgštinio baltymo glijos antikūnais (Bignami ir Dahl, 1973, Brain Res. 49: 393-402), kaip buvo numatyta imunocitochemija.

10.2. Rezultatai ir svarstymas

10.2.1. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (CNTF) poveikis nugaros smegenų mediodorsaliniams (MD) neuronams

MD kultūros neišgyveno aukščiau nusakytoje terpėje pirmas 48-72 valandas. Ląstelės pradėjo sudaryti kolonijas ir galų gale

atsiskirdavo nuo substrato. Tačiau po vieno apdirbimo CNTF (20 ng rekombinantinio žiurkės CNTF 2-uose μ l E.coli- ekstrakto 1-am ml kultūros) pasėjimo metu MD neuronai parodė padidintą išgyvenimą po 48 valandų; jie buvo gerai pritvirtinti prie substrato ir leido neuritus (12 brėž.). Vargu ar skirtingumas buvo gautas dėl ląstelių prisijungimo laipsnio, kadangi ląstelės ir kontroliniuose, ir CNTF- apdirbtose kultūrose buvo gerai pritvirtintos po 3 valandų po pasėjimo. Be to, panašius rezultatus davė skirtingi naudoti substratai. Tuo būdu manoma, kad CNTF sugeba padidinti MD neuronų išgyvenimą tose kultūrose. Taip pat buvo nustatytas proteino lygis. CNTF- apdirbtos kultūros turėjo 6 kartus daugiau proteino vienam indeliui, negu neapdirbtos kontrolinės ir NAF- apdirbtos (50 ng/ml) kultūros (1 Lentelė). Kadangi šios kultūros pirmiausiai turėjo neuronus, tai proteino lygių padidėjimas taip pat rodo neuronų išgyvenimo padidėjimą.

10.2.2. CNTF poveikis nugaros smegenų ventraliniams neuronams

Nugaros smegenų ventralinio segmento kultūros, praturtintos somatiniais motoneuronais, kaip buvo tiksliai fiksuota viščiuko embriono judamųjų neuronų tyrinėjimų aprašymuose (Dohrman ir kt., 1986, Dev. Biol. 118: 204-221 ir žiūr. 18 pvz. žemiau) ir patvirtinta šiame žiurkės embriono motoneuronų tyrinėjime imunocitochemija, panaudojant CAT- antikūnus (CAT- cholin- acetil- transferazė). Nustatytoje terpėje ventraliniai neuronai išgyveno gerai, bet galiausiai žūdavo po savaitės, gal būt dėl nebuvimo faktorių, išskirtų glijos ląstelių (kadangi šiose kultūrose yra palyginus mažai glijos). Esant CNTF (2 μ l/ml), ventraliniai neuronai išgyveno daugiau kaip savaitę, nežymiai padidėjant proteino ir CAT fermento lygiams lyginant su kontroliniais pavyzdžiais (žiūr. II lentelę).

64

I lentelė

Mediodorsaliniai neuronai buvo apdirbti CNTF (2 μ l/ml) ir NAF (50 ng/ml) arba neapdirbti pasėjimo į indelius metu. 7-tą dieną kultūros buvo surenkamos, naudojant Bradford būdą (1976, Anal. Biochem. 72: 248-254)

	kontrolė	CNTF	NAF
μ g proteino/indeliui	20	120	20

II lentelė

Ventraliniai neuronai buvo apdirbti CNTF (2 μ l/ml) ir NAF (50 ng/ml) arba neapdirbti pasėjimo metu. 7-tą dieną kultūros buvo surinktos SAT fermento lygių nustatymui (Hartika ir Hefti, 1988, J. Neurosci., 8: 2967-2985) proteino matavimams.

	proteinas μ g/indeliui	CAT aktyvumas CPM/indeliui
kontrolė	33	590 $\pm$ 26.52
CNTF	45	959.5 $\pm$ 24.32
NAF	38	621.25 $\pm$ 33.59

11. Pavyzdys: Išvalytas iš žiurkės sėdmeninio nervo CNTF užkerta kelią pažeidimo sukeltai ląstelinei motoneuronų žočiai naujagimių žiurkių veido nerve (VII kaukolės nerve).

11.1. Medžiagos ir būdai

Žiurkių naujagimių veido nervai buvo išpjauti iš vienos pusės ir į pažeidimo vietas buvo įdėti gello-putų pavidalo implantantai, turintys arba 5 μ g veršiuko serumo albumino, arba 5 μ g CNTF. Pažeistų gyvūnų grupė be gello-putų pavidalo implantantų buvo naudojama kontrolei. Po vienos savaitės gyvūnai buvo pritrenkti ir jiems buvo daromos sekcijos smegenų kamieno, turinčio veido nervo

branduolį toje pačioje pusėje, kaip ir pažeidimas (ipsilateraliai pažeidimui), o taip pat veido nervo branduolį iš kitos pusės, priešingos pažeidimui (kontralateraliai). Kontralateralinis veido branduolys buvo naudojamas vidinei kontrolei. Veido branduolių sekcijos buvo nudažytos arba Nissl dažais (motoneuronų dažymui), arba antikūnais glijos ląstelių reakcijos į pažeidimą nustatymui.

11.2. Rezultatai ir svarstymas

Kaip buvo parodyta 13A ir B brėž., veido nervo pažeidimas ir BSA-turinčio gello-putų pavidalo implantanto patalpinimas sukelia motoneuronų sumažėjimą; be to, šie išlikę neuronai buvo suglaudinti ir suriesti. Tačiau pasirodė, kad veido nervo pažeidimas ir CNTF-turinčio implantanto patalpinimas buvo susijęs su iš esmės didesniu motoneuronų išgyvenimu (14A ir B brėž.); motoneuronai 14A brėžinyje daug labiau primena sveikus motoneuronus nepažeistoje pusėje (14B brėž.), negu susiraukšlėjusius degeneruotus motoneuronus 13A brėžinyje. Be to, buvo pastebėta, kad CNTF veikimas buvo labiau nukreiptas į motoneuronų išgyvenimą negu į užkirtimą kelio gliozei; palyginamas gliozės kiekis buvo stebimas faciaoliniuose branduoliuose, ipsilateraliniuose veido nervo pažeidimui BSA- apdirbtose ir CNTF- apdirbtose žiurkėse (13C ir 14C brėž.).

Buvo paskaičiuotas motoneuronų kiekis neapdirbtų, BSA- gello putomis apdirbtų ir CNTF apdirbtų žiurkių veido branduoliuose; duomenys pateikti III lentelėje.

Gyvūnuose, kurių pažeidimai buvo apdirbti gello- putomis+ BSA, buvo stebima 90% motoneuronų ipsilateraliai pažeidimui žūtis. Gyvūnuose, apdirbtuose gello-putų pavidalo implantantu, impregnuotu CNTF, motoneuronų bendras kiekis buvo 70% normos (maždaug 30% žūtis).

Pagaliau, buvo nustatyta, kad po naujagimių žiurkių veido nervo pažeidimo 90% veido nervo branduolio motoneuronų degeneravo per 1

savaite. CNTF pridėjimas į veido nervo išpjovą žymiai sumažino neuronų žūtį po nervo sekcijos, kaip parodyta 14A brėž. ir III lentelėje; buvo nustatyta, kad CNTF išgelbėjo bent 60% veido nervo neuronų, kurie normaliai būtų žuvę po aksonų perpjovimo. Tuo būdu pademonstruota, kad CNTF yra motoneuronų išgyvenimo in vivo faktorius.

III lentelė

CNTF gelbėja vėdo nervo motoneuronus nuo akotomijos sukellamos ląstelių žoties

Apdirbimas	Motoneuronų vėdo nervo branduoliuose kiekis	
	pažeistoje	nepažeistoje (kontrolinėje)
	pusėje	pusėje
1	2	3
kontrolė (be gello-putų)	685 330 (530)	2985
Gello-putos+BSA (5μg)	775 645 440 (620)	3360 3300 3150 (3271)
Gello-putos+CNTF (5 μg)	2205 3445 1270 3095 (2120)	3425 - 2990 3490 (3301)

12. Pavyzdys: Aukštas rekombinantinių žmogaus ir žiurkės E.coli ciliarinių neurotropinių faktorių ekspresijos ir išvalymo lygis.

12.1. Medžiagos ir būdai

12.1.1. Bakteriniai štamai ir plazmidės

Tolesniuose tyrinėjimuose buvo naudojamas E.coli štamai W3011olacIqF, kuris perprodukavo laktozinio operono represorių ir motininis plazmidinius vektorius pCP93, pCP110, pBIko ir pBIki

(Ranayotatos, 1988, *Gene*, 74: 357-363; Panayotos ir kt., 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 15066-15069). Vektoriai CNTF ekspresijai buvo sukonstruoti žemiau parodytu būdu, o jų atitinkamos savybės pateiktos IV lentelėje.

12.1.1.1. Žiurkės CNTF vektoriai

12.1.1.1.1. Vektorius pRP11

Iš kDNR klonu buvo gautas 622 bp DNR fragmentas, koduojantis pilną žiurkės CNTF proteiną (Stockli ir kt., *Nature*, 342: 920-923) PCR reakcija. Šio fragmento gavimui naudoti oligodezoksiribonukleotidiniai praimeriai buvo sukonstruoti 5' galo, koduojančio alaniną prie amino terminalo proteino, generavimui ir 19 bp terminacijai virš TAG terminacinio kodono prie 3' galo. Ekspresijos vektorius pCP93 buvo ištiesintas su Sall, padarytu bukiu apdirbant nukleaze SI, gaunant 3920 bp fragmentą, kuris buvo išvalytas elektroforeze ant agarozinio gelio. Tokiu būdu gautas vektorius ir PCR fragmentai buvo liguoti ir transformuoti E.coli W3011olacI^gF. Buvo atliekamas transformantų skринingas pagal dydį ir sudarytas restrikcinis žemėlapis pageidaujamai plazmidei (16 brėž.), ir teigiamas kandidatas (pRPN11) buvo patvirtintas DNR sekvenavimu laukiamo pilno ilgio geno, sujungto su transliacijos iniciacijos teisingame skaitymo rėme, pernešimui. Tačiau, kaip buvo aptarta žemiau, buvo rasta vienintelė bp mutacija CNTF gene pRPN11 pradinės žiurkės kDNR atžvilgiu, kuri sukelia asparagino inkorporaciją vietoj tirozino 193 proteininės sekos pozicijoje. Ši mutacija, kuri iškilo, tur būt, PCR amplifikacijos metu, buvo pernešta į visus kitus vektorius, nešančius žiurkės CNTF geną.

12.1.1.1.2. pRPN12

Ši plazmidė identiška plazmidei pRPN11, išskyrus vienintelę bp mutaciją kopijas kontroliuojančioje srityje (cop1), kuri padidina kopijų skaičių ląstelėse-šeimininkuose maždaug penkis kartus. Tai buvo padaryta pakeičiant DNR tarp taškų EagI ir PvuI taškais

(pagal laikrodžio rodyklę) su ta pačia seka nuo pCP110 (Panayotatos ir kt., 1989, J. Biol. Chem. 264: 15066-15069).

12.1.1.1.3. pRPN37

DNR sritis tarp dviejų AseI restrikcinių saitų, apimanti beta-laktamazinį geną pR612 (16 brėž.), buvo pakeista DNR segmentu, perduodančiu pasipriešinimą kanamicinui (kanR). Šiame vektoriuje kanR genas yra kontroliuojamas (transkripcija) jo natūralaus promotoriaus.

12.1.1.1.4. pRPN38

Ši plazmidė identiška pRPN37, išskyrus 4 bp nukreiptos mutacijos saitą, kuris minimizuoja promotoriaus kanR jėgą (Panayotatos, 1988, Gene, 74: 357-363).

12.1.1.2. Žmogaus CNTF vektoriai

12.1.1.2.1. pRPN32

Ši plazmidė-analogas pRPN11, išskyrus tai, kad ji neša žmogaus geną vietoj žiurkės. Kad vyktų žmogaus CNTF ekspresija į bakterijas, buvo būtina pašalinti introną, skiriančią proteina koduojančias sekas. Tai buvo įgyvendinta, panaudojant PCR sritis flankuojančias šį introną, amplifikacijai ir sujungimui tokiu būdu. Buvo vykdomos dvi reakcijos, kiekviena su 100 ng genominės C.1 DNR kaip matricos (17 brėž.): vienoje dalyvavo 1 μ M CNTF 23 praimeris ir 10 nM CNTF 21 praimeris, o kitoje 1 μ M CNTF 24 praimeris ir 10 nM CNTF 22 praimeris. Po 10 PCR ciklų (kiekvieną ciklą sudarė inkubacija 1 min. 94°C, 2 min. 50°C ir 2 min. 72°C temperatūroje), du vaizdai buvo sujungti ir buvo atlikti dar 25 ciklai DNR terminiuame cikleryje. Dėl to, kad vidiniai praimeriai CNTF21 ir CNTF22 yra pilnai komplementarus vienas kitam, pirmos PDR reakcijos stadijos produktai gali būti paskui renatūruoti. Be to, antroje reakcijos stadijoje dėl didesnių CNTF 23 ir CNTF 24

praimerių koncentracijų gaunami sintezės pilno ilgio pageidaujamo produkto dideli kiekiai. Vidiniai praimeriai buvo parinkti, kad būtų galima sujungti du koduojančios srities segmentus, taip gaunant introno deleciją. Galutinės PCR reakcijos produktai buvo išanalizuoti elektroforeze ant agarozinio gelio, ir buvo rasta tik viena pagrindinė juosta etid-bromidiniam apdažyme. Jos dydis – maždaug 600 bp, ir dalinė nukleotidų seka rodė, kad ši juosta yra tiksliai atkirpta žmogaus CNTF koduojanti sritis.

5' išorinis praimeris CNTF 23 (17 brėž.) buvo sukurtas buko galo, koduojančio alaniną prie proteino amino galo, generavimui. 3' išorinis praimeris CNTF 24 (17 brėž.) užtikrindavo EagI restrikcinį saitą 12 bp virš CNTF koduojančios sekos galo. Šis praimeris taip pat buvo sukurtas taip, kad pakeistų tinkamą TAG užbaigimo kodoną kodonu TAA, kuris buvo mažiau linkęs transilaciniam perskaitymui E.coli. PCR fragmentas buvo supjaustytas EagI ir gautas 612 bp fragmentas buvo valomas elektroforeze ant poliakrilamidinio gelio. Ekspresijos vektorius pCP93, kuris užtikrina ATG iniciacijos kodoną, buvo linearizuotas Sall, padarytas buko apdirbant nukleaze SI, suvirškintas EagI ir gautas 3636 bp fragmentas buvo valomas elektroforeze ant agarozinio gelio. Tokiu būdu gautas vektorius ir PCR fragmentai buvo liguoti ir transformuoti E.coli W3110lacI_gF. Transformantai, nešantys pageidaujamas molekules, buvo identifikuojami restrikcinių žemėlapių sudarymu ir buvo bandomi dėl pageidaujamo dydžio proteino buvimo ir indukavimo.

Baltymų sintezės analizė gelio elektroforeze indukuotose kultūrose E.coliW3110lacI_gF, nešančiose vieną iš plazmidžių- kandidačių (pRPN32), parodė, kad yra maždaug 27000 molekulinės masės proteininė juosta, kurios nebuvo indukuotose kontrolinėse bakterijos, nešančios plazmidinį vektorių pCP93, kultūrose. Greiti proteino ekstraktai šiose kultūrose parodė, kad yra biologiškai aktyvus CNTF.

12.1.1.2.2. pRPN33, pRNP39, pRPN40

Išskyrus žmogaus CNTF geno buvimą vietoj žiurkės, šios plazmidės yra analogiškos atitinkamai pRPN12, pRNP37 ir pRNP38, ir jos buvo sudarytos tuo pačiu būdu, panaudojant plazmidę pRPN32 kaip motininę. Sritis, kontroliuojanti kopijavimą tarp taškų EagI ir PvuI (pagal laikrodžio rodyklę) pRPN32 buvo pakeista ta pačia seka nuo pCP110 pRPN33 sukūrimui. Paskui kopijuojanti beta- laktamazę sritis tarp AseI restrikcinių saitų pRPN33 buvo pakeista mutuota kanR sritimi pBikI (Panayotos, 1988, Gene, 74: 354-363) pRPN 40 sukūrimui. Pagaliau sritis tarp restrikcinių saitų NdeI ir BgIII pRPN40 ir pBik0 (Panayotos, 1988, Gene, 74: 357-363) buvo pakeista pRPN39 sudarymui, kurioje kanR genas yra kontroliuojamas laukinio tipo promotoriumi.

12.1.2. Baltymų sintezės indukavimas

Ląstelės buvo kratomos buljone "LB" 37⁰C temperatūroje iki OD₅₉₀=1. Buvo pridėta laktozės iki 1% galutinės koncentracijos ir inkubavimas tęsėsi 16-20 valandų.

12.1.3. "Greita" baltymų ekstrakcija

Pavyzdžiai gelio elektroforezei buvo ruošiami resuspenduojant ląstelių debrį iš 0.5 ml kultūros OD₅₉₀=2, 0.16 ml lizavimo buferio (100 mM trisHCL, 10% glicerino, 4% natrio dodecilsulfato, 0.5 mg/ml mėlynojo bromfenolo (pH 6.8)) ir virinant 5 minutes.

"Selektyvi ekstrakcija ir solubilizacija"- šis būdas iš pradžių buvo aprašytas rekombinantiniam žmogaus leukocitariniam interferonui alfa-2 (Thatcher ir Panayotatos, 1986, Methods Enzymol. 119: 166-177), ir jis buvo taikomas tokiu modifikuotu būdu:

Indukuotų kultūrų ląstelės buvo resuspenduotos ir saugomos žemiau -20⁰C. Po apdirbimo lizocimu klampią suspensiją praleido per prancūzišką presą (SLM- Aminco), esant 8000 psi slėgiui,

centrifugavo su 11000 x g ir buvo apdorojamas debris (Thatcher ir Panayotatos, 1986, Methods Enzymol. 119:166-176). Po sekinančios medžiagos, soliubilizuotos 8M guanidino chloridu prieš buferį D (10 mM trisHCl, pH 8.0, 5mM EDTK, 0.1 mM ditiotreitolo), dializės ir centrifugavimo su 11000 x g, skystas supernatantas buvo aseptiškai praleistas per Millipor "Sterifil D-6V" filtrą.

12.1.4. Chromatografija

Filtratas buvo patalpintas 25 mM NaCl ir 0.5 ml/min. greičiu praleistas per DEAE kolonėlę Sephacel (Farmacija), subalansuotą buferiu E (20 mM trisHCl, pH 8.0, 0.1 mM cDTK, 0.1 mM ditiotreinolo, 25 mM NaCl). Kolonėlė buvo perplauta vienasluoksniu šio buferio tūriu ir buvo atlikta elucija trisluksniais tūriais su tiesiu gradientu 25-500 mM NaCl tame pačiame buferyje. Rekombinantinis žiurkės CNTF buvo eliuuojamas su 250-350 mM NaCl, tuo tarpu žmogaus CNTF eliuavo su 50-100 mM.

Žiurkės CNTF surinktos visos piko frakcijos buvo dializuojamos prieš buferį E, sterilizuojamos per filtrą ir buvo saugomos -70°C temperatūroje.

Žmogaus CNTF, surinktos visos piko frakcijos iš DEAE kolonėlės Sephacel buvo privestos iki 40 mM MES (Boeringer) pH 6.0, 0.1 mM EDTK, 0.1 mM ditiotreitolo (buferis G), praleistos per 0.22 m Milleks filtrą ir patalpintos į 5 x 10 cm Fast-S kolonėlę (Farmacija) su srauto greičiu 1.0 ml/val. Po perplovimo buferiu G dviejų sluoksnių tūryje, turinčiame 250 mM NaCl, buvo taikomas trisluksnis tūrio gradientas 250-1000 mM NaCl buferyje G. Piko frakcijos buvo dializuotos prieš buferį E, sterilizuotos per filtrą ir saugomos -70°C temperatūroje.

12.1.5. Peptidų analizė

12.1.5.1. Žiurkės CNTF

Rekombinantinis žiurkės CNTF (50 μ g) buvo suskaldytas BrCN, kaip aprašyta (Stockli ir kt. Nature, 342: 920-923). Gauti peptidai buvo atskirti atvirkštinės fazės HPLC, panaudojant RP C4, ir chromatografinis bandinys buvo lyginamas su chromatografiniu bandiniu BrCN- suskaldyto žiurkės sėdmeninio nervo CNTF. Buvo atlikta anksčiau identifikuoto peptido, kaip labiausiai C-terminalinio, aminorūgščių analizė. Papildomai identifikavo N-terminalinį peptidą ir taip pat atliko aminorūgščių analizę.

12.1.5.2. Žmogaus CNTF

Rekombinantinis žmogaus CNTF (400 p.) 1.5 ml 0.1% TFA/ 50% acetonitrilo buvo koncentruotas "Spid vake" iki galutinio 300 μ l tūrio. Pavyzdys buvo patalpintas minikolonėlėje (Vydac C-4, 214 TPB, 300 Å, 10 μ M) ir triskart perplautas 0.1% TFA/10% acetonitrilo ir atlikta elucija su 0.1% TFA/ 70% acetonitrilo. Eliuatas buvo koncentruojamas "Spid vake" iki maždaug 10 μ l. C-terminalinis suskaldymas buvo atliekamas su 2% Karboksipeptidaze U ir R (Boeringer ir Mannheim, sekvenuojantis laipsnis) 20 μ l bendro tūrio, esant 33°C, pH 3.79, 5.0 ir 6.12, iki kurių prieinama, pridėdant natrio citrato (galutinės koncentracijos 0.01-0.05 M). Inkubavimo intervalais nuo 10 iki 65 min. pridėdavo 3 μ l 99% skruzdžių rūgšties ir 200 pmol amino etanolio (naudojamo kaip vidinis standartas) ir pavyzdžiai buvo patalpinti į minikolonėlę kaip aprašyta aukščiau. Buvo atlikta suskaldytų aminorūgščių elucija ir kolonėlė dukart perplauta 0.1% TFA/ 10% acetonitrilu.

Aminorūgštys buvo džiovinamos ir analizuojamos po derivatizacijos su O-fluordialdehidu. Buvo atlikta CNTF elucija iš kolonėlės su 70% acetonitrilo, eluatas buvo koncentruotas iki 10 μ l ir suskaldymas buvo pakartotas.

12.1.6. Biologinis aktyvumas

Biologinis rekombinantinio CNTF aktyvumas buvo tiriamas su viščiuko embriono dorsalinės šaknies ganglijų (DPG) eksplantantais ir ciliarinio ganglijo (CG) disocijuotomis kultūromis, kaip aprašyta Lindsay ir Rohrer, 1985, Devel. Biol., 112: 30-48. Trumpai, DPG buvo išimti disekcija iš viščiuko embrionų 10-tą inkubavimo dieną (E10) ir 5-6 ganglijus eksplantavo į 1 ml kolageninio gelio matriksą 35 mm audinių kultivavimo indelius. Po gelio susidarymo, prieš įdedant žmogaus CNTF (1-20 μ l) iki galutinės nuo 100 pg iki 100 ng/ml koncentracijos, buvo pridėta 1 ml augimo terpės F14 audinių kultivavimui (Imperial Lebs, Didžioji Britanija), praturtintos 5% inaktyvuoto šiluma arklio serumo (Zibko). CG buvo išimti disekcija iš viščiuko embrionų E8 ir inkubuoti 30 minučių 0.25% tripsine (Vortington), buferiniame fiziologiniame tirpale be kalcio ir magnio fosfato. Paskui ganglijai buvo triskart perplauti terpėje F14, turinčioje 5% arklio serumo, prieš juos disocijuojant vienintelėje ląstelinėje suspensijoje sutrinant per Pastero pipetės angą. CG neuronų praturtinimas buvo pasiektas ląstelinės suspensijos pasėjimu 3.5 valandos į 60 mm indelį, ir tuo laiku neneuroninės ląstelės (fibroblastai ir Švano ląstelės) stipriai prisitvirtino prie plastiko, tuo tarpu ryškio fazės neuronai pasiliko suspensijoje. Išvalyti neuronai buvo patalpinti į poliornitinu-lamininu padengtus 35 mm indelius 8000-10000 neuronų/indeliui tankiu.

Eksplantantinėse kultūrose CNTF aktyvumas buvo nustatomas įvertinant skaidulų ataugimą apdirbtose kultūrose palyginimui su kontrole. Skaidulų ataugimas buvo skaičiuojamas pagal skalę 0...5+, palyginant kultūras su reakcijos į eksplantuotų DPG NAF fotografijomis.

Disocijuotose CG neuronų kultūrose CNTF aktyvumas buvo nustatytas, paskaičiuojant 48-tą valandą procesą išgyvenusių neuronų procentus kontroliniuose ir CNTF apdirbtose kultūrose. Visais atvejais rezultatai gauti iš trigubų kultūrų.

12.1.7. Kiti būdai.

Ekzimatinių reakcijų sąlygos, DNR elektroforezė ir kitos technologijos, naudotos šiuose tyrinėjimuose, buvo anksčiau smulkiai aprašytos (Panayotos N. 1987, K. G. Hardy (Ed.) Plasmids: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, U. K. p. 53-176). DNR sekos nustatymas buvo atliktas su rinkiniu "Sequenase Version" 2.0 (UCB korporacija), panaudojant 4 mg superspiralinės plazmidės kaip matricą.

12.2 Rezultatai ir svarstymas

Aukščiau aprašytais svetimų proteinų ekspresijos E.coli tyrinėjimais buvo identifikuoti keli parametrai, kurie gali būti susiję su aukštu ekspresijos lygiu ir gali palengvinti biologiškai aktyvaus produkto išskyrimą. Buvo naudojami ekspresijos vektoriai, kurie pasižymi keliais svarbiais požymiais, įskaitant lacUV5 promotoriaus reguliavimą laktozinio operono represoriumi; stiprų bakteriofago T7 ribosominį surišantį saitą; mutaciją replikacinės plazmidės kontrolės srityje kopijų skaičiaus padidinimui; ir mutaciją proteino pasipriešinimo antibiotikui ekspresijos apribojimui. Buvo specialiai tirtas dviejų paskutinių požymių poveikis CNTF gamybai E.coli

12.2.1. Žiurkės CNTF ekspresija

12.2.1.1. Kopijų skaičiaus poveikis

Proteino sintezės laktoze indukuotose E.coli štamo W3110lacI^{gF}-/pRPN11 kultūrose analizė gelio elektroforeze nustatė, kad yra santykinai silpna maždaug 24000 kD dydžio polipeptido ekspresija, toks dydis numatomas žiurkės CNTF, kurio nebuvo indukuotose kontrolinėse bakterijose, nešančios vektorių pCP93, kultūrose (18 brėž.). Laistelių, nešančių pRPN11, ekstraktai taip pat turėjo žymius CNTF aktyvumo kiekius.

76

Proteino lygių indukuotose šeimininkų pRPN37 ląstelėse parodė, kad žiurkės CNTF sudaro 10-20% bendro ląstelinio proteino ir kad sintetavosi tik pusė šio lygio kanR proteino. Priešingai, ląstelėse-šeimininkuose pRPN38, kurios neša mutantinį kanR promotorių, CNTF sudaro 50-70% bendro ląstelinio proteino, tuo tarpu kanR proteino nebuvo rasta (18 brėž. ir IV lentelė). Iš esmės didesnė CNTF ekspresija, kuri buvo stebima su pRPN38, manoma, vyksta betarpiškai dėl pasipriešinimo antibiotikams geno ekspresijos lygio sumažėjimo, kaip buvo pastebėta ir svarstyta dėl kitų proteinų, kurių ekspresija šiais vektoriais vyko aukštais lygiais (Panayotatos, 1988, Gene 74: 357-363), minimizuojant kanR promotoriaus pajėgumą ir sumažinant konkurenciją aiškiai apriboto pajėgumo sintezuotai ląstelei.

12.2.2. Žmogaus CNTF ekspresija

Santykiniai žmogaus CNTF, gauto keliais vektoriais, ekspresijos lygiai parodyti 18 brėž. ir pateikti IV lentelėje. Maksimalūs lygiai su kiekvienu vektoriumi buvo mažesni, negu lygiai, kurie buvo stebimi analogiškiems vektoriams, nešantiems žiurkės geną, bet bendras modelis buvo toks pat; 30-50-kartinis padidėjimas vėl buvo stebimas su didesnio kiekio kopijų (copI) plazmidėmis, ir maksimalūs lygiai vėlgi buvo gauti su didelio kopijų kiekio ir mažo pasipriešinimo kanamicinui ekspresijos genų kombinacija. Žmogaus CNTF ekspresijai redukuoto kanR (pRPN39 prieš pRPN40) poveikis buvo šiek tiek mažiau aštrus, negu poveikis žiurkės CNTF ekspresijai pRPN37 prieš pRPN38. To buvo tikėtasi, kadangi dviejų transkripcinių vienetų konkurencija tampa akivaizdi tik tada, kai ląstelės sintetavimo mechanizmai tampa apriboti, t.y. kai rekombinantinio proteino lygiai yra labai aukšti.

Žiurkės CNTF gamybos E.coli lygis šiuose tyrinėjimuose buvo nepaprastai aukštas. Tai, matyt, vyksta dėl palankaus kelių faktorių derinio, įskaitant palyginus stipraus promotoriaus, stipraus ribosominės translacinės iniciacijos signalo, vektorinės

At

plazmidės, kuri lieka stabili, esant palyginus dideliu kopijų kiekiui ir minimaliai selektyvaus pasipriešinimo antibiotikams proteino sintezei, panaudojimo. Be to, rekombinantinio proteino gamyba nusakoma paties proteino fizinėmis savybėmis ir jo stabilumu šeiminiuke. Tuo atžvilgiu žiurkės CNTF ypač tinka ekspresijai E.coli. Žmogaus CNTF ekspresija taip pat labai efektyvi, nors ir truputį mažesniais kiekiais.

12.2.3. Žiurkės ir žmogaus CNTF išvalymas

Kaip ir kiti rekombinantiniai proteinais, kurių ekspresija E.coli yra aukšto lygio, CNTF buvo daugiausiai netirpiuose dariniuose; 85-90% žiurkės ir 60-70% žmogaus proteino priešinosi ekstrakcijai neutraliu buferiu. CNTF ir kitų iš esmės hidrofobinių proteinų, uždarytų darinių kūnuose, ekstrakcija ir solubilizacija buvo pasiekta 8M guanidino chloridu. Vėlesnis lėtas guanidino pašalinimas dialize nusodino hidrofobinius šeiminiuko proteinus, ir tirpale liko daugiau 95% grynumo žiurkės CNTF ir daugiau 90% grynumo žmogaus CNTF (19 brėž.). Dėl to užteko vienintelės chromatografijos stadijos (DEAE Sephacel) rekombinantinio žiurkės CNTF išvalymui iki 99%, kaip nustatyta pagal santykinis specialiai perkrautų poliakrilamidinių gelių intensyvumus (19A brėž.) ir HPLC analize. Iš dalies dėl silpnescio žmogaus proteino afiniškumo DEAE Sephacel buvo būtina pridėti antrą chromatografijos stadiją (Fast S), kad būtų pasiektas daugiau kaip 99% grynumas (19B brėž.).

12.2.3.1. Išga

Ekspresijos lygių įvertinimo duomenys ir prielaida, kad bendras proteino turinys drėgname ląsteliniam debryje sudaro 5-15 svorio % proteino, įgalina laikyti, jog teorinis lygis yra 30-90 mg žiurkės CNTF drėgno ląstelinio debrio gramui. Faktinė išga buvo 20 mg žiurkės CNTF ir 6 mg žmogaus CNTF. Dauguma nuostolių žmogaus CNTF atveju yra dėl to, kad "tirpus" CNTF ekstrahuojamas ir pašalinamas darinių kūnų gavimo metu.

12.2.3.2. Charakterizavimas

Rekombinantinis ir žiurkės, ir žmogaus CNTF, gautas aukščiau aprašytais būdais, buvo daugiau kaip 99% grynumo. Šių proteinų pirogeniškumas buvo labai mažas (15 ng/mg proteino) pagal testą (Limulus Amebocyte Lysate (Associates of Cape Cod)). Be to, buvo nustatyta, kad šie CNTF yra biologiškai aktyvūs piromoliniame lygyje. Rekombinantiniai žiurkės ir žmogaus CNTF proteinai buvo apdoroti BrCN, ir N-terminaliniai ir C-terminaliniai peptidai buvo identifikuoti bei buvo atliekama aminorūgščių sudėties ir/arba sekos analizė. N-terminalinių peptidų analizės parodė, kad abiejuose, žiurkės ir žmogaus proteinuose N-terminalinė aminorūgštis buvo kiekybiškai išskirta kaip alaninas. tai leidžia manyti, kad iniciuojantis metioninas buvo kiekybiškai pašalintas, kaip yra bendru atveju E.coli, kada antras likutis yra nedidelė aminorūgštis alaninas. CNTF, išvalyto iš žiurkės sėdmeninio nervo, N-terminalas buvo blokuotas ir, manoma, išlaiko terminalinį metionino likutį.

Karboksilo gale žmogaus rekombinantiniam CNTF buvo gauta laukiama terminalinio BrCN peptido seka. Priešingai žiurkės CNTF C-terminalinio peptido aminorūgščių sudėties analizė parodė, kad tuo metu, kai jis turėjo laukiamą sudėtį, jame nebuvo laukiamo tirozino likučio ir buvo nelauktas asparaginas. DNR sekos analizė parodė taškinę mutaciją, tirozino pakeitimo asparaginu 193 pozicijoje pavidalo; akivaizdu, kad tai įvyko žiurkės CNTF klonuotos kDNR kopijavimo metu PCR originalaus ekspresijos vektoriaus pRPN11 sudarymui. Mes nustatėme, kad ši mutacija yra CNTF srityje, neesminėje biologiniam aktyvumui.

Žiurkės ir žmogaus CNTF turi vienodą skaičių aminorūgščių (paskaičiuotos molekulinės masės atitinkamai 22780 ir 22700 pašalinus N-terminalinį metioniną) ir skiria išplečiamas savo sekų dalis. Tačiau ir ant atstatančio, ir ant neatstatančio poliakrilamidinio SDS gelio žmogaus CNTF migruoja kiek lėčiau,

negu žiurkės CNTF (19 brėž.). Šių dviejų molekulių, panašių pagal struktūrą ir lygių pagal ilgį, skirtingas mobilumas, tur būt, atspindi kai kurias neįprastas konstruktyvias žmogaus proteino ypatybes.

12.2.4. Biologinis aktyvumas

Rekombinantinis žiurkės CNTF, išvalytas aukščiau aprašytu būdu, buvo visiškai aktyvus. 20 brėž. parodytos disociuotų, praturtintų neuronais viščiuko embriono E8 ciliarinių ganglijų kultūrų su CNTF, gautų iš žiurkės sėdmeninio nervo, ir rekombinantiniu žiurkės CNTF priklausomybės nuo CN dozių kreivės (Stockli ir kt., Nature, 342: 920-923). Proteino, išvalyto iš sėdmeninio nervo, aktyvumas buvo nustatomas, esant 5 ng/ml, o maksimalus neuronų išgyvenimas buvo matyti, esant 1-2 ng/ml ($EC_{50}=80$ ng/ml). Tame pačiame eksperimente išvalytas rekombinantinis žiurkės CNTF buvo aktyvus, esant 2 ng/ml, o prisotinimas buvo stebimas, esant 0.5-1.0 ng/ml ($EC_{50}=35$ ng/ml arba 1.5 pM). Tuo būdu, išvalytas rekombinantinis žiurkės CNTF buvo bent jau toks pat aktyvus, kaip ir natyvus proteinas, išvalytas iš sėdmeninio nervo.

Lygiagrečiuose eksperimentuose taip pat buvo tiriamas išvalyto rekombinantinio žmogaus CNTF biologinis aktyvumas. Iš pradžių naudojo viščiuko embrionų E10 eksplantantus DRG greitam ir pusiau kiekybiniam CNTF aktyvumo suradimui E.coli lizatuose. Dalyvaujant CNTF, buvo stebimas skaidulų ataugimas, tuo tarpu nesant neurotrofinio faktoriaus, buvo stebimas tik nedidelis ataugimas arba jo iš viso nebuvo iš kontrolinių ganglijų (21A, B brėž.). Maksimalus skaidulų ataugimas, esant pakankamiems CNTF tūriams, buvo apie 50-70% to, koks buvo su pakankamais NAF lygiais.

Labiau specifiniai neurotrofinio išgyvenimo matavimai buvo atliekami disocijuotose, neuronais praturtintose viščiuko embriono E8 ciliarinių ganglijų kultūrose. Po 48 valandų kontrolinėse kultūrose beveik visi neuronai degeneravo (21C brėž.), tuo tarpu mažiausiai 60-70% neuronų, pasėtų esant prisotinantiems CNTF kiekiais, išgyveno ir išleido ilgus neuritus (21 D, E brėž.). Šie

specifiniai poveikiai ciliariniams neuronams buvo stebimi su sub-nanograminiais bakterinių ląstelių lizatų kiekiais, o taip pat su išvalytu rekombinantiniu proteinu. Iš tokių eksperimentų, darytų su didėjančiais gryno baltymo kiekiais, buvo nustatyta, kad rekombinantinis žmogaus CNTF yra toks pat aktyvus, kaip ir žiurkės CNTF, viščiuko ciliarinių neuronų atžvilgiu.

Čia aprašyta CNTF ekspresija ir išvalymas gali būti lengvai numatomi farmacinei gamybai. Tai gali turėti didelę reikšmę dėl to, kad neseniai buvo pademonstruota, jog CNTF gali padėti pažeistų motoneuronų išgyvenimui eksperimentiniuose gyvūnuose (Sendtner ir kt., 1990, Nature, 345: 440-441).

IV Lentelė

plazmidė	bendri požymiai*	ypat. požymiai*	CNTF**	Amp arba kan
pRPN11	lac.rbsl. žiurkės	amp.cop+	1-2	mažiau 0.
pRPN12	tas pats	amp.cop1	30-50	1-2
pRPN37	tas pats	kan0.cop1	3-10	5-10
pRPN38	tas pats	kan1.cop1	50-70	mažiau 0.
pRPN32	lac.rbsl. žmogaus	amp.cop+	1-2	mažiau 0.
pRPN33	lac.rbsl. žmogaus	amp.cop1	10-20	1-2
pRPN39	tas pats	kan0.cop1	15-25	5-10
pRPN40	tas pats	kan1.cop1	25-35	mažiau 0.

*lac: lacUV5 promotorius; rbsl: ribosominis jungiantis taškas; žiurkės: žiurkės CNTF genas; žmogaus: žmogaus CNTF genas; amp: pasipriešinimo ampicilinui genas; kan0, kan1: laukinis arba mutantinis kanR geno tipas; cop+, cop1: plazmidė su normaliu arba dideliu kopijų kiekiu. ** procentai nuo bendro ląstelinio proteino.

13. Pavyzdys: Modifikuoto ir nupjauto ciliarinio neurotropinio faktoriaus proteino poveikis biologiniam aktyvumui

13.1. Medžiagos ir būdai

13.1.1. Motininių ekspresijos vektorių konstrukcija

Motininių ekspresijos vektorių rCNTF, pRPN11, pRPN37 ir pRPN40 sukūrimas genų inžinerijos būdais aprašytas 12.1.1.1.1, 12.1.1.1.3 ir 12.1.1.2.2.

13.1.2. Modifikuotų žmogaus ciliarinio neurotropinio faktoriaus vektorių sudarymas

Plazmidė pRPN108 buvo sukurta, pakeičiant DNR seką tarp unikalaus Aat11 ir NheI restrikcinių saitų pRPN33 fragmentu, nešančiu tą pačią seką, modifikuotą dviejose pozicijose, išdėstytose 15 bp aukščiau nuo saito NheI. Tai buvo pasiekta sintetiniu oligonukleotidiniu 3' praimeriu, kuris apėmė NheI saitą ir tris likučius, kurie pakeitė TGT cisteino kodoną gca kodonu alaninu. Šis 3' praimeris buvo naudojamas kartu su 5' praimeriu, apimančiu Aat11 saitą pageidaujamos sekos gavimui nuo pRPN33 PCR reakcija. Tuo būdu, pRPN108 identiškas pEPN33, išskyrus alanino kodoną aminorūgščiai 17 hCNTF (22 brėž.). Plazmidė pRPN109 buvo kuriama iš pRPN33 tuo pačiu būdu, kaip ir pRPN108, išskyrus tai, kad 3' praimeris, apimantis NheI saitą, apėmė du likučius, kurie transformavo TGT cisteino kodoną į ATG kodoną serinui. Tuo būdu, pRPN109 yra identiškas pRPN108, išskyrus tai, kad 17 aminorūgščiai yra serino kodonas hCNTF (22 brėž.).

Plazmidė pRPN59 buvo sukurta pašalinant DNR sekas tarp unikalių restrikcinių saitų BamHI ir NruI plazmidėje pRPN33. Plazmidėje pRPN59 hCNTF geno seka nutraukta už 185 kodono, ir tolesnė seka koduoja 10 papildomų aminorūgščių, neatitinkančių hCNTF ir transilacinio-terminacinio kodono (22 brėž.).

Plazmidė pRPN112 buvo sukurta sudarant pRPN40 iš pRPN33 (MS2), kada buvo apkeista restrikcinio fragmento, nešančio hCNTF geno dalį tarp Asel taškų, orientacija. Plazmidėje pRPN112 hCNTF genas nutrauktas iš karto po 145 kodono ir tolesnė seka įveda du kodonus; vienas aminorūgščių (lecitinui), neatitinkančiai hCNTF ir translacinio-terminacinio kodono (22 brėž.).

Plazmidė pRPN82 buvo sukurta PCR fragmento, besibaigiančio prie BstXI taškų ir koduojančio paskutines 133 hCNTF aminorūgštis, įterpimu į BstXI geno, koduojančio proteiną, nehomologinį CNTF, saitą. Plazmidėje pRPN82 gautas sintezuotas proteinas sudarytas iš 35 svetimo proteino aminorūgščių su toliau einančiais 2 glicino likučiais ir 133 hCNTF likučiais (22 brėž.).

13.1.3. Modifikuoto žiurkės ciliarinio neurotropinio faktoriaus vektorių sudarymas

Plazmidė pRPN65 buvo sudaryta įterpiant tarp unikalų restrikcinių plazmidės pRPN12 saitų Sall ir NruI PCR fragmentą, sukurta taip, kad būtų įvestas translacinis-terminacinis kodonas tuoj po rCNTF 165 kodono (22 brėž.).

Plazmidė pRPN110 buvo sukurta pakeičiant DNR sekas tarp unikalų NheI ir EagI restrikcinių saitų plazmidėje pRPN fragmentu, nešančiu tą pačią seką, modifikuotą prie vienintelio nukleotido, kuris paverčia TAT tirozino kodoną AAT kodonu asparaginui.

Tai buvo pasiekta 3' praimeriu, kuris tęsiasi nuo mutacijai skirtos pozicijos iki rCNTF geno 3' galo ir už kurioėjo EagI atpažinimo seka. Šis 3' praimeris buvo naudojamas kartu su 5' primeriu, apimančiu NheI saitą, kad būtų galima gauti pageidaujamą seką iš pRPN12 PCR reakcija. Plazmidėje pRPN110 žiurkės CNTF genas koduoja proteiną, identišką proteinui, koduojamam žiurkės DNR (22 brėž.).

13.1.4. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus biologiniai tyrimai

Biologinis aktyvumas buvo tiriamas, naudojant dorsalinės šaknies ganglijus ir /arba disociuotus ciliarinius neuronus, ir nustatomas, kaip aprašyta 12.1.6 skyrelyje. Tirpus proteinas buvo ekstrahuojamas iš indukuotų bakterijų, kiekvienos plazmidės šeimininkus "greitos" baltymų ekstrakcijos būdu, aprašytu 12.1.3 skyrelyje.

13.2. Rezultatai ir svarstymas

Biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai parodė, kad modifikuoti hCNTF proteinais, koduojami plazmidėse pRPN108 ir pRPN109, kaip ir nupjautas proteinas, koduojamas plazmidėje pRPN59, buvo tokie pat aktyvūs, kaip ir pilno ilgio proteinas, koduojamas motininėje plazmidėje pRPN33. Priešingai, nupjautas proteinas, koduotas plazmidėje pRPN112, buvo neaktyvus.

Šie rezultatai rodo, kad unikalus cestino likutis, kuris yra žmogaus, žiurkės ir triušio CNTF sekos 17 pozicijoje gali būti modifikuotas be akivaizdaus aktyvumo praradimo. Panašiai paskutinės 15 hCNTF aminorūgščių nėra būtinos aktyvumui. Priešingai, 55 paskutinių aminorūgščių pašalinimas nuo hCNTF karboksilo galo atima jo aktyvumą. Todėl kritinė sritis aktyviam hCNTF yra tarp 146 ir 186 aminorūgšties.

Rezultatai su nupjautais ir modifikuotais žiurkės CNTF proteinais suderinami ir toliau susiaurina sritį, kritinę CNTF aktyvumui. Paskutinių 35 aminorūgščių proteine, koduojančiame pRPN65, pašalinimas inaktyvavo šį proteiną, tuo tarpu tirozino pakeitimas asparagino likučiu 193 pozicijoje neturėjo įtakos aktyvumui. Šie rezultatai toliau nustato srities, kritinės CNTF aktyvumui, ribas iki sekos tarp rūgščių 166 ir 186.

14. Pavyzdys: Papildomi CNTF poveikiai nugaros smegenų ventraliniams neuronams

14.1. Medžiagos ir būdai

14.1.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Visiems eksperimentams buvo naudojamos Sprag-Dauli (HSD arba Zivic-Miler) žiurkės. Nėščios žiurkės buvo dusinamos, kaip aprašyta 10.1.1.

14.1.2. Audinių kultivavimo technologija

Nugaros smegenys buvo aseptiškai išimamos iš žiurkių embrionų, kaip aprašyta 10.1.2 skyrelyje. Išimtas audinys buvo susmulkintas į mažus gabalėlius ir inkubuojamas 0.1% tripsino (Zibko) ir 0.1% I tipo dezoksiribonukleazės (Sigma) 37°C temperatūroje 20 minučių. Tripsino tirpalas paskui buvo atskirtas, perplautas ir pakeistas terpe, kurioje yra 45% minimalios būtinos Eagle terpės (MEM), 45% maitinančio Chemo mišinio F12, 5% veršiuko vaisiaus serumo (Zibko), 5% arklio serumo (Zibko), gliutamino (2 mM), penicilino G (0.5 vien./ml) ir streptomicino (0.5 ng/ml). Kultūra paskui dukart mechaniškai buvo disocijuojama minkštu susmulkinimu per Pastero pipetę toje pačioje terpėje, visi supernatantai buvo surinkti ir nufiltruoti per neiloninį filtrą (NiteX, Tetko; 40 nm). Gautas bendras ląstelinis kiekis buvo nustatytas hemocitometru, skaičiavimo metu dalyvaujant mėlynajam tripanui. Disocijuotos ventralinės ląstelės paskui buvo užsėtos maždaug 50000 ląstelių kvadratiniam cm indelyje, padengtame poli-L-orni-L-ernitinu (10 ng/ml) ir lamininu (5 ng/ml). Apdirbimas buvo atliekamas pasėjimo dieną, išskyrus eksperimentus su uždelstu apdirbimu, kur uždelsimas buvo nuo 2 iki 6 dienų. Kultūros buvo laikomos 37°C temperatūroje 95% ore su 5% CO₂ beveik 100% santykinėje drėgmėje. Kultūrinė terpė buvo keičiama maždaug kas 3-4 dienos. Antrą dieną neneuroninių ląstelių kiekio sumažinimui buvo pridėta mitotinio inhibitoriaus sitozin-arabinozido (Aga C; 0.5 nM). 7 dieną

ląstelės buvo surinktos cholin- acetiltransferazės (CAT, Fonnum, 1975, J. Neurochem. 24: 407-409) ir proteino nustatymui (Bradford, 1976, Annal. Biochem. 72: 248-254), arba fiksuotos 4% paraformaldehide eksperimentams su neurofilamentiniu faktoriumi (NF) (Doherty ir kt., 1984, J. Neurochem. 42: 1116-1122) ir imunocitochemijos eksperimentams. Kai kurios kultūros buvo auginamos nustatytoje terpėje, turinčioje 50% F12 ir 50% MEM, gliutamino (2 mM), insulino (5 ng/ml), transferino (100 ng/ml), prohesterono (20 nM), putresino (100 nM) ir natrio selenito (30 nM) (Bottenstein ir Sato, 1979), PNAS, 76: 514-517). Šiose kultūrose serumo turinti terpė buvo pakeista nustatyta terpe pirmą dieną.

14.1.3. Eksperimentai neurofilamentinio proteino nustatymui

Po ląstelių fiksavimo 4% paraformaldehide 4°C temperatūroje dvi valandas kultūros buvo permobilizuotos (padidintas pralaidumas) ir blokuotos pagal būdus, aprašytus Doherty ir kt. (1984, J. Neurochem. 42: 1116-1122). Neurofilamentinis proteinas buvo surandamas, naudojant monokloninį antikūną RT97 (Vud ir Anderton, 1981, Biosci. Rep. 1: 263-268), naudojant 1: 1000 atskiedimą. Reakcijos produktas buvo vizualizuojamas, naudojant 0-fenilendiaminą (ORD) kaip substratą, ir buvo matuojamas optinis tankis su 490 nm.

14.1.4. Eksperimentai CAT (cholin-acetiltransferazės) nustatymui.

Kultūros buvo renkamos, lizuoiant ląsteles 20 mM tris-HCl (pH 8.6) tirpale, turinčiame 0.1% tritono X-100. Du mikrolitrai ląstelinio lizato buvo atskirta ir buvo tiriamas CAT-aktyvumas pagal mikro-Fonum būdą (Fonnum, 1975, J. Neurochem. 24: 407-409). Galutinė substrato sudėtis buvo 0.2 mM [1^{-14} C] Acetil-CoA (NEN, 54.4 mCi/mmol), 300 mM NaCl, 8 mM cholino bromido, 20 mM CDTK, ir 0.1 mM neostigmino 50-tyje mM NaH_2PO_4 buferio (pH 7.4). Tokioje fermento ir substrato koncentracijose reakcija buvo tiesinė 90-120

minučių. Indukavimo specifiškumas CAT nustatymui buvo tirtas, pridodant specifinio CAT aktyvumo inhibitoriaus N-hidroksietil-4-(1-haftilvinil)piridino (HNP) eksperimento metu (White ir Cavallito 1970, J. Neurochem. 17: 1579-1589).

14.1.5. Histocheminis apdažymas acetilcholinesterazės (AChE) nustatymui

Cholinerginės ląstelės buvo identifikuojamos histocheminiu apdažymu AChE nustatymui pagerintu Geneser-Jensen ir Blackstadt būdu (1971, Z.Zellforsch, 114: 460-481). Po kultūrų fiksavimo 4% paraformaldehyde ląstelės buvo inkubuojamos 5-6 dienas 4^oC temperatūroje, dalyvaujant AChE- substrato tirpalui, susidedančiam iš: 4 mM acetiltiocholin-jodo, 2 mM vario sulfato, 10 mM glicino ir 10 ng/ml želatino 50 mM acetatinio buferio (pH 5.0). Reakcinio produkto vizualizacija buvo atliekama, kaip buvo aprašyta anksčiau (Chatric ir Chefti, 1988, J. Neurosci. 8, 2967-2985).

14.1.6. Ventralinio rago ląstelių frakcionavimas metrizamido tankio gradientu

Frakcionavimo procedūra (Dohrman ir kt., 1986, Dev. Biol. 118: 209-221) buvo modifikuota iš būdo, aprašyto Schnaar ir Schaffner, (1981, J. Neurosci 1: 204-207). Metrizamidas buvo ištirpintas terpėje F12:MEM (1:1) ir buvo paruoštas laipninis gradientas, susidedantis iš 3 ml 17% metrizamido, 3 ml 12% metrizamido ir 3 ml 8% metrizamido. Visos kitos stadijos buvo atliekamos 4^oC temperatūroje. Ventralinio rago ląstelių suspensija (2.5 ml), gauta kaip aprašyta anksčiau, buvo uždėta ant laipsninio gradiento, vamzdelį (mėgintuvėlį) centrifugavo su 2500xg 20 minučių, naudodami besisupantį rotorį. Centrifuguojant buvo gauti trys ląstelių sluoksniai su padalinimo paviršiais 0-8% (I frakcija), 8-12% (II frakcija) ir 12-17% (III frakcija). Šios ląstelės nuo kiekvienos frakcijos buvo surinktos mažame tūryje (apie 1 ml), pasėtos, apdirbtos ir tiriamos, kaip aprašyta.

Neuronai iš I frakcijos buvo laikomi kondicionuotoje terpėje, išskirtoje iš kultivuotų nugaros smegenų ląstelių.

14.2. Rezultatai ir svarstymas

14.2.1. Bendra kultūrų morfologija

Ventralinio rago ląstelės, auginamos turinčioje serumo terpėje, buvo privestos prie mišrių neuronų-glijos kultūrų. Po 24 valandų glija sutirštėjo ir prasidėjo proliferacija, tuo tarpu keletas neuronų pradėjo leisti neuritus. Tačiau po 48 valandų dauguma neuronų išleido neuritus ir parodė būdingą ryškios fazės somą (23 brėž.). 2-3 dieną pridėjus AraC, neneuroninės ląstelės pradėjo žoti ir atsiskirti, palikdamos neuronais praturtintą kultūrą, turinčią apie 5% glijos. Nustatytoje terpėje kultūros taip pat turėjo apie 5% glijos, kuri toliau galėjo būti dar sumažinta apdirbant su Ara C. Rago motoneuronų metrizamido gradientu išvalytose kultūrose (I frakcija) galiausiai nebuvo glijos, ir daugiau kaip 90% neuronų buvo cholinerginiai neuronai.

14.2.2. CNTF poveikis neurofilamentinio proteino lygiams

Norint įvertinti CNTF poveikį neuronams, buvo matuojami neurofilamentinio proteino (NF) lygiai. NF kiekio padidėjimas du kartus buvo rastas CNTF apdirbtose (10 ng/ml) ventralinio rago kultūrose, lyginant su neapdirbtomis kultūromis (kontrolė). NGE poveikio nebuvo matyti (24 brėž.). Tai leidžia manyti, kad CNTF padeda ventralinių neuronų išgyvenimui ir/arba neuritiniam ataugimui kultūrose.

14.2.3. CNTF poveikis AchE-turinčių neuronų išgyvenimui

Norint išsiaiškinti, ar NF lygių padidėjimas turi įtakos neuronų išgyvenimo padidėjimui ar neuritų ataugimui, buvo atliekamas histocheminis apdažymas AchE, kadangi dauguma ventralinio rago kultūrose yra cholinerginiai motoneuronai. Buvo nustatytas 2.5

kartų $AchE_+$ neuronų padidėjimas CNTF apdirbtose kultūrose (10 ng/ml), lyginant su neapdirbtomis kultūromis. NAF poveikis buvo nedidelis. Šie rezultatai leidžia manyti, kad CNTF padidina neuronų išgyvenimą, kas gali būti susiję su NF lygių padidėjimu.

14.2.4. CNTF poveikis CAT aktyvumui

Norint įvertinti CNTF įtaką transiterinei fenotipinei ekspresijai, buvo nustatomi CAT aktyvumo lygiai. CAT yra $AchE$ sintezės apribojantis fermentas. Kaip parodyta 26 brėž., CNTF pridėjimas (10 ng/ml) 4 kartus padidino CAT aktyvumą po 7 dienų kultūroje, tuo tarpu kitų augimo faktorių, tokių kaip NAF (50 ng/ml) ir FAF (50 ng/ml) pridėjimas jokio poveikio nepadarė. Šis cholinerginio aktyvumo padidėjimas priklauso nuo dozės, ir maksimali reakcija buvo pasiekta, esant 1 ng/ml CNTF koncentracijoms (26B brėž.). Šis padidėjimas pasireiškė po trijų dienų po apdirbimo ir, matyt, nepriklausė nuo kultūrų tankio. Šie rezultatai leidžia manyti, kad CNTF taip pat stimuliuoja cholinerginę transiterinę ekspresiją, kadangi CAT aktyvumo padidėjimas yra 1.6 kartus didesnis negu cholinerginių neuronų kiekio padidėjimas; t.y. išgyvenusių cholinerginių neuronų $AchE$ ekspresija vienam neuronui yra didesnė.

14.2.5. Eksperimentas su uždelstu apdirbimu

Ventralinio rago ląstelės buvo padalintos į tris grupes, kaip parodyta 27 brėž. 27A brėž. CNTF (10 ng/ml) buvo pridėta prie ląstelių pasėjimo metu, ir ląstelės buvo laikomos su CNTF 7 dienas. 27B ir C brėž. pailiustruotame eksperimente kultūros buvo laikomos be CNTF arba 2, arba 6 dienas, ir paskui apdirbtos CNTF (10 ng/ml) dar 7 dienas. Atidėtas CNTF pridėjimas 2-ą dieną sumažino CAT aktyvumo padidėjimą 1.2 karto. Tačiau uždelsus 4 dienas, CNTF daugiau nebegalėjo turėti įtakos CAT aktyvumui (27 brėž.). Tai leidžia manyti, kad yra CNTF jautrių neuronų, kurie nesant CNTF normaliai žūva praėjus kelioms dienoms po pasėjimo, populiacija. Esant CNTF šios ląstelės išgyvena ir $AchE$

88

ekspresija yra padidinta.

14.2.6. CNTF poveikis ventralinio rago kultūroms nesant glijos

Glijos ląstelių kiekis kultūrose buvo sumažintas dviem būdais: a) apdirbant antimitotiniu agentu (Ara C, 0.5 nM) ir b) naudojant augimo terpę be serumo. Kiekvienu atveju glijos populiacijos buvo sumažintos iki maždaug 5% bendro ląstelių kiekio, bet CNTF poveikis CAT aktyvumui liko nepakitęs (28 brėž.). Šie rezultatai rodo, kad CNTF poveikis CAT aktyvumui vargu ar perduodamas per gliją, bet yra tiesioginė neuronų reakcija.

14.2.7. CNTF poveikis išvalytiems metrizamidiniu gradientu motoneuronams

Ventralinio rago kultūros buvo praturtintos cholinerginiais neuronais. Kad kultūros būtų homogeniškos, motoneuronai dar buvo valomi iš ventralinių nugaros smegenų pagal tankio gradientą. Metrizamidinio gradiento stadija leidžia išgyvendinti motoneuronų selekciją, paremtą jų labiau plaukiančiais (lengvais) tankiais. Gautose kultūrose buvo daugiau kaip 80% motoneuronų, kaip buvo parodyta anksčiau Šnaaro ir Šafnerio (1981, J. Neurosci. 1: 204-207). Išvalytose motoneuronų kultūrose (10 ng/ml) CNTF stimulavo 10-kartinį CAT aktyvumo padidėjimą, palyginus su neapdirbtomis kultūromis (29 brėž.). Metrizamidinis gradientas įgalino atskirti didelius motoneuronus nuo galimo užteršiančio mažų cholinerginių priešganglinių simpatinių neuronų pulo. Rezultatai liudija, kad CNTF padeda išgyvenimui ir stimuluoja cholinerginę ekspresiją motoneuronuose.

15. Pavyzdys: Ciliarinio neurotropinio faktoriaus poveikis Amono rago kultūroms

15.1. Medžiagos ir būdai

15.1.1. Amono rago ląstelių kultūros

Amono ragai buvo išimti disekcija iš žiurkės embrionų E18-19 ir surinkti terpėje F10. Audiniai buvo susmulkinti, dukart perplauti terpe F10 (Zibko) ir tripsininti 0.25% tripsino (Zibko) 20 minučių 37°C temperatūroje. Tripsinas buvo inaktyvuotas pridedant serumo turinčios terpės, sudarytos iš minimalios būtinos terpės (MEM), pridedant veršiuko vaisiaus serumo (FCS, 10%), glutamino (2 mM), penicilino (25 vien./ml) ir streptomicino (25 ng/ml). Disocijuotos ląstelės, gautos minkštu sutrynimu, buvo surinktos ir centrifuguotos mažame greityje (600 aps./min.) 30 sekundžių. Centrifugavimas buvo pakartotas dukart, ir ląstelių debris paskui buvo resuspenduotas serumo turinčioje terpėje. Ląstelės paskui buvo pasėtos 6 mm duobelėse arba 35 mm indeliuose, padengtuose poliornitinu (10 ng/ml) ir lamininu (10 ng/ml). Daugelyje eksperimentų ląstelės buvo užsėtos mažu maždaug 71000 ląstelių/kv.cm tankiu. Po 5-6 valandų po pasėjimo terpė buvo pakeista terpe be serumo, tuo metu turinčia 1% N3 ir penicilino-streptomicino (atitinkamai 25 vien./ml ir 25 ng/ml), ir buvo pridėta CNTF. Terpę keitė kas tris arba keturias dienas, naujai pridedant faktorius.

Kad būtų gautos neuronais praturtintos kultūros, 24-ioms valandoms buvo pridėta citozino- arabinozido (Ara C, 0.3 nM). Tokiose sąlygose Amono rago kultūros turėjo maždaug 5-10% glijos ląstelių, kaip įvertinta GFAP imunochemija.

15.1.2. Eksperimentas GAD fermentinio aktyvumo nustatymui

GAD fermentinis aktyvumas buvo nustatomas Kimuros ir Kirijamos būdu (1975, Jap. Farm. 25: 189-195) išlaisvinimo $^{14}\text{CO}_2$ iš L-[1- ^{14}C] gliutamo rūgšties matavimais. Ląstelės 35 mm indeliuose buvo lizuojamos 30 ml tirpalo, turinčio 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.2) ir 0.25% Tritono X-100, sugramdytos ir surinktos. Buvo

tiriamas penkių mikrolitrų ląstelių lizato GAD fermentinis aktyvumas. Tipiškame bandyme reakcijos mišinyje buvo 0.57 mM L-[1-¹⁴C] gliutamo rūgšties (NEN, NEC-715, 52.6 mCi), molis gliutamo rūgšties (3 mM), piridoksal-fosfato (0.2 mM) ir AET (1 mM) buferyje KH_2PO_4 (50 mM, pH 7.2). Šiose reakcijos sąlygose fermentinė reakcija pasirodė tiesinė iki 2.5 valandos. Inkubavimas buvo atliekamas 2 valandas 37°C temperatūroje, ir reakcija buvo užbaigta įleidus 25 ml 8M H_2SO_4 į reakcijos mišinį. Inkubavimas po to buvo tęsiamas dar 60 minučių. Išlaisvintas ¹⁴CO₂ buvo gaudomas pagrindiniame Hyamine tirpale ir skaičiuojamas.

15.1.3. Neurofilamentinio proteino matavimas

NF proteinas buvo skaičiuojamas Doherty ir kt. būdu (1984, J. Neurochem. 42: 1115-1122), kaip aprašyta 14.1.3 skyriuje.

15.1.4. Aukšto afiniškumo GABA įsisavinimo matavimas

Aukšto afiniškumo GABA įsisavinimas buvo matuojamas naudojant pagerintą Tomozavos ir Apello būdą (1986, Brain Res. 399: 111-124). Ląstelės buvo perplautos specialiu buferiu, turinčiu 140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 6 mg/ml gliukozės, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.1% BSA. Po perplovimo ląstelės buvo inkubuojamos šiame specialiame buferyje 5 minutes 37°C temperatūroje. Paskui buvo pridėta ³H-GABA (NEN, NET-19IX, III.4 CiX mol) iki galutinės 12 nM koncentracijos, ir inkubavimas buvo atliekamas 37°C temperatūroje 10 minučių. Vėliau ląstelės buvo laikomos ant ledo ir triskart perplautos nurodytu buferiu. Ląstelės buvo inkubuojamos su 0.14 M NaOH 2 valandas kambario temperatūroje, ir buvo skaičiuojamas ³H-GABA ekstrakte. Buvo nustatyta, kad įsisavinimas ³H-GABA vyko tiesiškai bent jau iki 30 minučių. Įsisavinimas GABA neneuroninėse ląstelėse buvo inhibuotas pridėjus 2 mM B-alanino, tuo tarpu specifinis neuronams įsisavinimas buvo patikrintas nipekotino rūgšties inhibavimu su 1 mM.

15.1.5. Imunocistocheminis apdažymas GAD ir GABA tyrimams

Ląstelės buvo fiksuotos 4% paraformaldehidu 30 minučių kambario temperatūroje ir perplautos PBS. GAD apdažymui ląstelės buvo daromos pralaidžios perplovimais iš eilės 50%, 70% ir 50% etanolu. Šios kultūros buvo blokuotos perplovimu iš eilės PBS, turinčiu 5% normalaus triušio serumo 1 valandą, ir inkubuojamos avies antikūnu prieš GAD 1440 esant atskiedimui 1:6000 iki ryto 4°C temperatūroje. Po trijų perplovimų PBS ląstelės buvo inkubuojamos biotiniruotu triušio antikūnu prieš avį esant bent 1:400 atskiedimui 90 minučių kambario temperatūroje. GABA apdažymui ląstelės buvo permobilizuotos Tritonu X-100 (0.25%) Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3) ir blokuotos 10% normalaus ožio serumo 90 minučių prieš inkubavimą triušio anti-GABA antikūnu (1: 5000) iki ryto 4°C temperatūroje. Po trijų perplovimų PBS ląstelės paskui buvo inkubuotos biotiniruotu ožio anti-triušio antikūnu esant bent 1:200 atskiedimui 90 minučių kambario temperatūroje. GAD- ir GABA-imunoreaktyvios ląstelės buvo vizualizuotos, panaudojant rinkinį "Vectastasin ABC" (Vector Labs).

15.1.6. Imunohistocheminis apdažymas tyrimams su neuronams specifine enolaze (NSE)

Po fiksavimo 4% paraformaldehidu ląstelės buvo blokuojamos 10% normaliu ožio serumu PBS, turinčiu 0.1% Tritono X-100. Ląstelės paskui buvo inkubuotos su pradiniu antikūnu (triušio anti-NSE, 1:5000) iki ryto 4°C temperatūroje. Ląstelės paskui buvo inkubuojamos su antriniu antikūnu (ožio, anti-triušio, 1:200) bent 90 minučių kambario temperatūroje. NSE- imunoteigiamos ląstelės buvo vizualizuojamos, naudojant rinkinį "Vectastasin ABC" (Vector Labs).

15.1.7. Histocheminis apdažymas tyrimams su kalbindinu

Ląstelės buvo dukart perplautos PSB ir fiksuotos 4% paraformaldehidu 30 minučių kambario temperatūroje. Po perplovimo 1% normaliu arklio serumu (NHS) ir blokavimo 5% NHS PBS 1 valandą

kambario temperatūroje ląstelės buvo inkubuojamos pelės anti-antikalbino antikūnu (atskiedimas 1:1000) 1% NHS iki ryto 4°C temperatūroje. Paskui ląstelės buvo perplautos triskart su 1% NHS ir inkubuojamos su antriniu antikūnu (arklio, anti-pelės, atskiedimas 1:400) 90 minučių kambario temperatūroje. Imunoreaktyvios kalbindinui ląstelės buvo vizualizuotos, naudojant "Vektastasin ABC" (Vector Labs).

15.1.8. Histocheminis apdažymas tyrimams su acetilcholinesteraze

Histocheminis apdažymas acetilcholintransferazės tyrimams buvo atliekamas pagal Genezerio-Jenseno ir Blekštado būdus (1971, Z.Zellforsch 114: 460-481). Ląstelės triskart buvo perplautos PSB ir fiksuotos 4% paraformaldehidu kambario temperatūroje 30 minučių. Fiksuotos ląstelės paskui buvo inkubuojamos reakcijos mišinyje, turinčiame 50 mM acetano buferio (pH 5.0), 4 mM acetiltiocholn-jodo, 2 mM vario sulfato, 10 mM glicino ir 10 ng/ml želatino). Nespecifinės cholinesterazės buvo inhibuotos įjungiant 0.2 mM etopropazino į terpę inkubavimui. Cholinesterazinio apdažymo specifiškumas buvo patikrintas pridendant neostigmino (5 nM). 7 dienų inkubavimo pabaigoje želatinas buvo ištirpintas trumpa inkubacija 37°C temperatūroje. Ląstelės buvo perplautos vandeniu, 1 minutę apdirbtos 1.25% Na₂S ir vėl perplautos vandeniu. Paskui jos buvo apdirbtos 1 minutę su 1% AgNO₃, perplautos vandeniu ir PSB.

15.1.9. Ciliarinis neurotropinis faktorius

CNTF, naudotas visuose tyrinėjimuose, buvo rekombinantinis žiurkės CNTF, gautas ekspresija ir išvalytas kaip aprašyta 12 pavyzdyje aukščiau.

15.2. Rezultatai

Kada Amono ragai buvo imami iš embrionų E18 ir patalpinami kultūroje, didžioji neuroninės populiacijos dalis buvo sudaryta iš postmimotinių piramidinių neuronų. Po 5-6 dienų po pasėjimo neuronai jau leido neuritus, ir buvo paliudytas tarplastelinis kontaktas po 1 dienos kultūroje. Buvo aiškiai matyti ryškios fazės ląstelės su ilgomis ataugomis.

Amono rago neuronai buvo kultivuojami mažu tankiu (maždaug 71 tūkst. ląstelių kv. cm), dalyvaujant arba nedalyvaujant CNTF įvairiais laiko tarpais. Po ilgo Amono rago kultūrų apdirbimo CNTF (10 ng/ml) padidėjo ląstelių sugebėjimas įsisavinti ³H-GABA (30 brėž.). Laikinas CNTF sukulto specifinio neuronų įsisavinimo GABA padidėjimo pakitimas buvo lėtas, kaip parodyta 30A brėž. CNTF apdirbimas produkavo nedidelį GABA įsisavinimo padidėjimą 6 dieną kultūroje, ir maksimalus, pvz., padidėjimas 4 kartus palyginus su neapdirbtais kontroliniais pavyzdžiais buvo stebimas po 8 dienų po CNTF pridėjimo. Ilgesnis iki 11 dienų laikotarpis kultūroje nesukėlė didelio pagerėjimo. Tolesniam CNTF poveikio Amono rago neuronams kultūroje įvertinimui kiekybiškai buvo nustatomas neurofilamentinis proteinas, panaudojant antikūnus prieš neurofilamentinį proteiną (RT 97), paskui ELISA. Buvo nustatyta, kad neurofilamentas tik truputį padidėjo 6 dieną kultūroje ir buvo maksimaliai padidėjęs 8 dieną (30B brėž.). Panašus ir įsisavinimo GABA, ir NF proteino vystymasis laike buvo stebimas su 1 ng/ml CNTF.

CNTF poveikis priklauso nuo dozės, kaip parodyta 31 brėž. Specifinis GABA įsisavinimas neuronais buvo padidintas 0.01 ng/ml, ir buvo maksimaliai padidintas maždaug 3 kartus ląstelėse, apdirbtose 0.1 ng/ml CNTF po 8 dienų (31A brėž.). Didesnės iki 50 ng/ml koncentracijos nesukėlė didesnio GABA įsisavinimo padidėjimo. Panašiai neurofilamentinis proteinas CNTF apdorotose kultūrose buvo taip pat padidintas nuo dozių priklausančiu būdu, pasiekiant plato su 0.1 ng/ml CNTF (31B brėž.). Didesnės iki 50 ng/ml CNTF koncentracijos nepadidino neurofilamentinio proteino kiekio dar labiau. Kaip papildomas kelias CNTF poveikio

GABAerginiams neuronams kultūroje buvo matuojamas GAD fermentinis aktyvumas kultūrose inkubuotose su CNTF 8 dienas. Buvo nustatyta, kad CNTF sukėlė GAD aktyvumo padidėjimą Amono rago neuronams nuo dozių priklausančiu būdu (31C brėž.). Taip gauta priklausomybės nuo dozės kreivės forma buvo panaši į kreivę, gautą iki įsisavinimo GABA ir neurofilamentinio proteino. Maksimalus 3.8 kartų GAD aktyvumo padidėjimas buvo stebimas su 0.1 ng/ml CNTF. Tam, kad ištirtų, ar yra CNTF poveikis GAD aktyvumui dėl aktyvumo indukavimo šiame fermente arba dėl išgyvenamojo poveikio GABAerginiams neuronams, buvo nustatytas GAD imunoreaktyvių neuronų ląstelėse, augintose su arba be CNTF, kiekis. Su 10 ng/ml koncentracija CNTF padidino NSE ir GAD teigiamų neuronų kiekį atitinkamai 2.2 ir 2.3 kartus (32A brėž.). Imunohistocheminis apdažymas naudojant antikūną prieš GABA parodė tokius pačius rezultatus (33A brėž.). Kalbindinas buvo lokalizuotas Amono rago neuronų subpopuliacijose, įskaitant dantytą vingį, CA1 piramidinius neuronus ir kai kuriuos interneuronus (Balmbridž ir Miler, 1982, Brain Res. 245: 223-229). Amono rago kultūrų apdirbimas CNTF (10 ng/ml) su nedideliu tankiu sukėlė kalbindino-teigiamų ląstelių padidėjimą tris kartus (32B brėž.). Po 8 dienų kultūroje acetilcholinesterazės-teigiamų ląstelių kiekis taip pat buvo padidintas maždaug 17 kartų CNTF apdirbtose kultūrose palyginus su kontroliniais pavyzdžiais (33B brėž.). Norint pateikti daugiau įrodymų tam, kad CNTF veikia kaip išgyvenimo faktorius GABA erginių neuronų kultūroje išgelbėjimui labiau negu GABA erginio fenotipinio požymio induktorius, atliko papildomus eksperimentus. CNTF buvo pridėta įvairiais momentais po pasėjimo ir nustatinėjo GABA įsisavinimą arba neurofilamentinio proteino lygius 8 dieną kultūroje. Kaip parodyta 34A brėž., kada CNTF pridėjimas buvo sulaukytas vieną dieną, CNTF indukuotas GABA įsisavinimo padidėjimas, tirtas po 7 dienų, sumažėjo. Kada CNTF buvo pridėta trečią dieną po pasėjimo, CNTF daugiau nepadidino GABA įsisavinimo. CNTF indukuotas neurofilamentinio proteino padidėjimas buvo panašiai sumažintas, kai CNTF pridėjimas buvo uždelstas tris dienas (35A brėž.). Kad būtų pašalinta tikimybė, jog šis pastebėjimas buvo nepakankamos faktoriaus ekspozicijos

96

rezultatas, atliko tokį bandymą.

CNTF buvo pridėta prie ląstelių trečią dieną kultūroje, ir ląstelės buvo apdirbtos faktoriumi 8 dienas prieš GABA įsisavinimo ir neurofilamentinio proteino matavimą. Tokiose sąlygose CNTF negalėjo sukelti GABA įsisavinimo padidėjimo, ir neurofilamentinio proteino poveikis neurofilamentiniam priteinui buvo žymiai mažesnis (34B, 35B brėž.).

Buvo parodyta, kad astrocitali yra turtingas kelių neurotropinių faktorių, įskaitant NAF, šaltinis. Kad būtų ištirta, ar CNTF veikia per tokių faktorių išlaisvinimą iš glijos ląstelių labiau negu tiesiogiai į neuronus, buvo tiriamas CNTF indukuotas GABA įsisavinimo padidėjimas neuronais praturtintose kultūrose. Kaip parodyta 36 brėž., Aga C apdirbtose kultūrose CNTF padidino GABA įsisavinimą 2.4 kartus, lyginant su neapdirbtais kontroliniais pavyzdžiais. GABA įsisavinimo stimuliacija buvo panaši į reakciją neuronų-glijos mišrioje kultūroje (-AgaC) arba neuronais praturtintose kultūrose (+AgaC). Be to, reakcijos priklausomybės nuo CNTF dozės AgaC apdirbtose kultūrose kreivė buvo truputį pastumta į kairę, taip kad CNTF koncentracija, reikalinga maksimaliai reakcijai, buvo mažesnė (0.03 ng/ml), lyginant su 0.1 ng/ml.

CNTF poveikis GABA erginiams neuronams priklausė nuo tankio, kuriuo buvo apsėtos ląstelės. Esant mažam 71000 ląstelių/kv. cm pasėjimo tankiui, CNTF (10 ng/ml) padidino GABA įsisavinimą 2.6 kartus (37A brėž.). Esant didesniai 143000 ląstelių/kv. cm pasėjimo tankiui, CNTF nesugebėjo žymiai padidinti GABA įsisavinimą prisotinančiomis koncentracijomis (10 ng/ml). CNTF poveikis neurofilamentinio proteino išlaikymo lygiui buvo panašiai priklausomas nuo ląstelinio tankio (37B brėž.). Tai gali būti dėl padidėjusio neurotropinių faktorių lygio didelio tankio kultūrose. Amono rago neuronai kultūroje, kaip buvo parodyta anksčiau, yra jautrūs gliutamatiniam neurotoksiškumui (Mattson M.P. ir kt., 1988, J. Neurosci. 8: 2087-2100). Mes įvertinome

97

neurotoksinius gliutamato 10-1000 nM koncentracijų poveikius kalorimetriniu MTT bandymu, kaip parodyta 38 brėž. Esant 1 mM koncentracijai, gliutamas sumažino ląstelių išgyvenimą iki maždaug 10%. Esant CNTF (10 ng/ml), ląstelių išgyvenimas po gliutamato poveikio buvo padidintas.

15.3. Svarstymas

Buvo parodyta, kad CNTF padidina kelių skirtingų neuronų populiacijų išgyvenimą kultūroje. Be to, buvo parodytas į CNTF panašus aktyvumas, sukellantis 2 tipo astrocitų diferenciaciją iš glijos ląstelių- pirmtakų kultūroje (Chju ir kt., 1988, Nature 335: 70-73, Liljen ir kt., 1988, Neuron 1: 485-494). Mes paliudijome naują CNTF poveikį centrinėje nervų sistemoje, t.y. tai, kad CNTF palaiko neuronų, išskirtų iš E18 Amono rago, išgyvenimą in vitro. Amono rago neuronų apdirbimas CNTF padidina GABA išsivavinimą ir kartu padidina GAD fermentinį aktyvumą. Neurofilamentinio proteino lygiai Amono rago kultūrose analogiškai didėjo dalyvaujant CNTF. Reakcijos į dozę tyrimai rodo koreliaciją tarp šių skirtingų markerių ir maksimalų CNTF poveikį, pasiektą su 0.1 ng/ml CNTF. Didesnės CNTF koncentracijos didelės įtakos neturėjo.

CNTF poveikį galima paaiškinti selektyvia GABA erginių selektyvių markerių indukcija. Tačiau uždelsto CNTF pridėjimo rezultatai kalba daugiausiai apie CNTF išgyvenimo poveikį. Nustatyta, kad kai pridėjimas buvo uždelstas 3 dienas, jis daugiau nerodė savo poveikio GABA erginėms ląstelėms. Nors neurofilamentinis proteinas vis dar buvo žymiai padidintas, poveikis buvo žymiai silpnesnis, negu tas, kuris buvo stebimas pridedant CNTF pasėjimo dieną.

Priklausantys nuo tankio CNTF veiksmai rodo, kad esant didesniam tankiui, ląstelėms išgyvenimui, atrodo, nereikia CNTF. Tai gali būti dėl lokalinio endogeninių neurotropinių faktorių arba astrocitų išlaisvinimo, arba dėl tarpląstelinų sąveikų. Buvo parodyta, kad neuronų išgyvenimas padidintas nesant astrocitų

(Banker ir CoWan, 1977, Brain Res. 126: 397-425). Gali būti, kad su tuo susijęs faktorius yra CNTF arba neurotrofinų šeimos narys. Neuronais praturtintose kultūrose CNTF poveikis GABA įsisavinimui ir neurofilamentiniam proteinui buvo toks pat. Duomenys ryškiai prieštarauja astrocitų vaidmeniui CNTF poveikyje ir įgalina manyti, kad poveikis daromas betarpiškai neuronams. Panaudodami myc-tag CNTF ligandą ir antikūną prieš myc, mes turime paliudijimą, kad neuronuose yra receptoriai CNTF.

Padedantis Amono rago neuronų išgyvenimui CNTF aktyvumas, matyt, neapsiriboja GABA erginiais neuronais. Yra paliudijimas, kad acetilcholinesterazės-imunopozityvių ląstelių kiekis taip pat didėjo dalyvaujant CNTF. AhcE -histocheminio apdažymo intensyvumas buvo žymiai labiau išreikštas CNTF apdirbtose kultūrose. Tai gali būti svarbus CNTF vaidmens, kaip galimo retrogradinio išgyvenimo ir diferencijuojančio faktoriaus cholinerginiams neuronams medial septum, nurodymas.

Dviejų bendrų neuroninio fenotipo markerių NSE ir NF ekspresija padidėjo esant CNTF. NF proteininės akumuliacijos matavimas buvo atliktas panaudojant fermento surištą imuno absorbentą. Monokloninis antikūnas (RT97), naudotas eksperimente, atpažino daugiausia 200 kD NF proteino tripleto formą ir nedideliu laipsniu 150 kD subvienetą.

Anksčiau buvo parodyta, kad PT97 surišimo laipsnis galėjo tarnauti kaip etaloninis neuritų ataugimo, atskiru atveju, aksonų ataugimo indeksas kultivuotiems neuronams (Doherty ir kt., 1984, Neurosci. Lett. 51: 55-60). Amono rago 8 dienų kultūros su CNTF parodė tankesnę ir sudėtingesnę ataugų tinklą. Šis santykinio proteino kiekio padidėjimas galėjo būti paprastai antrinis padidintam neuronų išgyvenimui. Alternatyviai CNTF gali daryti selektyvų poveikį neuritų ataugimo indukavimui.

CNTF aktyvumo specifiškumas, padedantis išgyvenimui, buvo nustatytas dviejų kitų neurotrofinų faktorių, žinomų, kad jie yra

Amono rage, poveikių tyrimais (Mezon ir kt., 1990, Science, 247: 1446-1451). Sutinkant su priešėjusiais stebėjimais, kad NAF nėra išgyvenimo faktorius Amono rago neuronams, mes negalėjome rasti jokio NAF poveikio GABA erginiams neuronams.

Kitas neurotrofinės šeimos narys BDNF taip pat, atrodo, nepadeda GABA erginių neuronų išgyvenimui kultūroje. Iš kitos pusės, buvo parodyta, kad bFAF yra svarbus išgyvenimo Amono rage faktorius (Wallicke ir kt., 1986, PNAS USA, 83: 3012-3016) ir, gal būt, veikia kaip neurotrofinis faktorius CNS (Morrison ir kt., 1986, PNAS, JAV, 83: 7537-7541; Anderson ir kt., 1988, Nature, 322: 360-361). Panašiai kaip bFAF, CNTF aktyvus esant labai žemoms koncentracijoms.

Buvo parodyta, kad Amono ragas pažeidžiamas keliais neurodegeneraciniais susirgimais, įskaitant Alzheimerio ligą. Paslėpti mechanizmai, sukeliantys selektyvią Amono rago formacijos degeneraciją, dar nesuprasti. Iškelta hipotezė, kad iššaukiantis aminorūgščių neurotransmiteris gliutamatas gali vaidinti svarbų vaidmenį ligos procese. Demonstracija, kad CNTF gali palaikyti Amono rago neuronų išgyvenimą in vitro, gali duoti svarbius nurodymus neudegeneracinių susirgimų gydymo būdų sukūrimui. Bus svarbu nustatyti, ar gali CNTF apginti Amono rago neuronus nuo gliutamatinio neurotoksiškumo, kaip buvo atveju su FAF (Mattson ir kt., 1986, PNAS, 83: 7537-7541). Informacinė RNR CNTF buvo neseniai rasta Amono rage Northern-blot analize (Masiakowski, privatus ryšiai). Ląstelių tipo CNTF sintezės in vitro specifiskumas dar nenustatytas. Fiziologinis CNTF vaidmuo Amono rage jam vystantis in vivo pasilieka nenustatytas, bet šių tyrinėjimų šviesoje CNTF gali būti endogeninis neurotrofinis faktorius su potencialiu vaidmeniu neuronų išgyvenimo Amono rage reguliavime.

16. Pavyzdys: Žiurkės CNTF padidina žiurkės Amono rago astrocitų proliferaciją kultūroje

16.1. Medžiagos ir būdai

16.1.1. Žiurkės Amono rago astrocitų gavimas

Amono ragai buvo išimti disekcija iš žiurkės embrionų E18 ir surinkti terpėje F10 (Zibko), turinčioje 24 mM Hepes. Audiniai buvo susmulkinti į mažus gabalėlius ir tripsinizuoti 0.25% tripsinu (13 Amono ragų penkiems ml 0.25% tripsino) 20 minučių 37°C temperatūroje. DN Razė buvo pridėta iki galutinės 0.2 ng/ml koncentracijos per 10 minučių. Reakcija buvo sustabdyta lygiu DME tūriu, pridėdant 10% veršiuko vaisiaus serumo, ir audiniai buvo dukart perplauti.

Disocijuotos ląstelės, gautos minkštu sutrynimu, buvo surinktos DME/FCS, ir suspensija buvo praleista per 20 mm "Niteks" ekraną (Tetko) medžiagos gabaliukų pašalinimui. Ląstelių gyvybingumas buvo nustatomas, panaudojant išskyrimą mėlynuoju tripanu. Ląstelės paskui buvo užsėtos į plastmasinius T75 tipo indelius kultivavimui audinio su 4.82×10^6 ląstelių vienam indeliui tūriu. Terpė buvo keičiama į DME-FCS (10 ml) 1, 3, 5, 7 ir 9 dieną po pasėjimo. 7 ir 9 dieną indeliai buvo kratomi rankomis oligodendrocitų ir bet kokių išgyvenusių neuronų pašalinimui. 10 dieną astrocitai buvo pašalinti su 0.25% tripsinu ir užsėti 96 duobelių puodeliuose tyrimams.

16.1.2. CNTF mitotiniai eksperimentai su žiurkės Amono rago astrocitais

Mitotiniams eksperimentams astrocitai buvo pasėti 16000 ląstelių duobelei tankiu DMEM terpėje, turinčioje 10% veršiuko vaisiaus serumo, 4-ioms valandoms, kad jie prisijungtų. Ląstelės paskui buvo perplautos, ir buvo pridėta 150 μ l nustatytos terpės (DMEM, 0.5% BSA). 24-ioms valandoms buvo pridėta rekombinantinio žiurkės CNTF, gauto kaip 7 skyriaus pavyzdys. Ląstelių žymėjimas buvo atliekamas paskutines 2 iš 24-ių valandų inkubacijos laikotarpio, panaudojant 1 μ Cl duobelei 3 H-timidino (NEN, 20 Ci/mM). Po

inkubacijos ląstelės buvo apdirbtos taip: duobelės buvo dukart perplautos PBS ir inkubuojamos 4°C temperatūroje iki ryto 50-tyje ml 10% trichloracto rūgštyje (TCA). Pašalinus TCA, ląstelės buvo perplautos šaltu vandeniu, soliubilizuotos 100- μ l 1N NaOH, ir skaičiuojamos skystiniu scintiliaciniu skaitliuku su 10 ml akvazolio.

16.1.3. (125 I)-CNTF surišimas

Amono rago astrocitai buvo auginami 37 mm² indeliuose iki maždaug 80-90% susilieimo. Astrocitų monosluoksniai iš pradžių buvo perplauti (2 ml) dukart Chemo F12 terpėje. Paskui prie kultūros buvo pridėta F12 (1 ml), ir ląstelės buvo inkubuojamos ant ledo 15 minučių. Terpė paskui buvo pakeista tokiu pat tūriu šalto Chemo F12. Į duobeles, kurios buvo skirtos nekonkurentinio paskaičiavimo nustatymui, buvo pridėta nežymėto CNTF (100x nežymėto CNTF pertekliaus), ir kultūros buvo inkubuojamos 4°C temperatūroje dar 60 minučių. 125 I-CNTF (gautas panaudojant Voltano-Chantero reagentą, 10 ml), turintis maždaug 280 000 dpm, esant 12 μ Ci nanomoliui) buvo pridėtas prie kiekvienos kultūros, ir inkubaciją tęsė 4°C temperatūroje įvairiais laiko tarpais iki 60 minučių. Nesurištą CNTF pašalino perplaudami ląsteles triskart (po 2 ml kiekvieną kartą) šaltu PB3, turinčiu 10 μ g/ml BSA. Ląstelės buvo soliubilizuotos kultūrų inkubavimu bent 20 minučių kambario temperatūroje 0.5 ml 20 mM tris-HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 1% tritono, 0.1% SDS, 1% dezoksicholato. Ląstelinis lizatas buvo atskirtas ir kultūros buvo dukart perplautos (po 250 μ l kiekvieną kartą) su PBS, turinčiu 10 μ l/ml BSA. Nuoplovos kartu su ląstelių lizatu buvo surinktos į pulus ir skaičiuojamos gama- skaitliuku.

16.2. Rezultatai

Proliferacijos tyrimo rezultatai, pateikti 39 brėž., rodo dvifazę reakcijos į dozę kreivę su didėjančiomis CNTF koncentracijomis, žiurkės Amono rago astroцитams. CNTF sukelia 3 H-timidino inkorporacijos padidėjimą iki 0.01 ng/ml dozės. Esant

koncentracijoms, didesnėms negu 0.1 ng/ml, CNTF praranda savo sugebėjimą stimuliuoti ląstelių proliferaciją.

Biologinė astrocytų reakcija į CNTF rodo, kad šios ląstelės neša funkcinis CNTF receptorius. Du papildomi faktai liudija, kad 1 tipo astrocytai atlieka CNTF receptorių ekspresiją savo ląstelės paviršiuje. Surišimo eksperimentai su (^{125}I) monokloninėse kultūrose pademonstravo konkurentinius ligando-receptorinius saitus; Maksimalus stebėtas specifinis ^{125}I -CNTF surišimas yra 1% bendro CNTF, pridėto prie kiekvienos kultūros. Be to, Northern-blot analizė parodė, kad CNTF stipriai indukuoja betarpiško po jo geno c-fos ekspresiją. Maksimali mRNR indukcija buvo stebima po 1 valandos, o po dviejų valandų ji grįžo į normalų bazinį lygį.

17. Pavyzdys: Nauji monokloniniai antikūnai prieš ciliarinį neurotrofiną ir "sumuštinio" eksperimentas su dviem antikūnais žmogaus ciliariniam neurotrofinui

17.1. Medžiagos ir būdai

17.1.1 Monoklonalinių antikūnų ciliariniam neurotrofinui faktoriui generavimas

17.1.1.1 Imunizacijos būdas

Pelių CB6FI/J patelės buvo inokuliuojamos 10-40 μg rekombinantinio žmogaus CNTF (gauto kaip aprašyta 12 pavydyje) pilname Freido adjuvante ir paskui pakartotinai inokuliuojamos rCNTF pilname Freido adjuvante tris savaites iki maždaug 6 mėnesių.

17.1.1.2. Hibridomos formavimas

Blužnies ląstelės iš imunizuotų pelių buvo sujungtos su mielomos SP2/0 ląstelėmis santykiu 2:1 (limfocitų ląstelės: mielomos ląstelės), panaudojant PEG 4000, po to jos buvo kultivuotos pilname RPMI su 2% HAT (hipoksatinas, aminopterinas ir timidinas), esant maždaug 10^5 limfocitų duobelėje tankiui, selekcijai hibridomoms.

17.1.1.3. Hibridomų skринingas jų CNTF-reaktyvumui ištirti

Antikūnai, reaguojantys su žmogaus CNTF (hCNTF) buvo identifikuojami iš pradžių su fermentu susijusiu imunosorbentiniu eksperimentu (ELISA) su rekombinantiniu hCNTF, sujungtu su plastmasiniais indeliais. Antikūnai toliau buvo charakterizuojami ELISA ir Western- imunoblotingu pagal jų sugebėjimą reaguoti su rekombinantiniu hCNTF, rekombinantiniu žiurkės CNTF (rCNTF) ir pakeistomis hCNTF formomis, kaip aprašyta aukščiau.

17.1.2. Žmogaus CNTF variantų gavimas

Ekspresijos ir vektorių išvalymo būdais, aprašytais 13.1.2 skyrelyje, buvo generuotos įvairios žmogaus CNTF formos. Trumpai, Žmogaus CNTF variantinis proteinas #112 buvo gautas vektoriaus pRPN112 ekspresija, ir jis neturi 55 aminorūgščių likučių, prarastų nuo žmogaus CNTF karboksilo terminalinio galo. Proteiną #82 yra sintezuotas proteinas, kurio pirmos 66 žmogaus CNTF aminorūgštys yra pašalintos delecija, ir molekulės likutis prijungtas prie neidentifikuoto žmogaus proteino. Proteiną #49 buvo generuotas, panaudojant pRPN59, ir jame nėra hCNTF 15 aminorūgščių prie karboksilo galo (22 brėž.).

17.1.3. Dviejų saitų imunoeksperimento metodika

Kad būtų nustatytas CNTF kiekis biologinės medžiagos pavyzdžiuose, būtų geriau padaryti imunologinį eksperimentą šiam proteinui.

Vienas toks jautrus ir patogus imunoeksperimentas yra "sumuštinio" būdas su dviem antikūnais (žiūr., pvz., E.Charlow ir D.Lein "Antikūnai: Laboratorinis vadovėlis", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.578-583). Pagal šį būdą iš pradžių pirmas antikūnas sujungiamas su tvirtu pagrindu ir jam leidžiama reaguoti su tirpalu, turinčiu reikiamą antigeną; Paskui antram antikūnui, paprastai nukreiptam į kitą antigeno epitopą, leidžiama reaguoti su antigenu, surištu su pirmu antikūnu, ir kiekybiškai nustatomas antras surištas antikūnas, kuris turi būti betarpiškai proporcingas surišto antikūno kiekiui. Viename šio būdo įgyvendinime ir pirmas, ir antras antikūnas yra monokloninis antikūnas.

Šis dviejų saitų eksperimentas, skirtas žmogaus CNTF, schematiškai pavaizduotas 40 brėž. Svarbu, kad afiniškai išvalytas antrinis antikūnas, specifinis pelės imunoglobulino C poklasei (IgG**C** parodytu atveju), adsorbavosi eksperimentiniame indelyje ir buvo naudojamas hibridominių ląstelių pirmo monokloninio supernatanto užėmimui. Paskui buvo pridėta žmogaus CNTF, ir jam buvo leista susirišti su pirmu monokloniniu antikūnu. Antras anti-CNTF kitos poklasės monokloninis antikūnas (RP12-2, pelės IgG**I**), taip pat iš nefrakcionuotų hibridominių kultūrų supernatantų, buvo pridėtas jo surišimui su bet kuriuo CNTF užimtu pirmu monokloniniu antikūnu. Taip surištos bet kurios RP12 dvi molekulės buvo paskui rastos, panaudojant afiniškai išvalytą antrinį antikūną, specifinį pelės IgG**I**, sujungtiniam su fosfatfaziniu substrato para-nitrofenilo fosfatu, kurio suskaldymas indukuoja spalvotą reakcijos produktą (matavo esant 405 nm absorbcijai).

17.2. Rezultatai ir svarstymas

Klasės, atstovaujamos čia RP3-12 ir RP3-17, monokloniniai antikūnai buvo sukuriami tame pačiame susiliejimo eksperimente, panaudojant splenocitus iš vienintelės imunizuotos žiurkės. Ir RP3-12, ir RP3-17 nereagavo su bet kuria iš išbandytų dviejų karboksilo terminalinių hCNTF delecijų, o taip pat nesurišo CNTF,

kaip parodyta V lentelėje. Tačiau jie reagavo su sintezuotu proteinu #82, kuriame išliko hCNTF karboksilo galas. Tuo būdu šie antikūnai atpažįsta epitopą (arba arti išdėtytus epitopus), išdėstyta prie hCNTF karboksilo terminalinio galo, viduje arba perdengdami segmentą iš 15 karboksilo terminalinių aminorūgščių likučių, pašalintų delecija iš hCNTF proteino #59. Priešingai, monokloniniai RP12-2 ir RP12-9 antikūnai reagavo su hCNTF proteinu #59 ir proteinu #112, kaip ir su sintezuotu (sulietu, sulydytu) proteinu #82. Abu šie antikūnai gali atpažinti epitopus, išdėstytus tarp maždaug 66 ir 145 hCNTF. Žemėlapių duomenys rodo, kad epitopai, atpažįstami RP12-2 ir RP12-9, turi būti bent maždaug 40 aminorūgščių likučių virš aminorūgščių, atpažįstamų RP3-12 arba RP3-17 (22 brėž.). Antikūnai RP12-2 ir RP12-9 skiriasi savo sugebėjimu atpažinti žiurkės CNTF (V lentelė), nurodydami, kad jie atpažįsta įvairius epitopus, iš kurių vienas (tas, kuris atpažįstamas RP-12-9), gal būt, gerai konservuotas tarp graužikų ir primatų. Šių visų monokloninių antikūnų sugebėjimas surišti denatūruotą proteiną Western-blot eksperimente leidžia manyti, kad jie atpažįsta paprastus epitopus, sudarytus iš mišrių arba labai arti išsidėsčiusių aminorūgščių likučių, greičiau negu konformacinius epitopus.

Pradiniai eksperimentai buvo atliekami tam, kad nustatytų, kokios monokloninių antikūnų prieš hCNTF poros buvo tinkamos dviejų antikūnų "sumuštinio" išvystymui šiam ligandui. Eksperimentas buvo skirtas tam, kad būtų įvertinti antikūnai ankstyvoje stadijoje, prieš gamybą pilnu mastu arba reagentų valymą, panaudojant poklasės specifinius anti- pelės imunoglobulino reagentus vieno monokloninio antikūno imobilizacijai prie tvirto pagrindo ir antro "pranešančio" monokloninio antikūno suradimui. Dėl reikalavimo, kad šie du monokloniniai antikūnai turi būti iš skirtingų poklasių, tik tam tikros monokloninių antikūnų poros galėjo būti įvertintos šiuo būdu. Puikūs rezultatai buvo gauti su pora RP3-12 ir RP12-2 aprašytame "sumuštinio" eksperimente.

41 brėž. pateikti dviejų antikūnų "sumuštinio" eksperimento

rezultatai, titruojant su didėjančiais (kiekvieną kartą dukart) rekombinantinio žmogaus CNTF kiekiais nuo 7.8 pikogramų vienam eksperimentui (50 μ l su 0.156 ng/ml) iki 500 pikogramų eksperimentui (50 μ l su 10 ng/ml). Buvo rastas įtikinamas signalas, didesnis už foninį (0.44 ± 0.010 absorbcijos vienetų) su 15.5 pikogramais žmogaus CNTF, ir eksperimentas buvo tiesinis iki pačių aukščiausių tirtų lygių. Bet kurio iš monokloninių antikūnų pakeitimas netinkamu tos pačios klasės pelės mielomos proteinu (MOPc-141, poklasė IgG26 vietoj RP12-2) sumažino signalo jėgą iki foninio lygio. Tuo būdu net naudojant nevalytus proteininius supernatantus, galėjo būti pademonstruoti puikūs rezultatai dviejų antikūnų "sumuštinio" eksperimente su monokloniniais antikūnais RP3-12 ir RP12-2. Šie monokloniniai antikūnai gali būti išvalyti įprastais būdais iš hibridomos ląstelių, kurios buvo auginamos terpėje be serumo, supernatantų. Tikimasi, kad būtų gana paprasta padaryti paprastesnį "sumuštinio" eksperimentą, kuriame vienas monokloninis antikūnas gali būti betarpiškai surištas su tvirtu pagrindu, tuo tarpu antras monokloninis antikūnas būtų betarpiškai sujungtinis su "reporteriu" (pranešančiu komponentu), pvz., radioizotopu, tokiu kaip jodas-125; arba fermentu, tokiu kaip šarminė fosfatazė, krienų peroksidazė arba beta-galaktozidazė, arba haptenu, tokiu kaip biotinas, kuris gali būti gautas naudojant žymėtą avidiną arba streptavidiną, tokiu būdu padarant akivaizdžia specifinio tipo antrinių antikūnų būtinybę.

Čia aprašytas labai specifinis jautrus dviejų antikūnų "sumuštinio" tyrimas gali būti pritaikytas daugelyje situacijų, kuriose pageidautina nustatyti kiekybinį žmogaus CNTF dalyvavimą. Pvz., jis gali būti panaudotas žmogaus CNTF monitoringui valymo procedūrose. Analogiškai šis tyrimas gali būti panaudotas CNTF monitoringui po injekcijos eksperimentiniams gyvūnams audinių, kuriuose jis lokalizuojasi, nustatymui. Pagaliau šis tyrimas gali būti panaudotas CNTF lygių žmogaus audiniuose ir/ arba kūno skysčiuose (pvz., serume arba cerebrospinaliniame skystyje) nustatymui. Dėl to, kadangi CNTF yra nervų ląstelių viduje ir pasižymi neurotropiniu aktyvumu, pasidūlyta, kad proteinas turi

išsilaisvinti, atsakydamas į įvairius neuroninius pažeidimus arba susirgimus. Tuo būdu, CNTF lygis atitinkamuose nelasteliniuose skysčiuose turi duoti kiekybinę diagnostinę tokių būklių, kaip neuropatija ir neuroninė degeneracija, matavimo matą.

V Lentelė

Monokloninių antikūnų reaktyvumas į žmogaus CNTF, delecinius žmogaus CNTF mutantus ir žiurkės CNTF

klo- nas	po- klasė	h* CNTF	h CNTF (59)	r CNTF	h CNTF (59)	h CNTF (112)	r CNTF
RP3-12	IgG2b	++	--	--	++	--	--
RP3-17	IgG2a	++	--	--	++	--	--
RP12-2	IgG1	++	++	--	++	++	--
RP12-9	IgG1	++	++	++	++	++	++

* h-žmogaus, r-žiurkės.

18. Ciliarinis neurotropinis faktorius padeda nugaros smegenų motoneuronų išgyvenimui kultūroje

18.1. Medžiagos ir būdai

18.1.1 Ląstelių kultivavimas

Motoneuroniniai audiniai buvo išimami disekcija po stereo-
mikroskopu iš viščiuko embrionų E6 nugaros smegenų juosmens dalies
ir buvo saugomi šaltame subalansuotame Chenkso druskos tirpale be
magnio ir kalcio, pridodant gliukozės (4 g/ml) (HBSS). Audiniai
buvo perplauti HBSS ir apdirbti 0.33% tripsino HBSS 37°C
temperatūroje lengvai kratant, perplauti šaltu HBSS ir švelniai

trituruoti trimis stadijomis su 8-perėjimo mašynu 1 ml šalto 0.1% sojos pupelių tripsino inhibitoriaus (Sigma) HBSS per išdegintą silikonizuotą Pastero pipetę. Klekviena ląstelinio supernatanto suspensija buvo filtruojama per 50 μ M neiloninį tinklėlį, surenkama į pulą ir sluoksniu uždedama ant 4 ml šalto 6.8% metrizamido (Fliuko) HBSS 25 mM HEPES (pH 7.4) 12 ml silikonizuotame kuginiame stikliniame mėgintuvėlyje. Mėgintuvėlis buvo centrifuguotas su 400 g 15 minučių 4°C temperatūroje ir tarpinis sluoksnis (0.5 ml) buvo surinktas į kitą silikonizuotą mėgintuvėlį, turintį 6.5 ml šaltos kultūrinės terpės (gliukozės mišinys) (4 g/l), pridedant šviežiai paruoštos L-15 Leibovitso (Zibko) terpės, 0.15 M natrio bikarbonato, inaktyvuoto šiluma ir nufiltruoto arklio serumo bei penicilino G (10^5 vienetų ml), santykiu 75:15:10:0:1, neutralizuoto su buferiu 5% CO₂. Po centrifugavimo su 100 g 7 minutes 4°C temperatūroje supernatantas buvo atskirtas ir ląstelės lengvai resuspenduotos kultūrinėje terpėje ir užsėtos Greinerio 4 duobelių kultivavimo indeliuose (duobelių diametras 10 mm, Firma "Greiner ir sūnūs", Nurtlingen, VFR) 1000-2000 ląstelių duobelei tankiu. Šie indeliai buvo iš anksto padengti poli-DL-ornitinu (Sigma, 0.5 mg 0.15 M natrio borato buferyje (pH 8.3) iki ryto 4°C temperatūroje, dukart perplauti buferiniu fiziologiniu tirpalu (PBS) ir paskui padengti lamininu) (Zibko, 10 μ g/ml kultivavimo terpėje be serumo), ir patalpinti 5% CO₂ inkubatorių iki ląstelių pasėjimo (5-6 valandas). Ląstelės buvo inkubuojamos sudrėkintoje terpėje 5% CO₂ ir 95% oro atmosferoje. Pavyzdžiai buvo pridedami po valandos po pasėjimo, ir kultivavimo terpė buvo keičiama po 24 ir 72 valandų. Pradinį ląstelių kiekį skaičiavo po 3 valandų po pasėjimo.

18.1.2. Retrogradinis motoneuronų žymėjimas ir motoneuronų kultūrų grynumo įvertinimas

Kai kuriuose eksperimentuose motoneuronai buvo retrogradiškai pažymėti fluorescenciniais dažais in vivo prieš ląstelių paruošimą (U Dorman ir kt., 1986, "Biologijos išvystymas", 118: 209-221) motoneuroninės ląstelių populiacijos identifikavimui. Klausinių,

inkubuotų 5 dienas, lukšte darė nedidelę skylutę. Nedidelį rodamino-izotiocianato (Sigma) kristalų gabalėliai buvo įvesti dviejose-trijose vietose kiekvienoje iš užpakalinių galūnių (klube), ir skylutė kiaušinyje buvo užklijuota celofanu. Kiaušiniai buvo inkubuojami dar 24 valandas. Kai kurie iš apdirbtų neuronų buvo dalinami į užšaldytas sekcijas po formaldehidinės fiksacijos. Nugaros smegenų viduje buvo rastos žymėjimui tik lateralinės motoneuronų kolonijos. Kiti embrionai buvo naudojami ląstelių gavimui, naudojant aukščiau aprašytą būdą (žiūr. skyrelį 18.1.1).

Po penkių valandų kultūroje ląstelės buvo perplautos šiltu HBSS, fiksuotos 4% formaldehidu PBS kambario temperatūroje 20 minučių, perplautos PBS ir paskui patalpintos glicerino PBS (1:1) po dengiančiais stiklais. Iš bendro ląstelių skaičiaus maždaug 83% buvo pažymėti ir identifikuojami kaip motoneuronai (42 brėž.). Daugelis žymėtų motoneuronų buvo didelės ląstelės, o likusios ląstelės buvo tarpinio dydžio. Nebuvo pažymėtos mažos ląstelės. Iš kitos pusės eksperimentuose, kuriuose ląstelės nebuvo pažymėtos fluorescesiniais dažais, maždaug 70% bendro ląstelių kiekio buvo didelės aiškos fazės ląstelės su apvaliomis ląstelių somomis, maždaug 20% buvo tarpinio dydžio neuronai (daugelis iš jų galėjo būti motoneuronai) ir maždaug 10% buvo maži nesubrendę neuronai (jie turėjo į neuronus panašias ataugas su daiginiais kūgiais, bet turėjo tamsios fazės, pusiauplokščią ląstelinę somą). Neuroninių ląstelių arba nebuvo, arba jų buvo mažiau kaip 2%. Apibendrinant galima pasakyti, kad bent 83% ląstelių yra motoneuronai, tuo tarpu likusieji yra nežymėti motoneuronai, nedidelė dalis sudaryta iš neidentifikuotų vidutinio dydžio motoneuronų ir maždaug 10% nesubrendusių nedidelių neuronų. Mes taip pat radome, kad jei žymėtos ląstelės buvo kultivuojamos su viščiukų embrionų raumenų ekstraktu (U. Dorman ir kt., 1986, "Biologijos išvystymas", 118: 209-211), tai fluorescencinės teigiamos ląstelės sumažėjo dydžiu per keletą dienų. Kadangi bendras ląstelių kiekis ir didelių ląstelių kiekis mažėjo daug lėčiau, tai yra praradimas ir/arba fluorescencijos išblukimas, bet ne ląstelių žūtis. Todėl tam, kad įvertintų pavyzdžių išgyvenimo aktyvumą, įprastuose

eksperimentuose kaip motoneuronai buvo skaičiuojamos didelės aišrios fazės ląstelės labiau negu fluorescenciškai teigiamos ląstelės.

18.2. Rezultatai ir svarstymas

18.2.1. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (CNTF) poveikis viščiukų embrionų nugaros smegenų motoneuronams kultūroje

Daugelis motoneuronų žuvo per tris dienas tuščių kontrolinių pavyzdžių kultūroje. Dalyvaujant rekombinantiniam žiurkės CNTF, apie 70% buvo gyvi po trijų dienų kultūroje ir apie 60% po šešių dienų kultūroje (43 ir 44 brėž.) Kadangi daugelis motoneuronų žuvo per tris dienas tuščiose kultūrose, išgyvenimo aktyvumai buvo vertinami trečią dieną. Reakcijos į CNTF priklausomybės nuo jo koncentracijos kreivė parodė (45 brėž.), kad EC_{50} (koncentracija, reikalinga 50% išgyvenimui) CNTF buvo tik apie 20 pg/ml (1 pM), t.y. beveik tokia pati, kaip ciliariniams neuronams. Šis žymus CNTF išgyvenimo aktyvumas su labai žema EC_{50} labai palaiko nuomonę, kad CNTF gali vaidinti esminį vaidmenį motoneuronų išgyvenime *in vivo*, kaip buvo parodyta (žiūr. 11 pavyzdį aukščiau, Zentner ir kt., 1990, Gamta, 345: 440-441).

18.2.2. Poveikis specifinių neurotropinių molekulių ir citokininų išgyvenimui

Iš visų išbandytų molekulių CNTF ir pagrindinis fibroblastų augimo faktorius (FAF) pasirodė galingiausiomis molekulėmis (VI lentelė). Rūgštinio FAF išgyvenamasis aktyvumas galėjo būti padidintas, kai kultūroje buvo pridėta heparino, kuris išmaišė į rūgštinio FAF proteolitinę degradaciją. Į insuliną panašaus I ir II augimo faktoriaus (IAF), o taip pat insulino poveikis buvo nežymus. Reakcijos į šių aktyvių molekulių koncentraciją kreivės parodė,

kad didžiausias poveikis išgyvenimui galėjo būti gautas:

- a) CNTF: 64% išgyvenimo su 1 ng/ml;
- b) pagrindinis FAF: 51% su 30 ng/ml;
- c) rūgštinis FAF: 18% su 300 ng/ml;
- d) rūgštinis FAF, dalyvaujant 1 mg/ml heparino: 35% su 100 ng/ml;
- e) IAF-I: 15% su 100 ng/ml;
- f) IAF-II: 15% su 300 ng/ml;
- g) insulinas: 16% su 25 μ g/ml.

E_{50} reikšmės buvo: 0.023 ng/ml CNTF ir 0.26 ng/ml pagrindiniam FAF. I ir II IAF, o taip pat insulinui patikimos EC_{50} reikšmės negalėjo būti nustatytos, kadangi maksimalūs poveikiai buvo labai maži, lyginant su kontroliniais pavyzdžiais. Heparino koncentracija buvo esminė rūgštinio FAF aktyvumo padidinimui. Naudotos šiuose eksperimentuose koncentracijos (1 μ g/ml), atrodo, nebuvo maksimalios rūgštinio FAF išgyvenimo aktyvumo padidinimo atžvilgiu. Tačiau didesnės heparino koncentracijos sukeldavo neuronų atsiskyrimą nuo kultivavimo indelių. Netgi su 1 μ g/ml heparino neuronų atsiskyrimas prasidėjo po 3 dienų inkubacijos. Beta-NAF, BDNF, PDAF, EAF, TAFa, TFG beta I, IL-3 arba IL-6, arba IFNc neparodė jaučiamo poveikio netgi su dozėmis, viršijančiomis maksimalias koncentracijas (biologinio poveikio kitiems ląstelių tipams atžvilgiu). Taip pat NT-3, naujas neurotropinių faktorių BDNF/NAF genų šeimos narys, buvo naudojamas šiuose eksperimentuose. NT-3 proteino, produkto transfektuotomis cos ląstelėmis, kuris palaiko embrionų ^(mazginių) nodozinio ganglijo neuronų išgyvenimą kultūroje, koncentracijos, matyt, neparodo poveikio motoneuronų išgyvenimui.

18.2.3. CNTF, pagrindinio FAF ir IAF-I derinys

Naudojant CNTF ir pagrindinio FAF kombinaciją optimaliomis koncentracijomis, buvo gautas 100% motoneuronų išgyvenimas viena savaitę (VII lentelė). Tas pats buvo teisinga CNTF, pagrindinio FAF ir IAF-I kombinacijai. Vieno paties IGF-I poveikis buvo nedidelis (VI lentelė), bet išryškėjo, kai jis buvo naudojamas derinyje arba su CNTF ir/arba su pagrindiniu FAF (VII lentelė).

112

VI Lentelė
Žinomų molekulių poveikiai motoneuronų išgyvenimui

molekulė	koncentracija	išgyvenimas ^{a)}
kontr.	-	-
β NAF (pelės)	10 μg/ml	-
BDNF (kiaulės)	10 μg/ml	-
NT-3	—	-
CNTF (žiurkės rekomb.)	500 pg/ml	+++
pagr. FAF (žm. rekomb.)	10 ng/ml	++
rūgšt. FAF (žm. rekomb.)	300 ng/ml	±
rūgšt. FAF+heparinas	100 ng/ml+1 g/ml	++
PDAF (rekomb.)	5 ng/ml	-
EAF (pelė)	10 ng/ml	-
TAF α (žm. rekomb.)	10 ng/ml	-
TAF beta I (kiaulės rekomb.)	5 ng/ml	-
IL-1 beta (žm. rekomb.)	100 vien./ml	-
IL-3 (pelės rekomb.)	100 vien./ml	-
IL-6 (pelės rekomb.)	50 vien./ml	-
IFNc (žiurkės rekomb.)	1000 vien./ml	-
IAF-I (žm. rekomb.)	100 ng/ml	±
IAF-II (žm. rekomb.)	300 ng/ml	±
insulinas (veršiuko)	25 μg/ml	±
transferinas (žm.)	100 lg/ml	±

a): poveikis išgyvenimui buvo tiriamas po trijų dienų kultūroje ir vertinamas minusais ir plusais: - nežymiai skiriasi nuo kontrolinio pavyzdžio (išgyvenimas: $8.3 \pm 3.8\%$, vidurkis ± 30 , $p=18$), $\pm$, apie 15-20% (statistiškai labai skiriasi nuo tuščio kontrolinio pavyzdžio, "p" mažiau 0.01); ++ apie 35-50%; +++ apie 55-75%. Rezultatai surašyti į lentelę iš skirtingų eksperimentų.

VII Lentelė

113

Papildomi CNTF, pagrindinio FAF ir IAF-II poveikiai

Faktoriai	Motoneuronų išgyvenimas ^{a)}
kontrolinis pvz.	4.8±1.0
IAF-I (1 µg/ml)	14.5±0.5**
pagr. FAF (30 ng/ml)	51.9±3.6
CNTF (1.5 ng/ml)	60.7±5.9
pagr. FAF (+IAF-I)	76.1±4.1**
CNTF+ IAF-I	87.0±4.5*
pagr. FAF+CNTF	98.2±3.0
pagr. FAF+CNTF+IAF-I	102.5±5.3 ^{NS}

a): neuronų išgyvenimas buvo tiriamas po trijų dienų kultūroje, paskaičiuojant ląsteles srityje, kuri atitinka kiekvienos duobelės dugno 23%. Vidurkis± SEM (p=4).

*): p mažiau negu 0.05;

*): p mažiau negu 0.01;

NS: nežymus.

T-bandymo rezultatai nurodyti tik reikšmių palyginimui su arba be IAF-I, kadangi OAF-I poveikis santykinai mažas. Kitų palyginimų skirtumai nedideli (p mažiau kaip 0.01).

19. Mikroorganizmų deponavimas

ATCC (Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20 852) buvo deponuoti tokie rekombinantiniai bakteriofagai ir rekombinantinės plazmidės:

ATCC numeris deponavimo
data

plazmidė pCP g CNTF-C-I	40 655	89-12-9
plazmidė pCMV-g-CNTF-C-I	40 656	89-12-9
bakteriofagas hCNTF-C-1	40 657	89-12-9
hibridoma RP3-12		90-15-8
hibridoma RP12-2		90-15-8

NRRL (Žemės ūkio tiriamojoje kultūrų kolekcijoje, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604) buvo deponuotos tokios rekombinantinės plazmidės:

	numeris	deponavimo data
plazmidė pRPN38		90-8-15
plazmidė pRPN40		90-8-15

Šis išradimas neapsiriboja specifiniais jo įgyvendinimais, pateiktais aprašyme. Iš tikrųjų šios sritys specialistui iš aprašymo ir pridedamų pavyzdžių bus akivaizdžios įvairios šio išradimo modifikacijos. Išradimas taip pat apima tokias modifikacijas pagal pateikiamos apibrėžties punktus. Įvairūs literatūros šaltiniai, cituoti tekste, įeina į aprašymą kaip literatūros nuorodos.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Biologiškai aktyvaus žmogaus ciliarinio neurotropinio faktoriaus bakterijose gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad

(a) išaugina bakterinę ląstelę, transformuotą bakteriniu ekspresijos vektoriumi, apimančiu DNR

ATGGCTTTCA CAGAGCATTC ACCGCTGACC CCTCACCCTC GGGACCTCTG TAGCCGCTCT AT
CTGGCTAGCA AGGAAGATTC GTTCAGACCT GACTGCTCTT ACGGAATCCT ATGTGAAGCA TC
AGGGCCTGAA CAAGAACATC AACCTGGACT CTGCGGATGG GATGCCAGTG GCAAGCACTG AT
CAGTGGAGTG AGCTGACCGA GGCAGAGCGA CTCGAAGAGA ACCTTCAAGC TTATCGTACC TT
CCATGTTTTG TTGGCCAGGC TCTTAGAAGA CCAGCAGGTG CATTTTACCC CAACCGAAGG TG
ACTTCCATCA AGCTATACAT ACCCTTCTTC TCCAAGTCGC TGCCTTTGCA TACCAGATAG AG
GAGTTAATGA TACTCCTGGA ATACAAGATC CCCCAGCAATG AGGCTGATGG GATGCCTATT AA
TGTTGGAGAT CGTGGTCTCT TTGAGAAGAA GCTGTGGGGC CTAAAGGTGC TGCAGGAGCT TT
CACAGTGGAC AGTAAGGTCC ATCCATGACC TTCGTTTCAT TTCTTCTCAT CAGACTGGGA TC
CCAGCACGTG GGAGCCATTA TATTGCTAAC AACAAGAAAA TG

kur minėtas bakterinis ekspresijos vektorius sugeba būti replikuotas minėtoje bakterinėje ląstelėje ir sugeba nukreipti nurodytos DNR ekspresiją minėtoje bakterinėje ląstelėje, kad būtų gautas žmogaus ciliarinis neurotropinis vektorius;

(b) sukelia žmogaus ciliarinio neurotropinio faktoriaus gamybą minėtoje bakterinėje ląstelėje;

(c) išskiria biologiškai aktyvų žmogaus ciliarinį neurotropinį faktorių iš minėtos bakterinės ląstelės.

2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad bakterinė

ląstelė yra E.coli.

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad bakterinis ekspresijos vektorius yra pRPN40, deponuotas NRRL, registracijos numeris B-18701.

4. Bakterinis ekspresijos vektorius, apimantis DNR

ATGGCTTTCA CAGAGCATTG ACCGCTGACC CCTCACCGTC GGGACCTCTG TAGCCGCTCT AT
CTGGCTAGCA AGGAAGATTG GTTCAGACCT GACTGCTCTT ACGBAATCCT ATGTGAAGCA TC
AGGGCCTGAA CAAGAACATC AACCTGGACT CTGCGGATGG GATGCCAGTG GCAAGCACTG AT
CAGTGGAGTG AGCTGACCGA GGCAGAGCGA CTCCAAGAGA ACCTTCAAGC TTATCGTACC TT
CCATGTTTTG TTGGCCAGGC TCTTAGAAGA CCAGCAGGTG CATTTTACCC CAACCGAAGG TG
ACTTCCATCA AGCTATACAT ACCCTTCTTC TCCAAGTCGC TGCCTTTGCA TACCAGATAG AG
GAGTTAATGA TACTCCTGGA ATACAAGATC CCCCAGCAATG AGGCTGATGG GATGCCTATT AA
TGTTGGAGAT CGTGGTCTCT TTGAGAAGAA GCTGTGGGGC CTAAAGGTGC TGCAGGAGCT TT
CACAGTGGAC AGTAAGGTCC ATCCATGACC TTCGTTTCAT TTCTTCTCAT CAGACTGGGA TC
CCAGCACGTG GGAGCCATTA TATTGCTAAC AACAAGAAAA TG

kur minėtas bakterinis ekspresijos vektorius sugeba būti replikuotas minėtoje bakterinėje ląstelėje ir sugeba nukreipti nurodytos DNR ekspresiją minėtoje bakterinėje ląstelėje, kad būtų gautas žmogaus ciliarinis neurotropinis vektorius.

5. Bakterinis ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, žymimas pRPN40 ir deponuotas NRRL, registracijos numeris B-18701.

6. Bakterinė ląstelė, transformuota bakteriniu ekspresijos vektoriumi pagal 4 punktą.

7. Bakterinė ląstelė, transformuota bakteriniu ekspresijos vektoriumi pagal 5 punktą.

8. Bakterinė ląstelė pagal 6 arba 7 punktą, besiskirianti tuo, kad bakterija yra E.coli.

9. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (CNTF), kurio aminorūgščių seka yra tokia, kaip parodyta Fig.8A, panaudojimas žmogaus arba gyvulio kūno gydymui nuo motoneuronų, kurių ląstelių kūnai priklauso centrinei nervų sistemai, ligų arba motoneuronų sutrikimų.
10. CNTF pagal 9 punktą, kur CNTF yra gaunamas būdu pagal bet kurį 1-3 punktą.
11. CNTF pagal 9 arba 10 punktą panaudojimas ligų ar sutrikimų, susijusių su nugaros smegenimis, gydymui.
12. CNTF pagal 9 arba 10 punktą panaudojimas ligų ar sutrikimų, susijusių su veido nervo motoneuronais, gydymui.
13. CNTF pagal 9 arba 10 punktą panaudojimas amiotrofinės lateralinės sklerozės gydymui.
14. CNTF pagal 9 arba 10 punktą panaudojimas pirminės lateralinės sklerozės, progresyvaus bulbarinio paralyžiaus, nugaros raumenų atrofijos arba po-poliomielitinio sindromo gydymui.
15. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (CNTF), kurio aminorūgščių seka yra tokia, kaip parodyta Fig.8A, panaudojimas žmogaus arba gyvulio kūno gydymui nuo motoneuronų, kurių ląstelių kūnai priklauso centrinei nervų sistemai, pažeidimo.
16. CNTF panaudojimas pagal 15 punktą, kur CNTF yra gaunamas būdu pagal bet kurį 1-3 punktą.
17. CNTF panaudojimas pagal 15 arba 16 punktą, kur pažeidimas yra sukeltas traumos, chirurgijos, infarkto, infekcijos arba piktybinio proceso.
18. CNTF panaudojimas pagal 15 arba 16 punktą, kur pažeidimas yra sukeltas toksinės medžiagos.

19. CNTF panaudojimas pagal 15 arba 16 punktą, kur pažeidimas yra sukeltas maisto nepakankamumo.
20. CNTF panaudojimas pagal 15 arba 16 punktą, kur pažeidimas susijęs su nugaros smegenimis.
21. Ciliarinio neurotropinio faktoriaus (CNTF), kurio aminorūgščių seka yra tokia, kaip parodyta Fig.8A, panaudojimas žmogaus arba gyvulio kūno motoneuronų, kurių ląstelių kūnai priklauso centrinei nervų sistemai, degeneracijos sumažinimui.
22. CNTF panaudojimas pagal 21 punktą, kur CNTF yra gautas būdu pagal bet kurį 1-3 punktą.
23. CNTF panaudojimas pagal bet kurį 9-22 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTF yra paskiriamas, įvedant ląsteles, kurios aktyviai gamina CNTF.
24. CNTF panaudojimas pagal bet kurį 9-23 punktą, kur liga arba sutrikimas yra degeneracinis.
25. Žmogaus ciliarinis neurotropinis faktorius (h-CNTF), gautas būdu pagal bet kurį 1-3 punktą.
26. Farmacinė kompozicija, susidedanti iš aktyvaus ingrediento ir farmaciškai priimtino nešėjo, besiskirianti tuo, kad aktyvus ingredientas yra h-CNTF pagal 25 punktą.
27. Monokloninis antikūnas h-CNT faktoriui, apibrėžtam 25 punkte.
28. Monokloninis antikūnas h-CNT faktoriui, gautam panaudojant hibridomą RP3-12, deponuotą ATCC, registracijos numeris ATCC-CRL-10531; arba šio antikūno fragmentas ar darinys.
29. Monokloninis antikūnas h-CNT faktoriui, gautam panaudojant

hibridomą RP12-2, deponuotą ATCC, registracijos numeris ATCC HB 10532; arba šio antikūno fragmentas ar darinys.

30. Monokloninis antikūnas, kuris konkurentiniu būdu inhibuoja antikūno pagal 28 arba 29 punktą surišimą.

31. CNTF panaudojimas pagal 24 punktą, kur degeneracinė liga yra periferinė neuropatija, Parkinsono liga arba Huntingtono chorėja.

32. Žmogaus ciliarinio neurotrofinio faktoriaus (CNTF), kurio aminorūgščių seka yra tokia, kaip parodyta Fig.8A, panaudojimas žmogaus arba gyvulio kūno, sergančio nervų sistemos liga ar sutrikimu, gydymui.

33. h-CNTF panaudojimas pagal 32 punktą, kur nervų sistemos liga ar sutrikimas apima nervų sistemos pažeidimą.

34. h-CNTF panaudojimas pagal 32 arba 33 punktą, kur CNTF yra gaunamas būdu pagal bet kurį 1-3 punktą.

35. h-CNTF panaudojimas pagal bet kurį 32-34 punktą, kur liga yra Alzheimerio liga.

36. h-CNTF panaudojimas pagal bet kurį 32-35 punktą, besiskiriantis tuo, kad žmogaus arba gyvulio kūnas gydomas naudojant kartu antrą terapinę medžiagą.

37. h-CNTF panaudojimas pagal 36 punktą, kur antra terapinė medžiaga yra nervų augimo faktorius arba smegenų kilmės neurotrofinis faktorius.

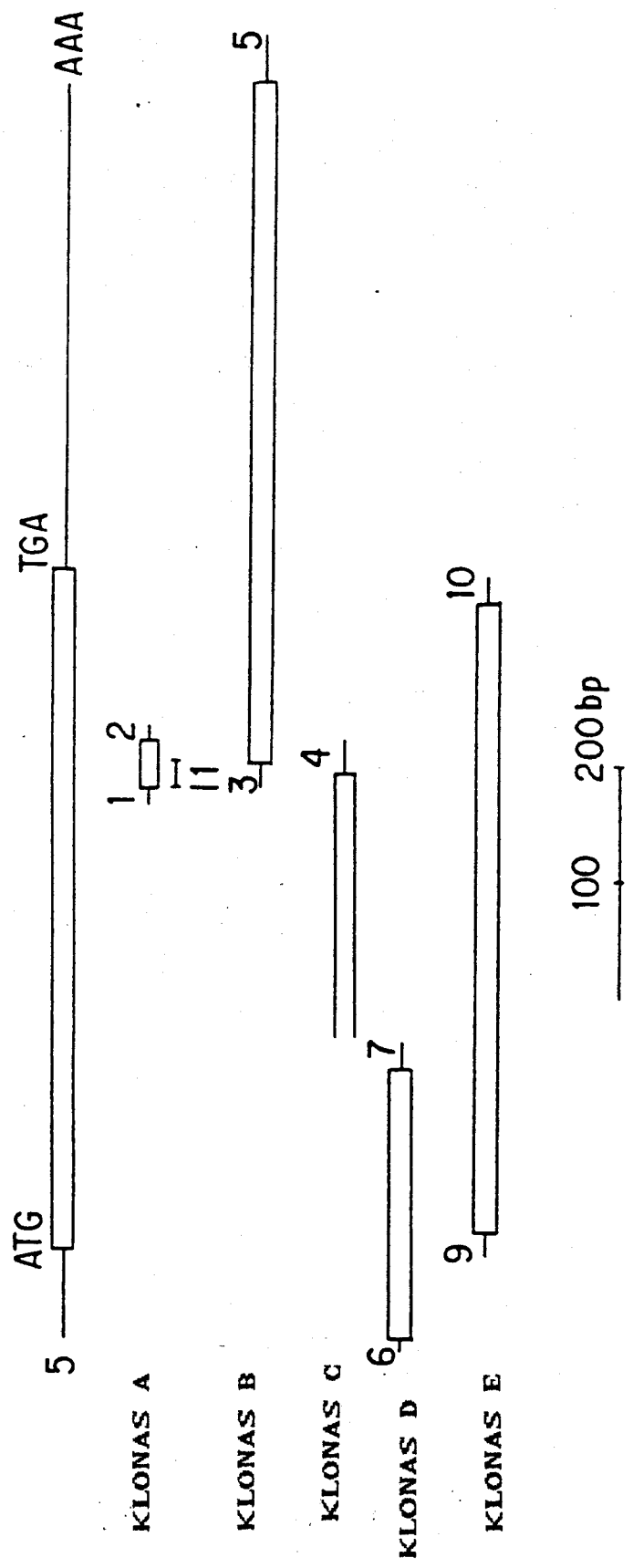


Fig.1a

1 AGTCACATTTCTTATTTGGACTAGTGAAGACAGAAGCAAAACCAGCTCAGTTGTGTCTCTGGGACAGTTGATT
 72 TAGGGGATGGCTTTTCGCAGAGCAAAACACCTCTGACCCCTTACCCGCCGGGACCTCTGTAGCCGTTCTATCTGG
 1 * M A F A E Q T P L T L H R R D L C S R S I W 78

145 CTAGCAAGGAAGATTGTTTCAGACCTGACTGCTCTTATGGAATCTTATGTAAACATCAGGGCCTGAATAAA
 23 L A R K I R S D L T A L M E S Y V K H Q G L N K 76

217 AATATCAACCTTGACTCAGTGGATGGTGTACCAAGTGGCAAGCACTGATCGTTGGAGTGAGATGACTGAGGCA
 47 N I N L D S V D G V P V A S T D R W S E M T E A 73 75

289 GAGCGACTCCAAGAGAACTCCAGGCTTACCGTACCTTCCAAGGGATGTTAACCAAGCTCTTAGAAGACCAG
 71 E R L Q E N L Q A Y R T F Q G M L T K L L E D Q 74 77

361 AGAGTACATTTACCCCAACTGAAGTGACTTCCATCAGGCAATACATACTCTTATGCTCCAGTTTCTGCC
 95 R V H F T P T E G D F H Q A I H T L M L Q V S A CB3

433 TTTGCCTACCAGCTAGAGGAGTTAATGGTGCTTCTGGAACAGAAGATCCCTGAAAATGAGGCTGATGGGATG
 119 F A Y Q L E E L M V L L E Q K I P E N E A D G M CB1

505 CCTGCCACAGTTGGAGATGGTGTCTCTTTGAGAAGAAGCTATGGGGCTTGAAGGTCCTTCAAGAGCTCTCA
 143 P A T V G D G G L F E K K L W G L K V L Q E L S 71 72

Fig. 1b

577 CAGTGGACTGTGAGGTCTAATCCATGACCTTCGGTGTCAATTTCTTCATCAGATGGGAATCTCAGCACATTGAG
 167 Q W T V R S I H D L R V I S S H Q M G I S A L E
 CB2
 649 AGCCATTATGGGGCCAAAGATAAGCAGATGTAGCCATTGCGTCATACCTCTGTCTCCCTTTTGAICTAATG
 191 S H Y G A K D K Q M *
 721 AAATATTGATAGTCCCTGGAGCCTAGTTTTCTCAGCATCAATTTGGAAACACITTAGACCACATGCAATTC
 793 ATCAAGTAGGTTGGCCACATATGAATAGATAGATATACATGGTTATTCTGGCTATGCAAAATGTGTGCACC
 865 CATTGTGGTTTGCATTGGGTGGTATAATAAATGGATGGCCACCCTATCCCTTTCACCATAGTAGTGCTTTAA
 937 CCTTCCTGATACTAAGTAACCTTTTCAGGIGTTTAAACAGTCTTACAGGCAGAGAGAAATTGTAACTCGTTT
 1009 TGGTTGACTTCTGAAAAGACTGAATAAACAAATTGGAAGTCCTAGACTATCTTCATTCAAACACTACCCGAATA
 1081 AAAAGAGTATTGTTGTACAGAGAAAAA

Fig. 1b (teslnys)

Oligo	Seka (5' - 3')	Pozicija
1	CCCGGAATTCGARCARAARATHCC	468 - 481
2	CTGCAGATATCTTYTCRAANARNCC	525 - 538
3	CTGCTAGAGTCGACAAGCTTTTGAAAATGAGGCTGATGGGATG	482 - 503
4	CGTCTAGAGTCGACAAGCTTACCATCTCCAAGTGTGGCAGG	504 - 524
5	CGGATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTTTV	ATAIL
6	CCGGATCCGCGGCCGCCCCCCCCCCCCCCC	GTAIL
7	CCTCTAGACTCGAGTGCTTGCCACTGGTAC	243 - 263
8	AATATCAACCTTGACTCAGTGGAT	215 - 238
9	CCTCTAGAATGGCTTTTCGAGAGCAAACA	78 - 98
10	CCTCTAGACATCTGCTTATCTTTGGCCCC	657 - 677
11	GARAAYGARGCIGAYGGIATGCC	483 - 505
12	CTCCTCIAGCTGRTAIGCAAAGCRCTIACCTG	419 - 451

SUSITARIMAS DEL PAZYMEJIMU

H=A, C arba T, bet ne G

N=A, C, G arba T

K=G arba T

I=Inozinas

Y=C arba T (pirimidinas)

R=A arba G (purinas)

V=A, C arba G, bet ne T

	IŠGRYNINTAS CNTF	NUMATYTAS IS kDNR
Asx	17.1	16
Thr	9.9	12
Ser	9.7	14
Glx	30.5	30
Pro	n. d.	5
Gly	11.7	11
Ala	14.4	14
Val	11.9	11
Met	7.3	9
Ile	7.7	8
Leu	24.5	26
Tyr	4.3	4
Phe	6.4	6
His	6.2	8
Lys	10.2	10
Arg	11.1	11
Cys	n. d.	1
Trp	n. d.	4

6/68

125

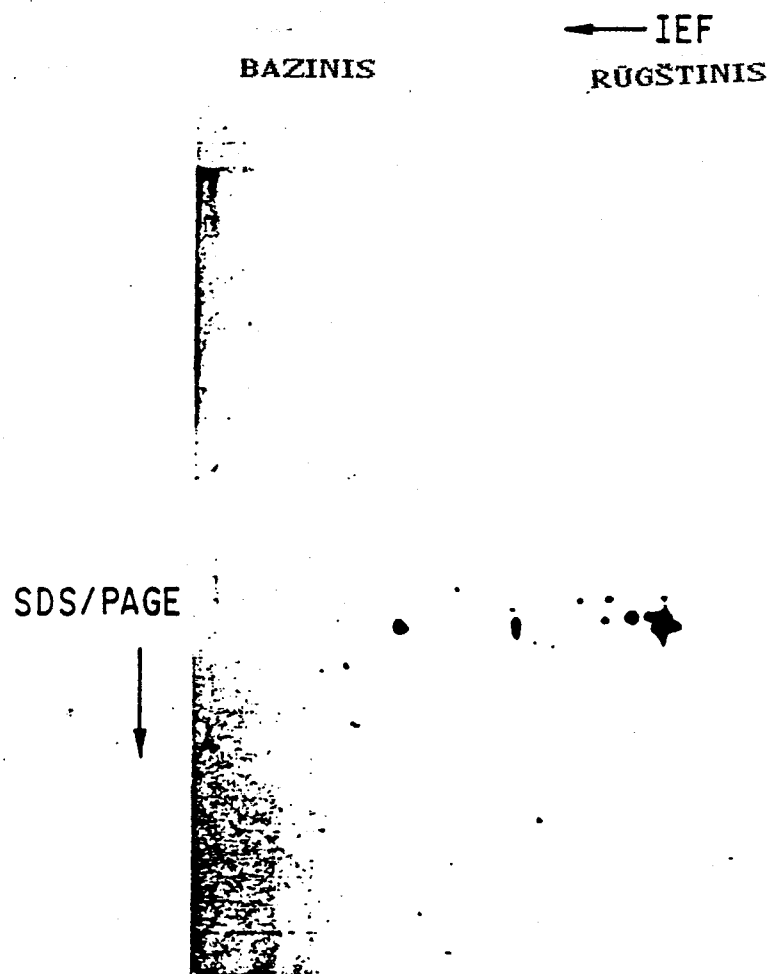


Fig. 2a

7/68

126

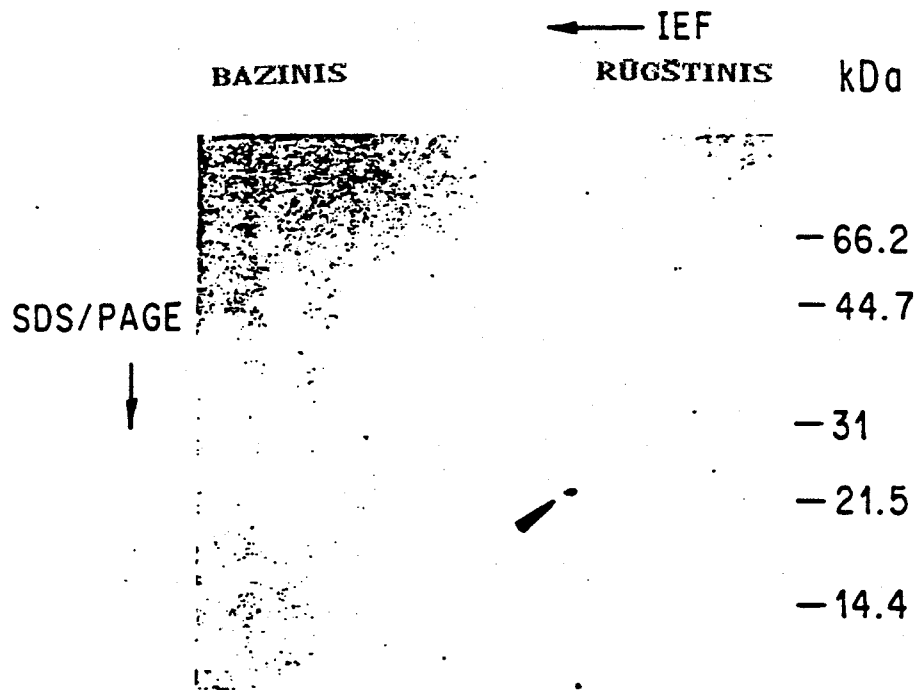


Fig. 2b

8/68

127

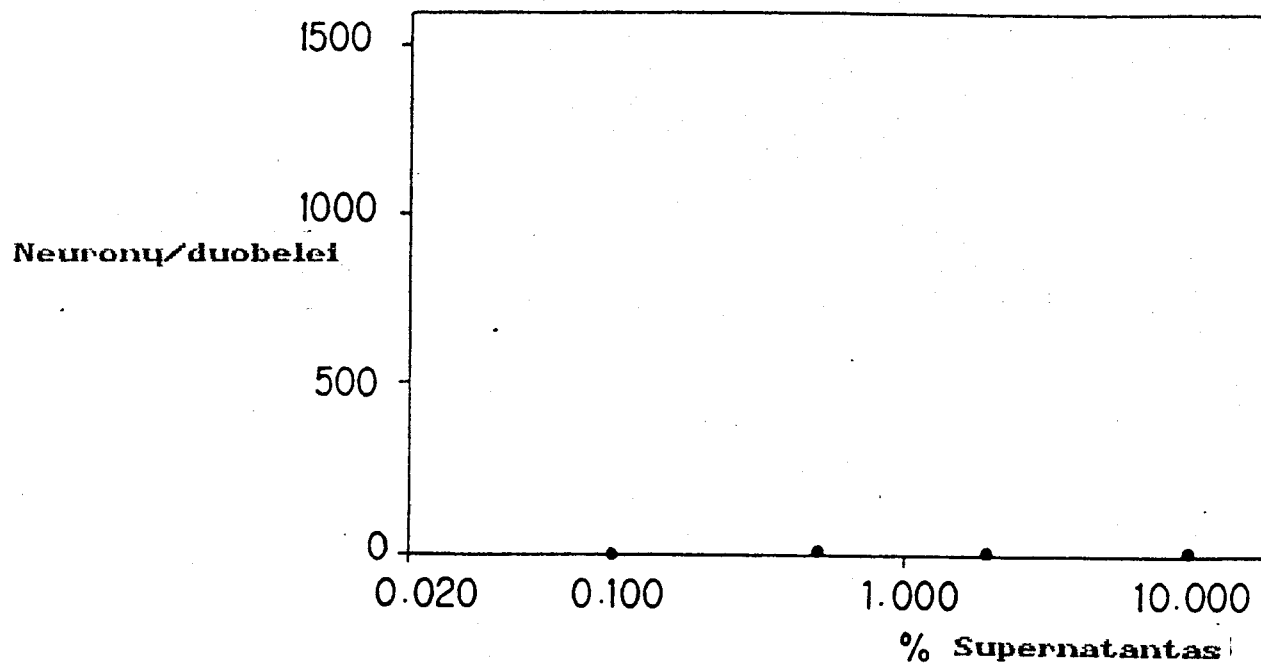


Fig. 3a

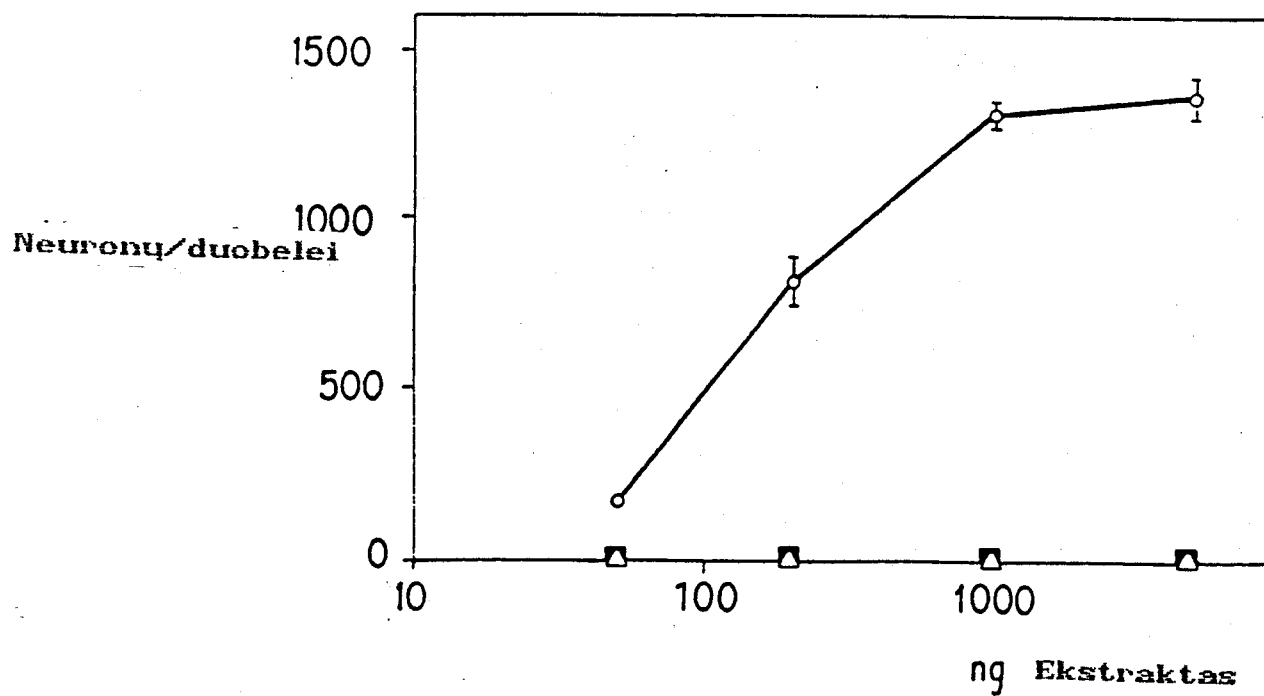


Fig. 3b

9/68

128

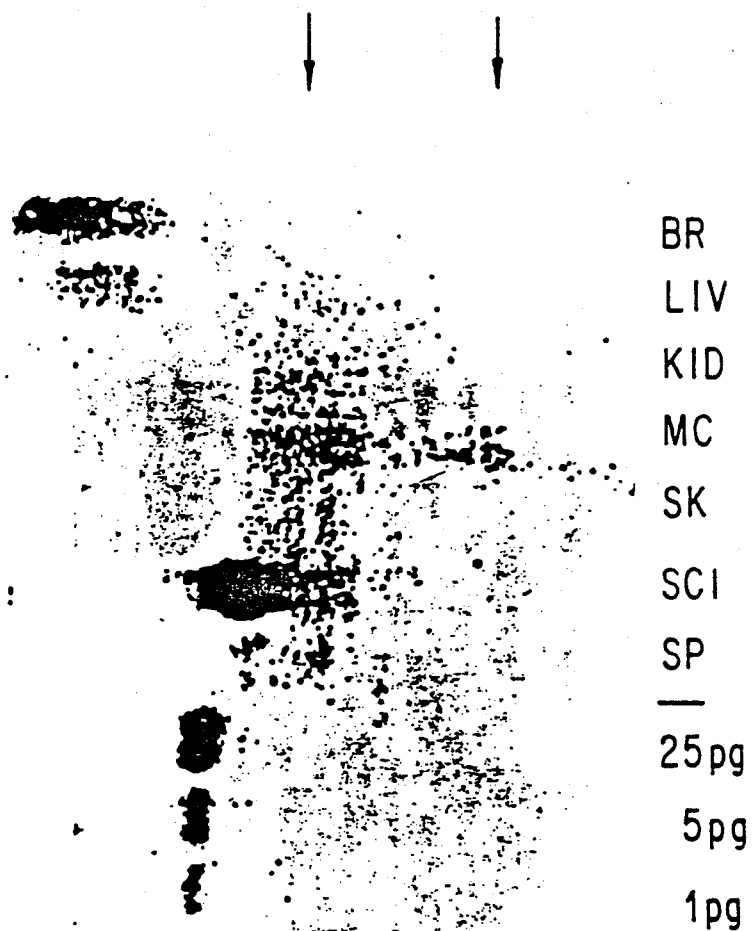


Fig. 4 a

10/68

129

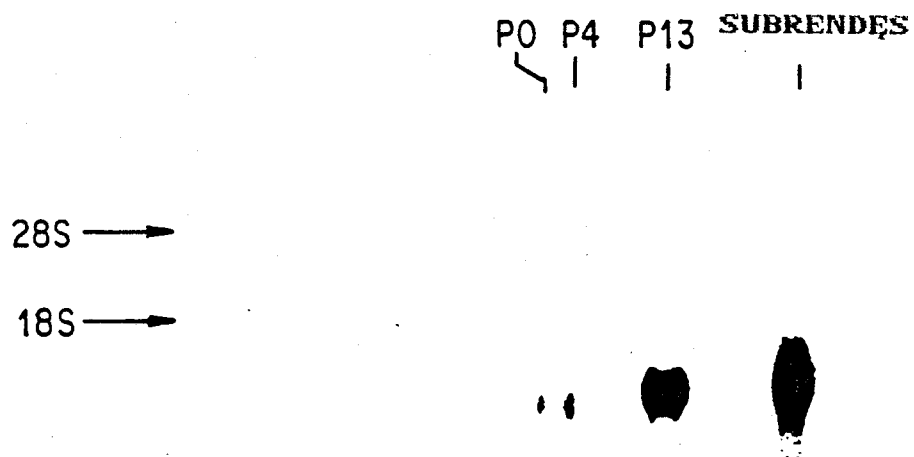


Fig. 4b

11/68

130

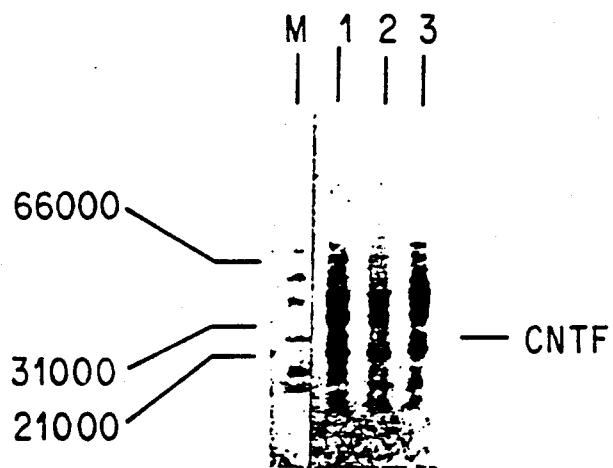


Fig. 5

12/68

131

Zmogaus
zondas

Ziurkės
zondas



Zmogaus] [Ziurkės

Zmogaus] [Ziurkės

Fig. 6a

Fig. 6 b

132

žmogaus	R L Q E N L Q A Y R T F H V L L A R L * * * *	GGGACTCCAAGAGAACCTTCAAGCTTATCGTACCTTCCATGTTTTGTTGCCAGGCTC
žiuokės	R L Q E N L Q A Y R T F Q G M L T K L * * * *	GGGACTCCAAGAGAACCTTCCAGGCTTACCGTACCTTCCAAGGGGATGTTAACCAAGCTC
žmogaus	L E D Q Q V H F T P T E G D F H Q A I H * * * *	TTAGAAGACCAGCAGGTGCATTTTACCCCAACCGAAGGTGACTTCCATCAAGCTATACAT
žiuokės	L E D Q Q R V H F T P T E G D F H Q A I H * * * *	TTAGAAGACCAGAGAGTACATTTTACCCCAACTGAAGGTGACTTCCATCAGGCAATACAT
žmogaus	T L L L Q V A A F A Y Q I E E L M I L L * * * *	ACCCTTCTTCTCCAAGTCGCTGCCITTTGCATACCAGATAGAGGAGTTAATGATACCTCCTG
žiuokės	ACTCTTATGCTCCAAGTTTCTGCCITTTGCCCTACCAGCTAGAGGAGTTAATGGTGCTTCTG * * * *	T L M L Q V S A F A Y Q L E E L M V L L
žmogaus	E Y K I P R N * * * *	GAATACAAGATCCCCCGCAATG
žiuokės	E Q K I P E N * * * *	GAACAGAGATCCCTGAAAATG

Fig. 7 brėž.

GTGCA

CAATCCCA'TTAGAGAAATGCCAGTGGGTTTAGTCTTTGAGAGTCACATCTTATTG

GACCAGTATAGACAGAAAGTAAACCAGCTGACTTGT'TTCTGGGACAGTTGAGTTAAGGG

M A F T E H S P L T P H R R D L C S R S

ATGGCTTTCACAGAGCATTACCGCTGACCCCTCACCGTCGGGACCTCTGTAGCCGCTCT

I W L A R K I R S D L T A L T E S Y V K

ATCTGGCTAGCAAGGAAGATTTCGTTTCAGACCTGACTGCTCTTACGGAATCCTATGTGAAG

H Q G L N K N I N L D S A D G M P V A S

CATCAGGGCCTGAACAAGAACATCAACCTGGACTCTGCGGATGGGATGCCAGTGGCAAGC

T D Q W S E L T E A E R L Q E N L Q A Y

ACTGATCAGTGGAGTGAGCTGACCGAGGCAGAGCGGACTCCAAGAGAACCTTCAAGCTTAT

Fig. 8a

R T F H V L L A R L L E D Q Q V H F T P
CGTACCTTCATGTTTGTGGCCAGGCTCTTAGAAGACCAGCAGTGCAATTACCCCA

T E G D F H Q A I H T L L L Q V A A F A
ACCGAAGGTGACTTCCATCAAGCTATACATACCCTTCTCTCCAAGTCGCTGCCTTGCA

Y Q I E E L M I L L E Y K I P R N E A D
TACCAGATAGAGGAGTTAATGATACTCCTGGAATACAAGATCCCCGCCAATGAGGCTGAT

G M P I N V G D G G L F E K K L W G L K
GGGATGCCCTATTAA TGTTGGAGATGGTGGTCTCTTTGAGAAGAAGCTGTGGGCCCTAAAG

V L Q E L S Q W T V R S I H D L R F I S
GTGCTGCAGGAGCTTTCACAGTGGACAGTAAGGTCCATCCATGACCTTCGTTTCATTTCT

S H Q T G I P A R G S H Y I A N N K K M
TCTCATCAGACTGGGATCCCAGCACGTGGGAGCCATTATATTGCTAACACAGAAAATG

TAGCAGTTAGTCCCCTTCTCTCTTACTTTCTCTTCTTAATGGAATATGCGTAGTT

Fig.8 a
(təşinys)

Plyšys Svoris:3.000
 Ilgis Svoris:0.100

Vidutinė pora:0.540
 Vid. mšeri pora:0.396

Kokybė: 264.5
 Santykis:1.323

Ilgis:200
 Plyšiai:0

Procentinis

Procentinis

panašumas:89.500

identifikumas:84.000

Naujas pep x Rcntf. Pep

Spalio 13, 1989 07:57

žmogaus	1	MAFTEHSPLTPHRRDLCSRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINL	50
žiurkės	1	MAFAEQTPLTLHRRDLCSRSIWLARKIRSDLTALMESYVKHQGLNKNINL	50
žmogaus	51	DSADGMPVASTDQWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTP	100
žiurkės	51	DSVDGVPVASTDRWSEMTAERLQENLQAYRTFQGMMLTKLLEDQRVHFTP	100
žmogaus	101	TEGDFHQAIHTLLQVAAFAYQIEELMILLEKIPRNEADGMPINVGDDG	150
žiurkės	101	TEGDFHQAIHTLMLQVSAFAYQLEELMVLLEQKIPENEADGMPATVGDGG	150
žmogaus	151	LEFKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRFISSHQTGIPARGSHYIANNKKM	200
žiurkės	151	LEFKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRVISSHQMGISALESHYGAKDKQM	200

Fig. 8b

Plyšys Svoris:5.000
Ilgis Svoris:0.100

Vidutine pora:1.000
Vid. mēri pora:0.000

Kokybe: 606.4
Santykis:0.775

Ilgis:1146
Plyšiai:2

Procentinis

Procentinis

panašumas:84.175

identifikumas:84.175

Žmogaus.Sek x Cntf. Sek

Spalio 24, 1989 07:05

žmogaus	1	GTGCACAATCCCATTAGTAGAGAAATGCCAGTGGGTTTAGTCCTTTGAGAGT	50
žiurkės	1	AGT	3
žmogaus	51	CACATCTCTTATTTGGACCAGTATAGACAGAAGTAAACCCAGCTGACTTG	100
žiurkės	4	CACATTTCTTATTTGGACTAGTGAAGACAGAAAGCAA.CCAGCTCACTTG	52
žmogaus	101	TTTCCTGGGACAGTTGAGTTAAGGGATGGCTTTCACAGAGCATTACCCG	150
žiurkės	53	TGTCCTGGGACAGTTGATTTAGGGGATGGCTTTCGACAGCAAACACCTC	102
žmogaus	151	TGACCCCTCACCCGTCGGGACCTCTGTAGCCGCTCTATCTGGCTAGCAAGG	200
žiurkės	103	TGACCCCTTACCCGCGGACCTCTGTAGCCGTTCTATCTGGCTAGCAAGG	152

Fig.8c

žmogaus	201	AAGATTGTTTCAGACCTGACTGCTCTTACGGAACTCTATGTGAAGCATCA	250
žlurkės	153	AAGATTGTTTCAGACCTGACTGCTCTTATGGAATCTTATGTAAAACATCA	202
žmogaus	251	GGGCTGAACAAGAACATCAACCTGGACTCTGCGGATGGGATGCCAGTGG	300
žlurkės	203	GGGCTGAATAAAAAATATCAACCTTGACTCAGTGATGGTGTACCAGTGG	252
žmogaus	301	CAAGCACTGATCAGTGGAGTGAGCTGACCGAGGCAGCGACTCCAAGAG	350
žlurkės	253	CAAGCACTGATCGTTGGAGTGAGATGACTGAGGCAGCGACTCCAAGAG	302
žmogaus	351	AACCTTCAAGCTTATCGTACCTTCCATGTTTGTGGCCAGGCTCTTAGA	400
žlurkės	303	AACCTCCAGGCTTACCGTACCTTCCAAGGGATGTTAACCAAGCTCTTAGA	352
žmogaus	401	AGACCAGCAGGTGCATTTTACCCCAACCGAAGGTGACTTCCATCAAGCTA	450
žlurkės	353	AGACCAGAGAGTACATTTACCCCAACTGAAGGTGACTTCCATCAGGCAA	402
žmogaus	451	TACATACCCCTTCTCTCCAAGTCGCTGCCTTTGCATACCAGATAGAGGAG	500
žlurkės	403	TACATACTCTTATGCTCCAAGTTTCTGCCTTTGCCTACCAGCTAGAGGAG	452

Fig. 8c (tęsinys)

140

· hCNTF DNA -> Pilnas restrikcijos žemėlapis

DNR seka 782 b.p. GTGCACAATCCC ... ATATGCGTAGTT Tiesinis

· Restrikcijos endonukleazės saity pozicijos

(unikalo saita pabraukti)

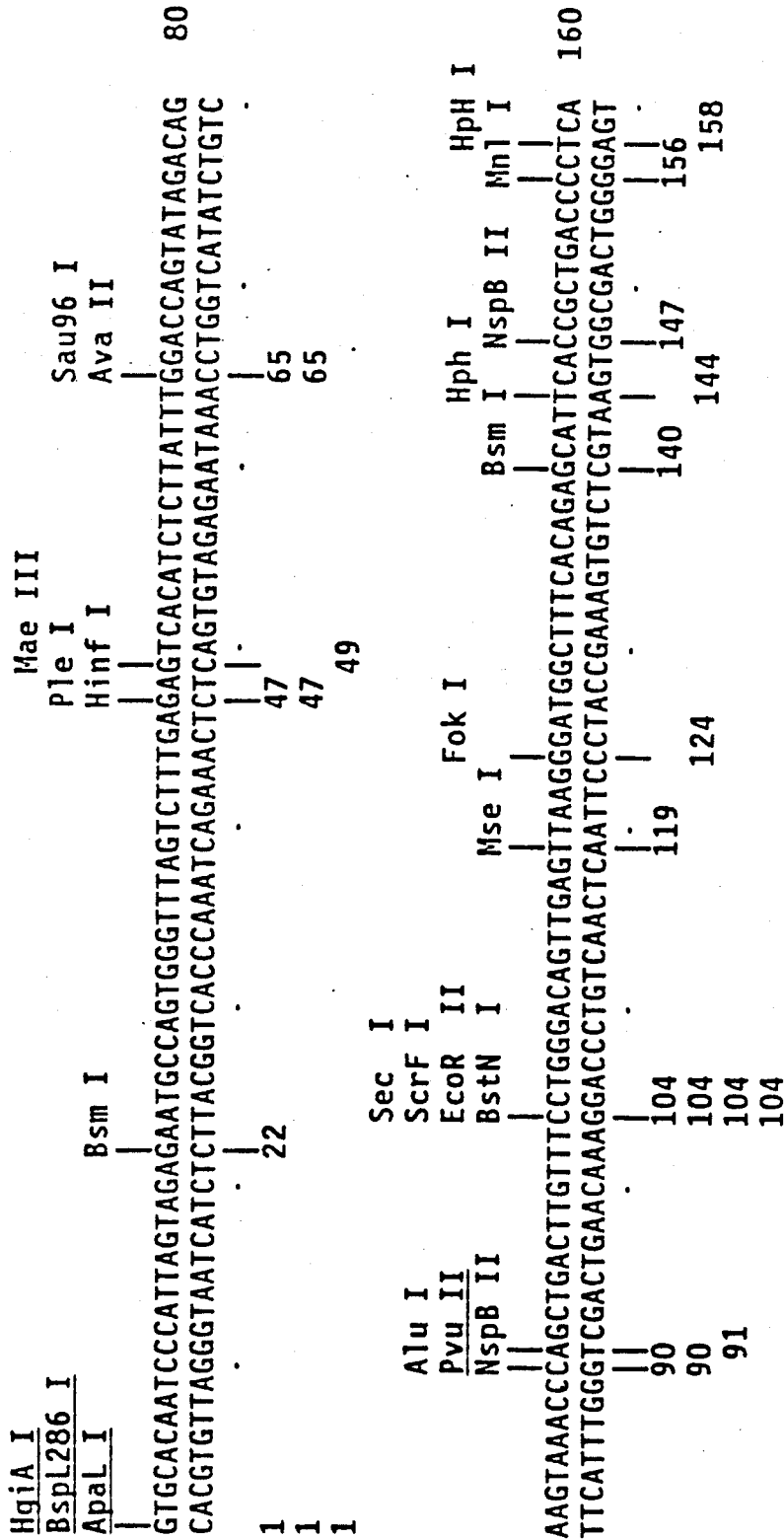


Fig. 8d

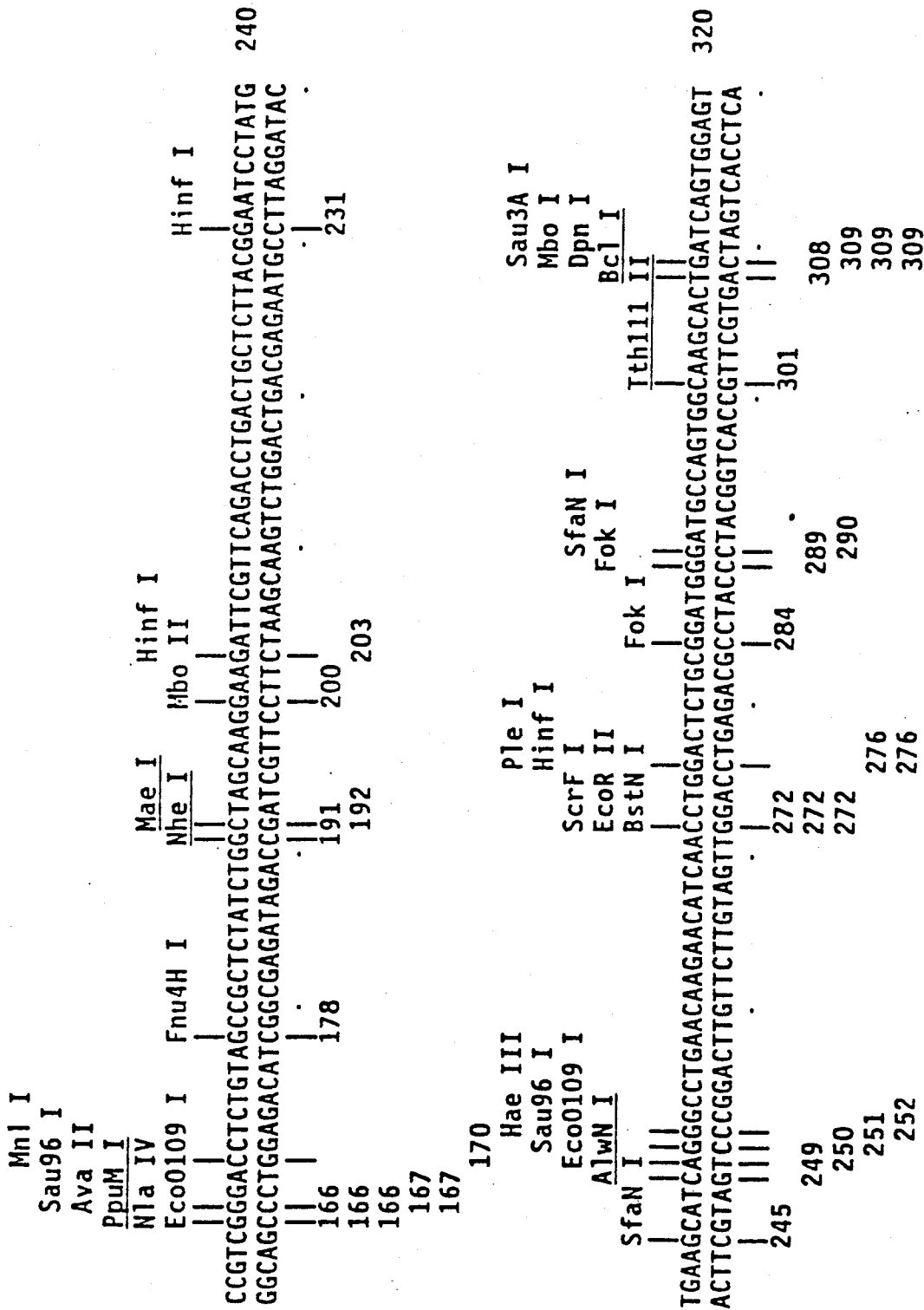


Fig. 8d (tęsinys)

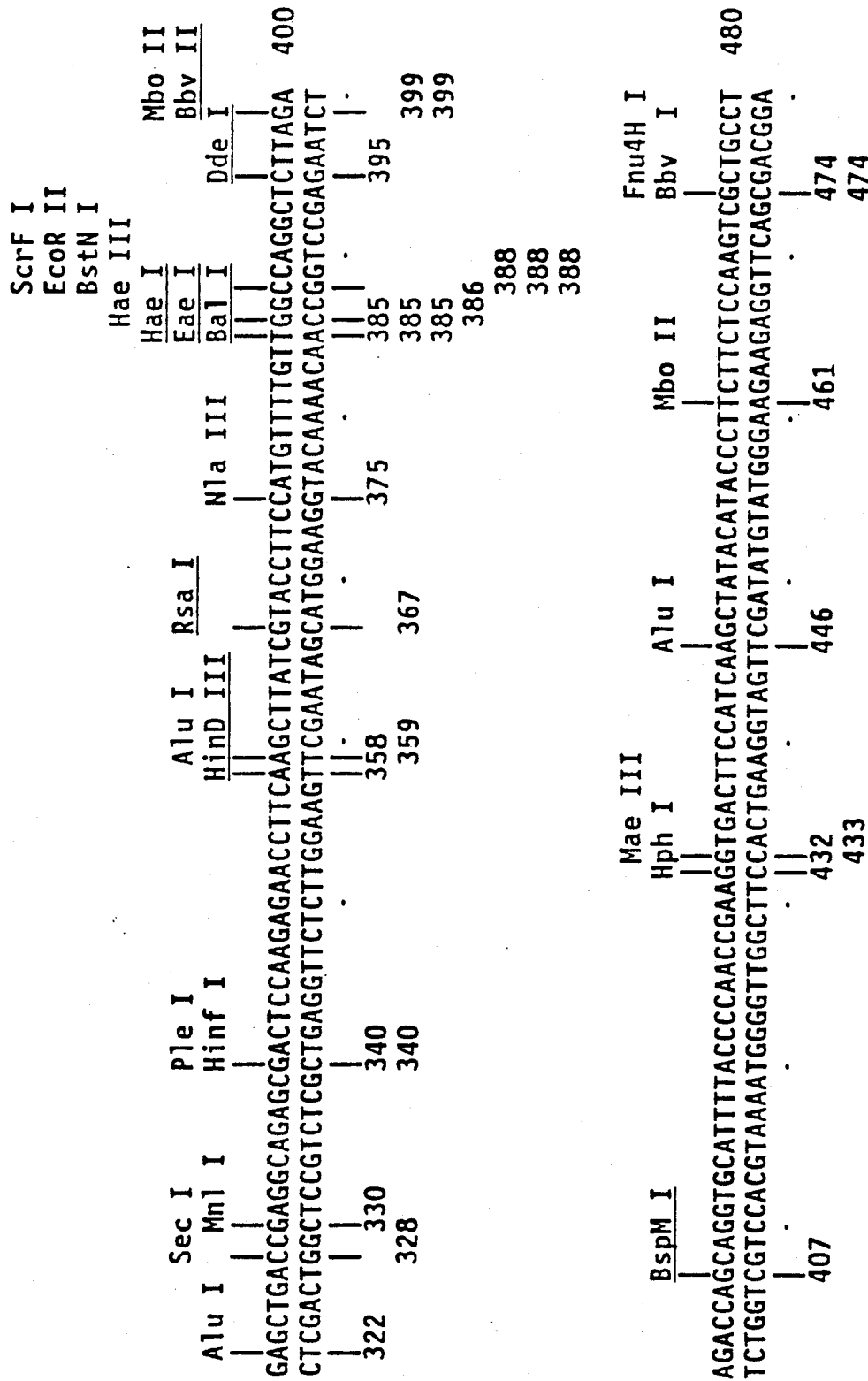


Fig. 8d (tęśnys)

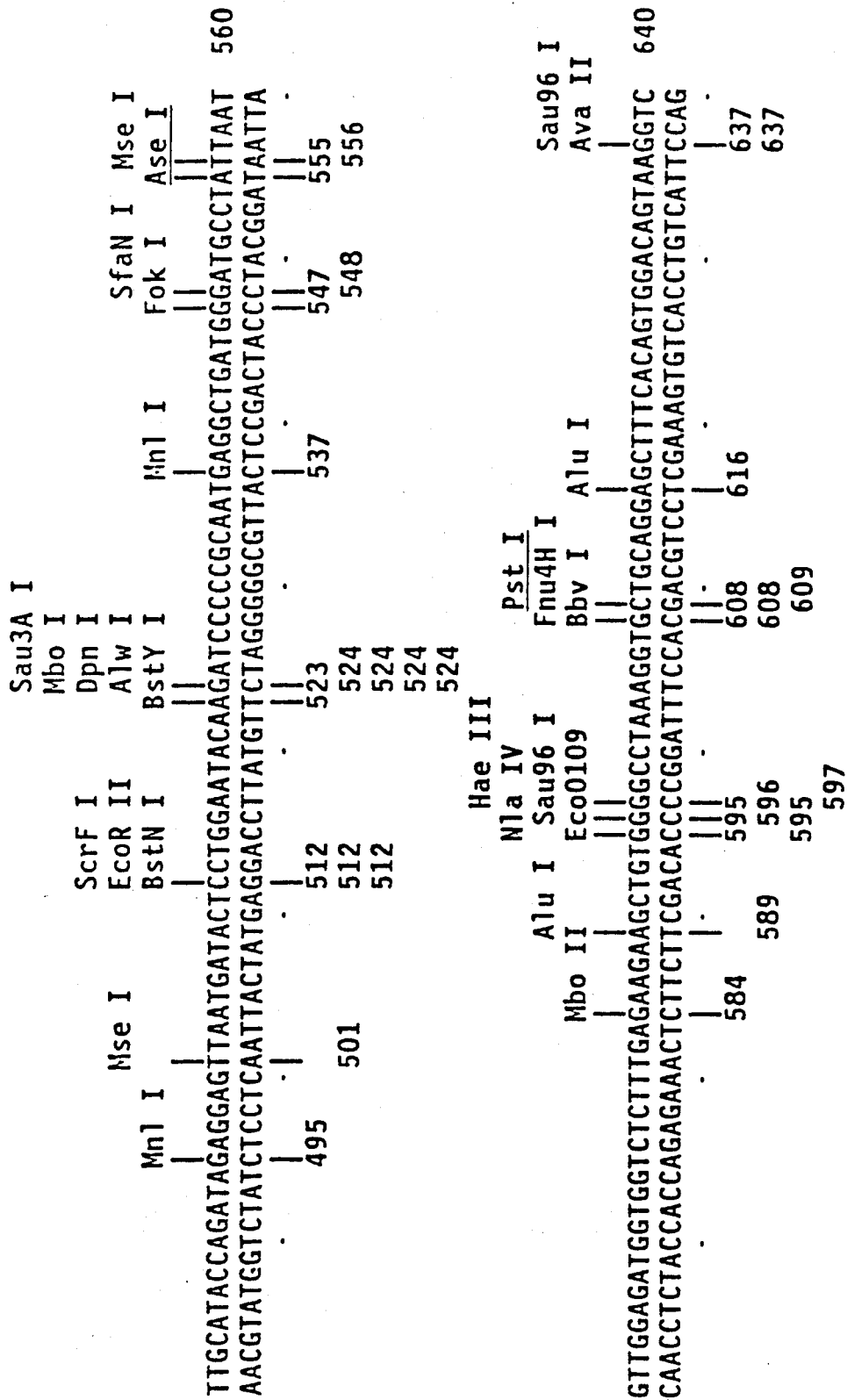


Fig. 8d (tēsinyys)

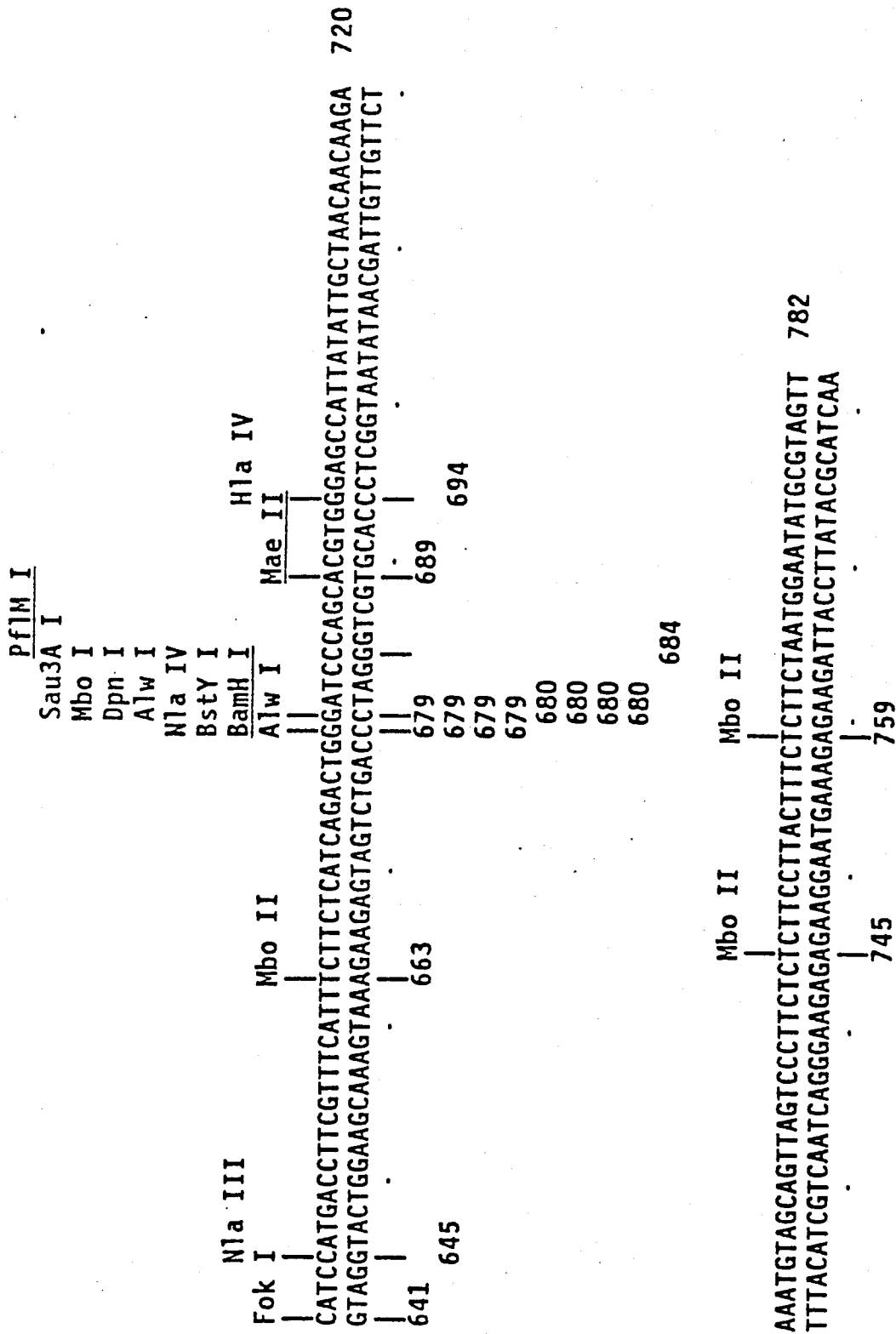


Fig. 8d (tesinys)

25/68

145

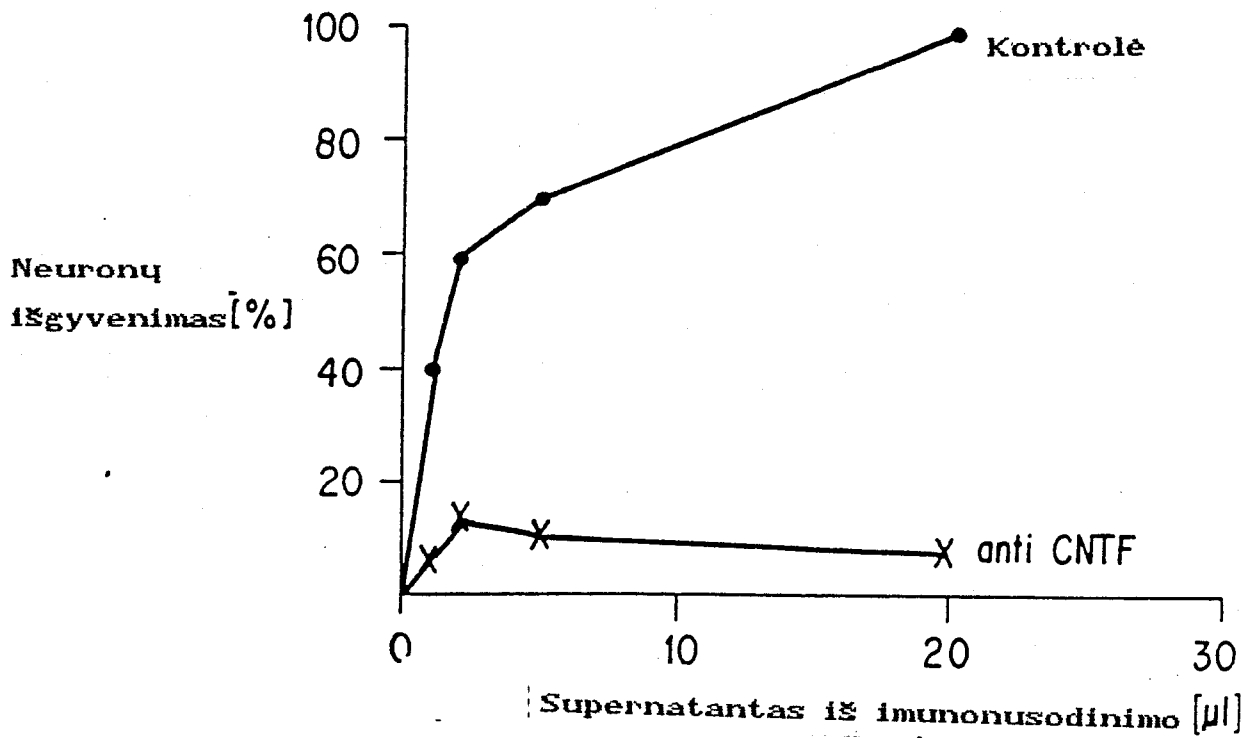


Fig. 9 brėž.

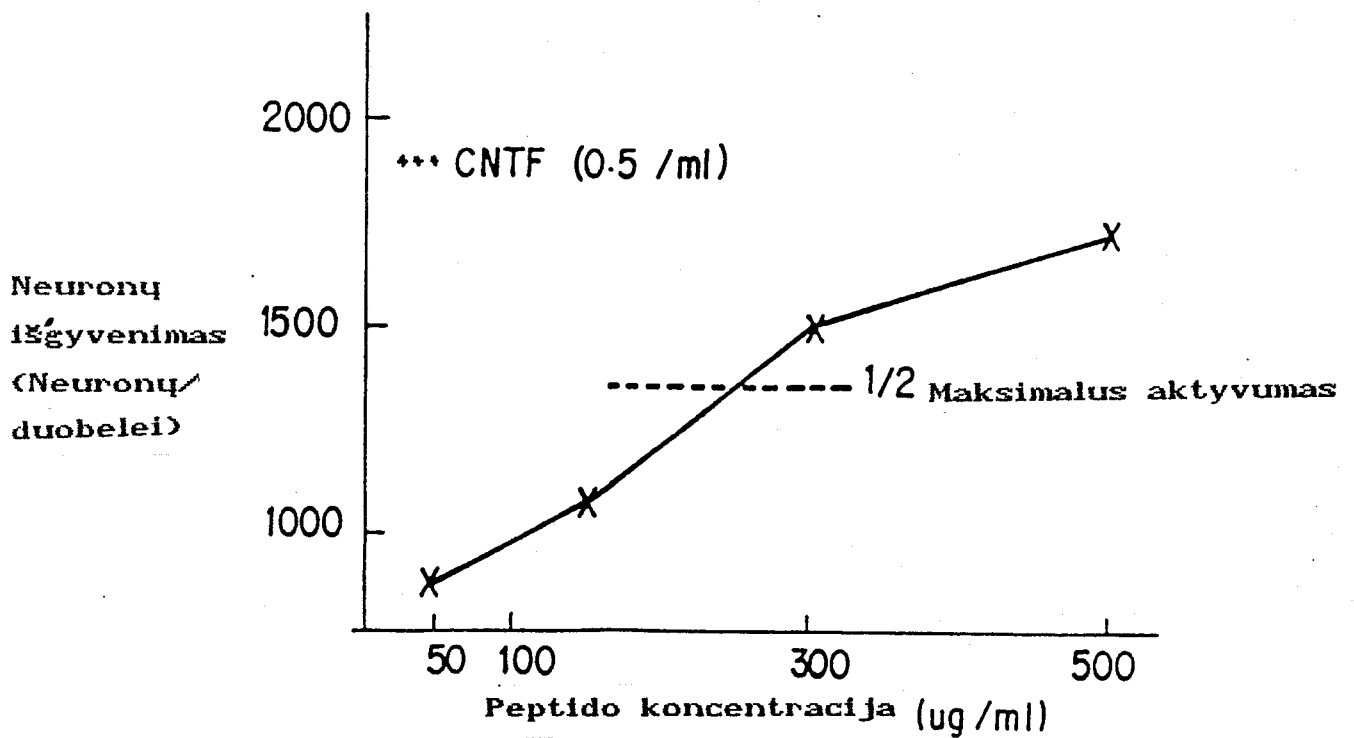


Fig. 10



Fig. 11 bréž.

27/68

147

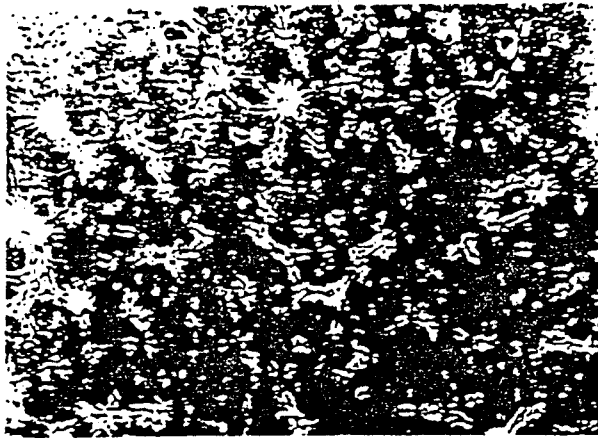


Fig. 12c

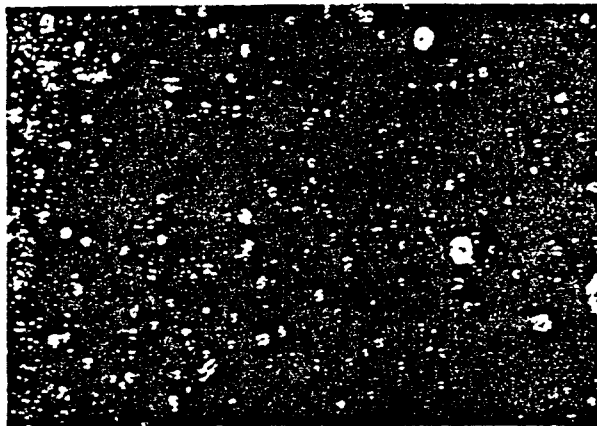


Fig. 12b

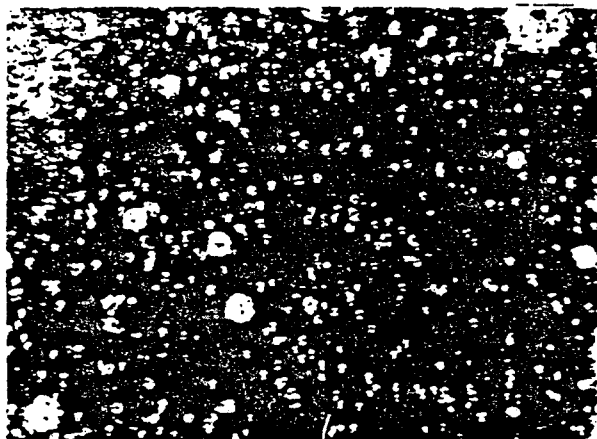


Fig. 12a

28 / 68

Fig.13a



Fig. 13b

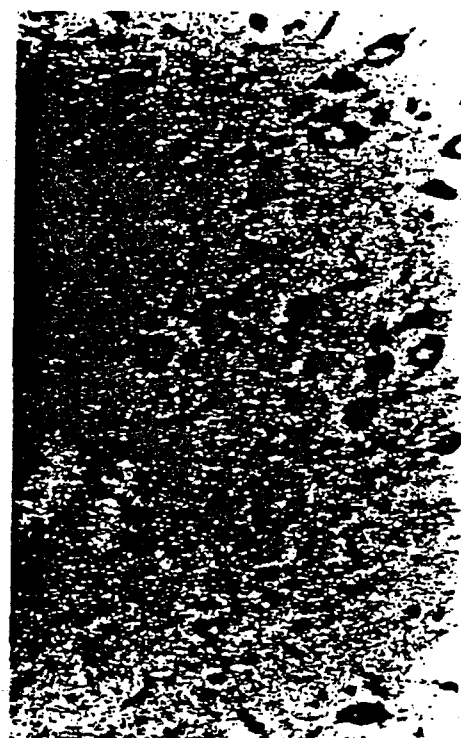


Fig.13c

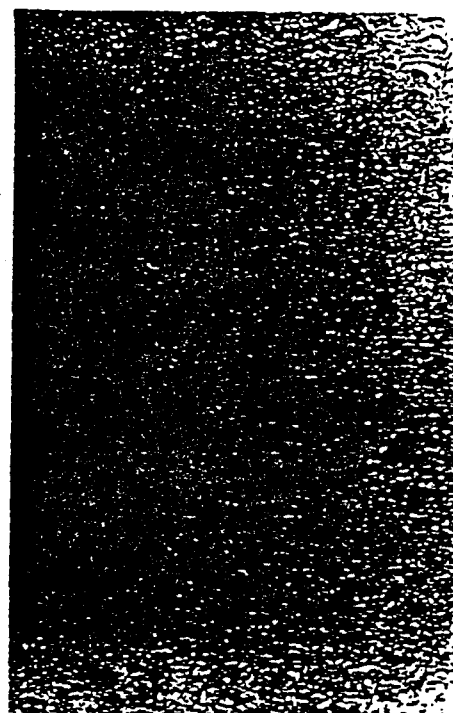


Fig. 13d

29/68

148

Fig. 14a



Fig. 14b



Fig. 14c

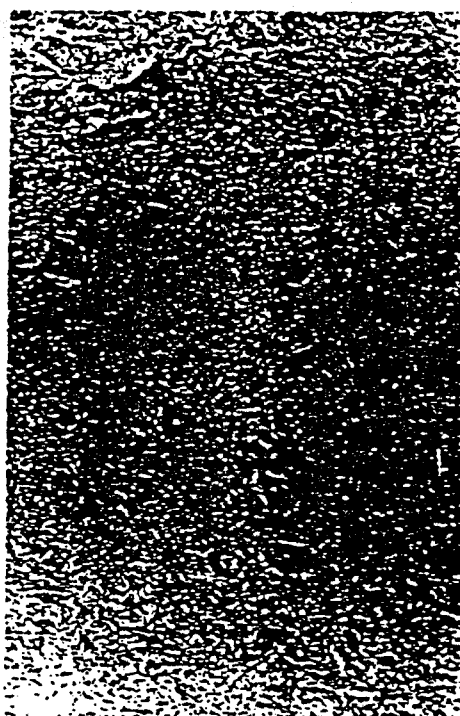


Fig. 14d

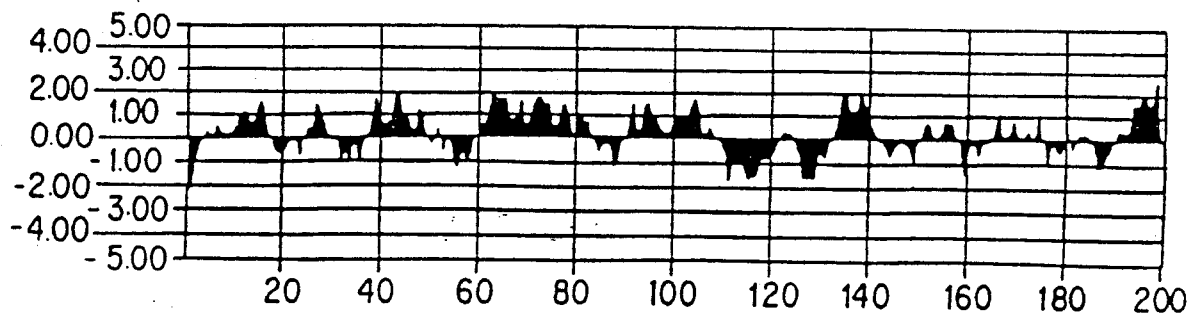
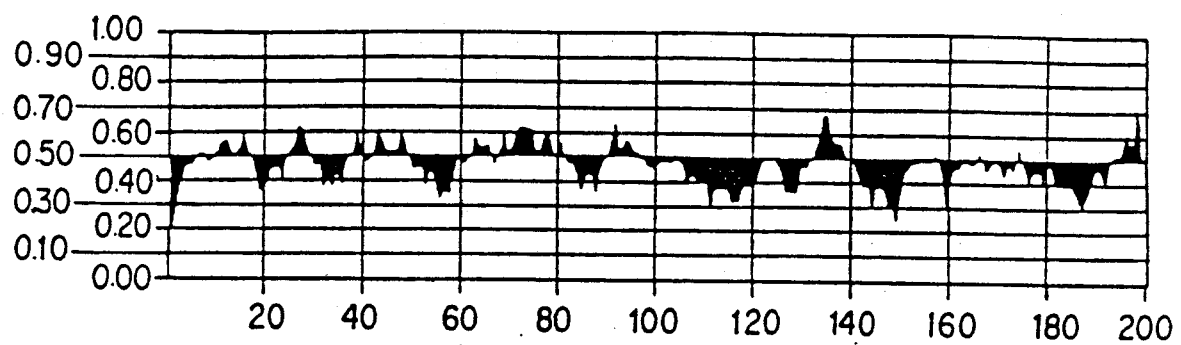
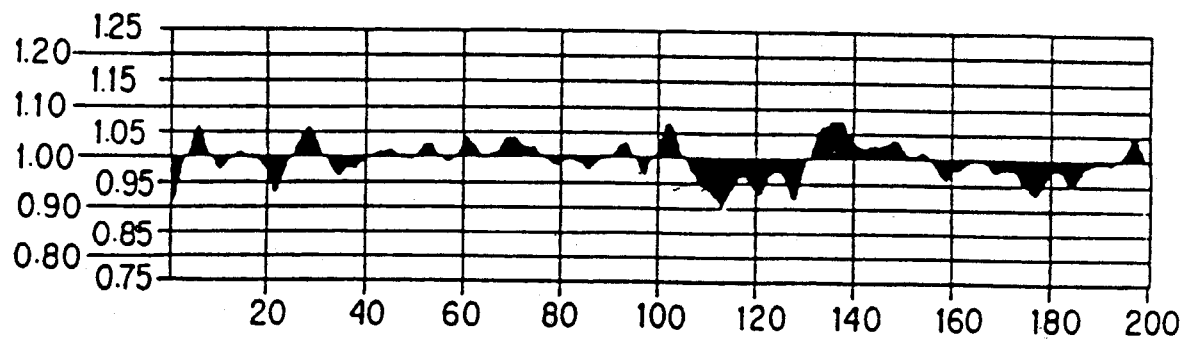
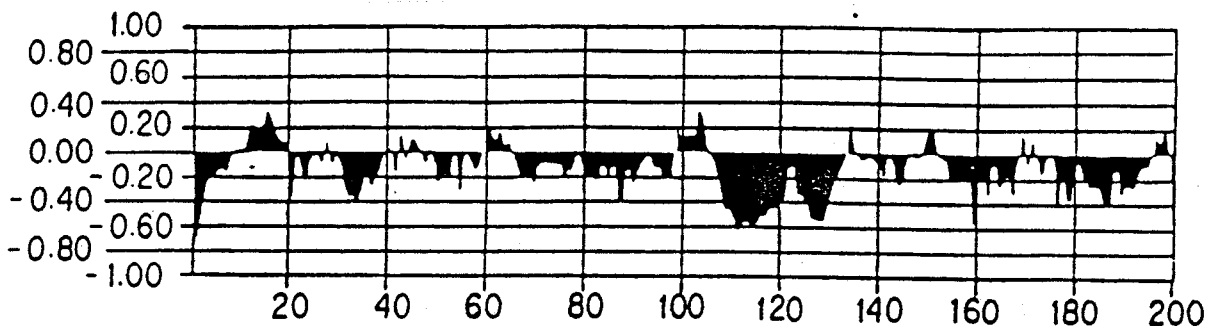
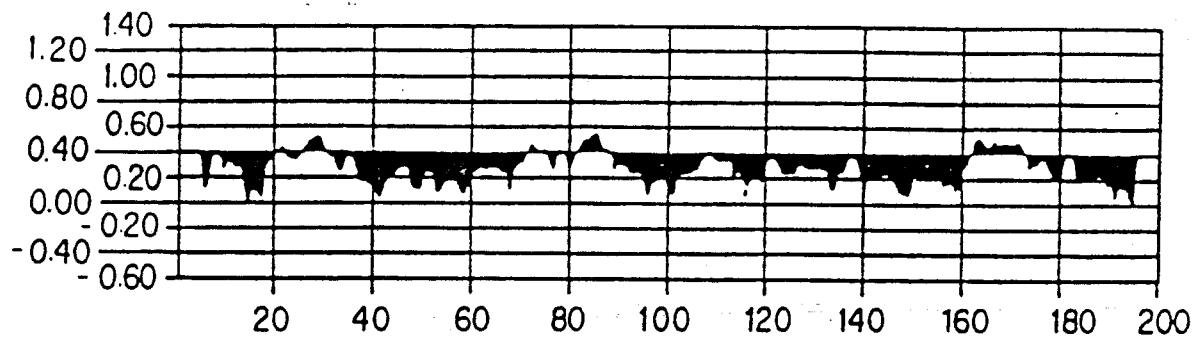
Hidrofiliškumas**Paviršinė tikimybė****Lankstumas**

Fig. 15a

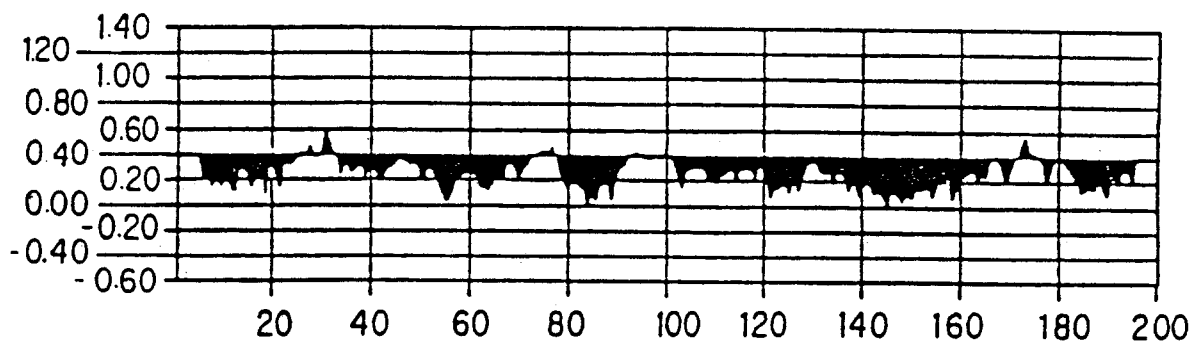
Antigeninis indeksas



Amfifilinis heliksas



Amfifilinis gabalas



Antrinė struktūra

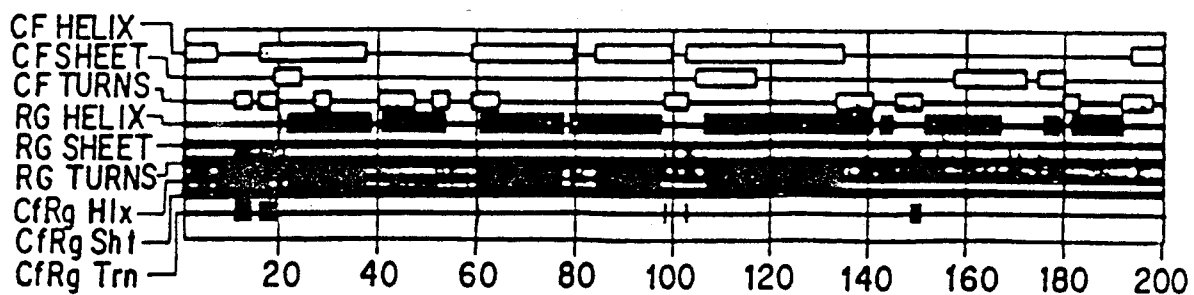
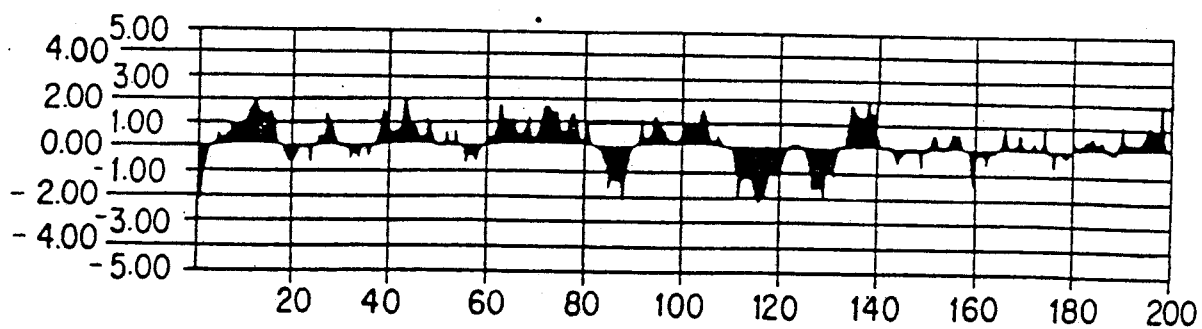


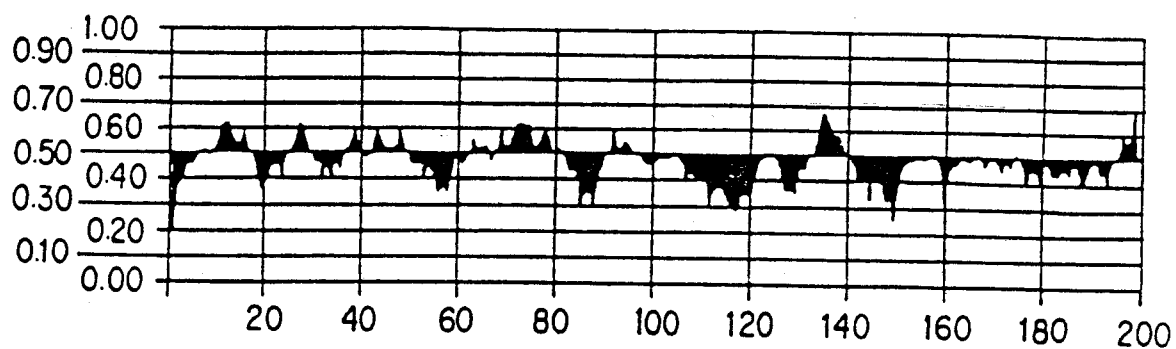
Fig. 15a (tęsinys)

32/68

Hidrofiliškumas



Paviršinė tikimybė



Lankstumas

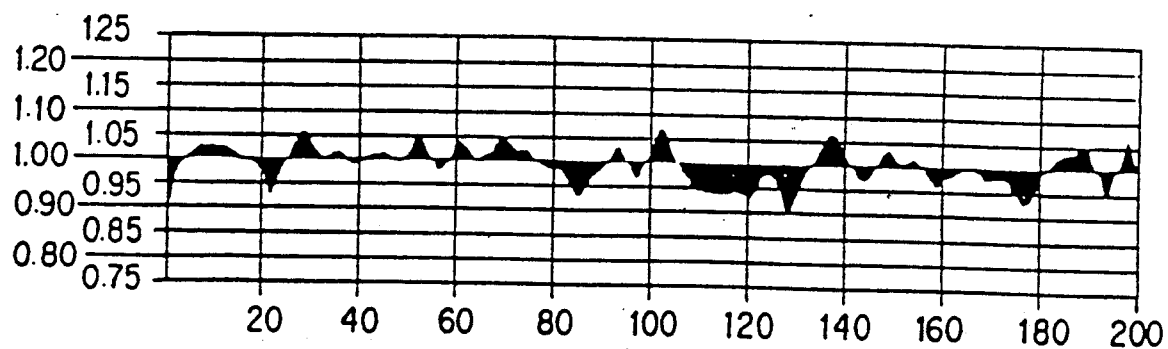
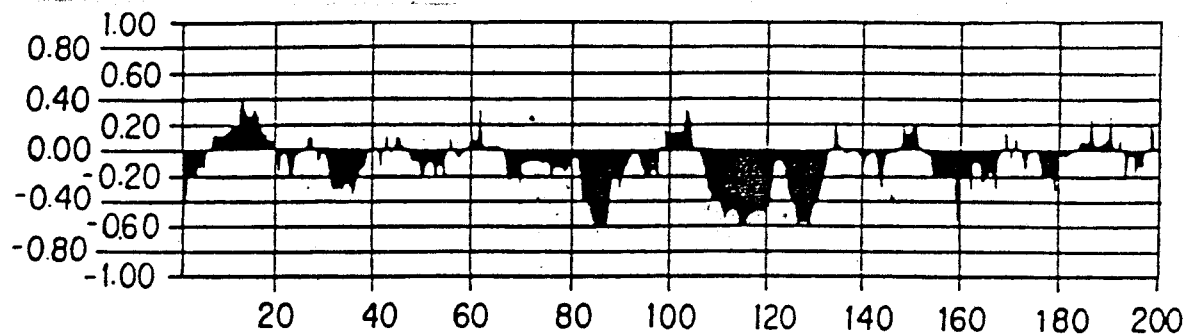
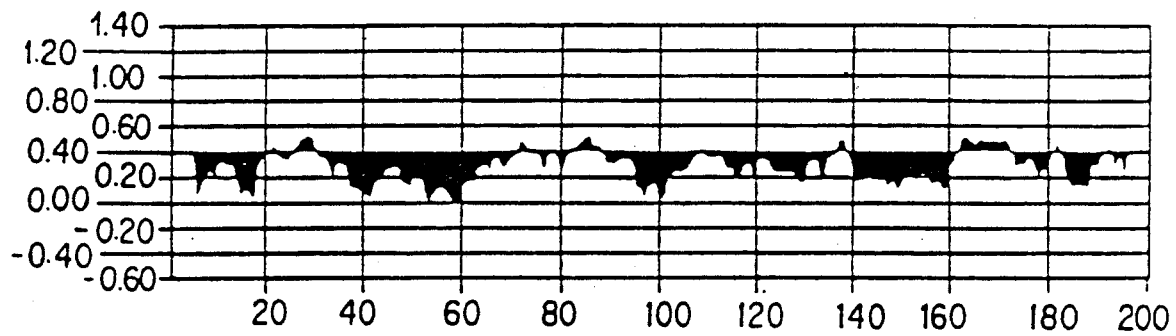


Fig. 15b

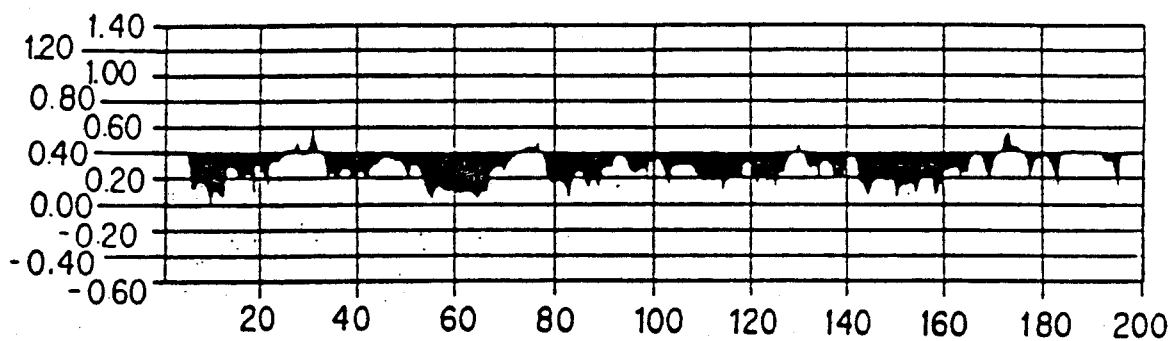
Antigeninis indeksas



Amfifilinis helksas



Amfifilinis gabalas



Antrinė struktūra

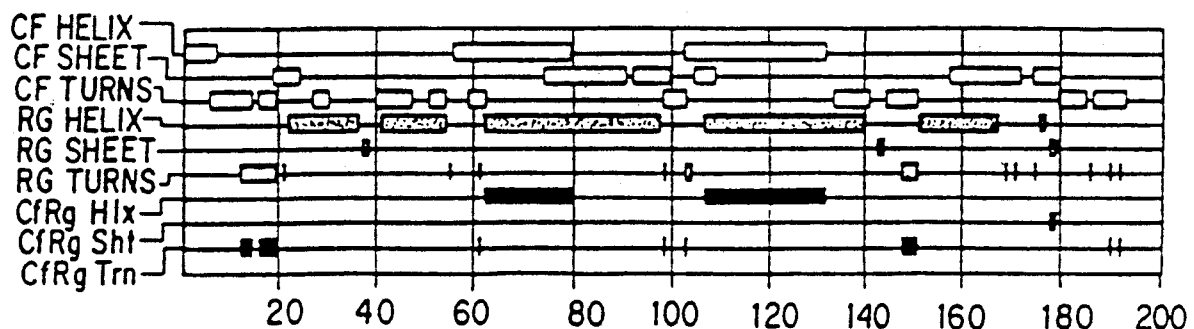


Fig. 15b (tęsinys)

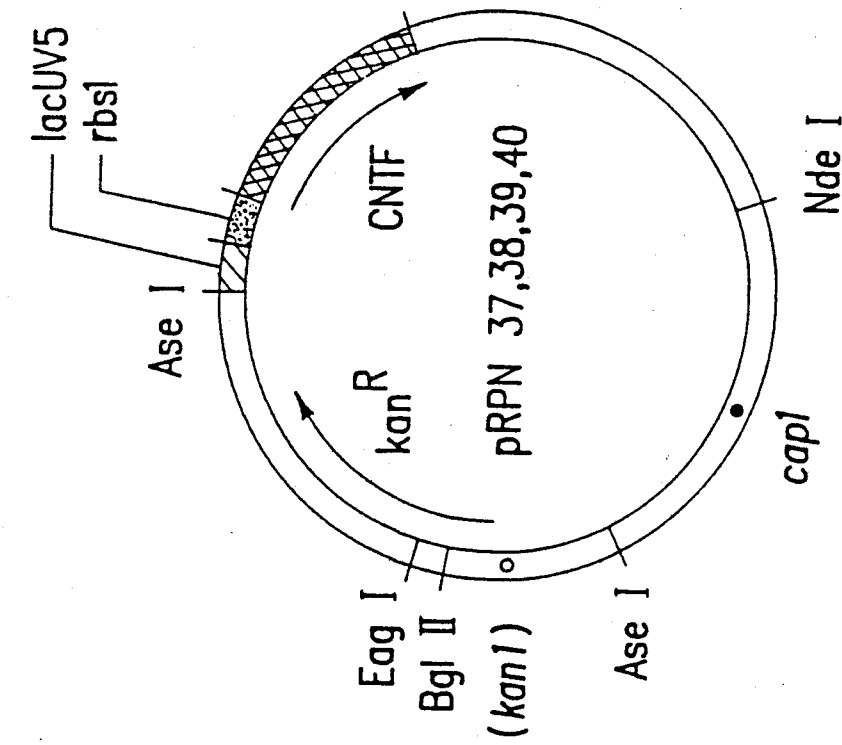


Fig. 16b

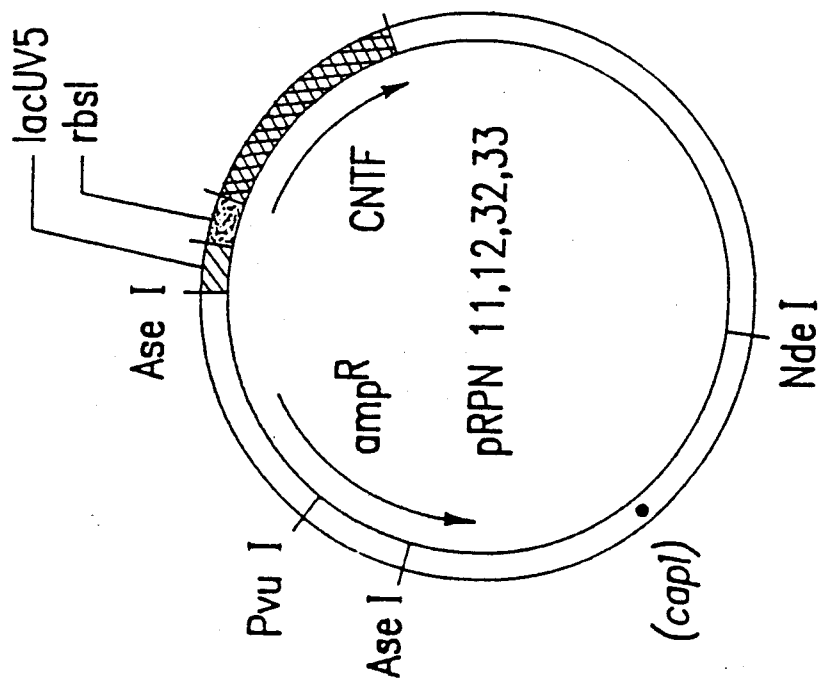


Fig. 16a

10 20 30 40 50 60

MetAlaPheThrGluHisSerProLeuThrPro
 TGTTTCCTGGGACAGTTGAGTTAAGGGATGGCTTTCACAGAGCATTCACCGCTGACCCCT

→

CNTF. 23

HisArgArgAspLeuCysSerArgSerIleTrpLeuAlaArgLysIleArgSerAspLeu
 CACCGTCGGGACCTCTGTAGCCGCTCTATCTGGCTAGCAAGGAAGATTTCGTCAGACCTG

[GTAAGTTGCCTATT...TGTATCCTCGGCCAG]

▼

ThrAlaLeuThrGluSerTyrValLysHisGlnGlyLeuAsnLysAsnIleAsnLeuAsp
 ACTGCTCTTACGGAAATCCTATGTGAAGCATCAGGGCCTGAACAAGAACATCAACCTGGAC

←

CNTF. 21

→

CNTF. 22

SerAlaAspGlyMetProValAlaSerThrAspGlnTrpSerGluLeuThrGluAlaGlu
 TCTGCGGATGGGATGCCAGTGGCAAGCACTGATCAGTGGAGTGAGCTGACCGAGGCAGAG

*****→

CNTF. 11

Fig. 17

155

ArgLeuGlnGluAsnLeuGlnAlaTyrArgThrPheHisValLeuLeuAlaArgLeuLeu
CGACTCCAAGAGAACCTTCAAGCTTATCGTACCTTCCATGTTTGTGGCCAGGCTCTTA

GluAspGlnGlnValHisPheThrProThrGluGlyAspPheHisGlnAlaIleHisThr
GAAGACCAGCAGGTGCATTTACCCCAACCGAAGGTGACTTCCATCAAGCTATACATACC

LeuLeuLeuGlnValAlaAlaPheAlaTyrGlnIleGluGluLeuMetIleLeuLeuGlu
CTTCTTCTCCAAGTCGCTGCCTTTGCATACCCAGATAGAGGAGTTAATGATACTCCTGGAA

TyrLysIleProArgAsnGluAlaAspGlyMetProIleAsnValGlyAspGlyGlyLeu
TACAAGATCCCCCGCAATGAGGCTGATGGGATGCCCTATTAAATGTTGGAGATGGTGCTC

<-----*****

CNTF.10

PheGluLysLysLeuTrpGlyLeuLysValLeuGlnGluLeuSerGlnTrpThrValArg
TTTGAGAGAAGCTGTGGGCCTAAAGTGCTGCAGGAGCTTTCACAGTGGACAGTAAGG

SerIleHisAspLeuArgPheIleSerSerHisGlnThrGlyIleProAlaArgGlySer
TCCATCCATGACCTTCGTTTCATTCTCTCATCAGACTGGGATCCCAGCACGTGGGAGC

HisTyrIleAlaAsnAsnLysLysMet

CATTATATTGCTAACACAACAAGAAATGTAGCAGTTAGTCCCTTCTCTTCTTCTTCTTC

<-----*-----*

CNTF.24

Fig. 17 (tesinys)

156



Fig. 18b

Fig. 18a

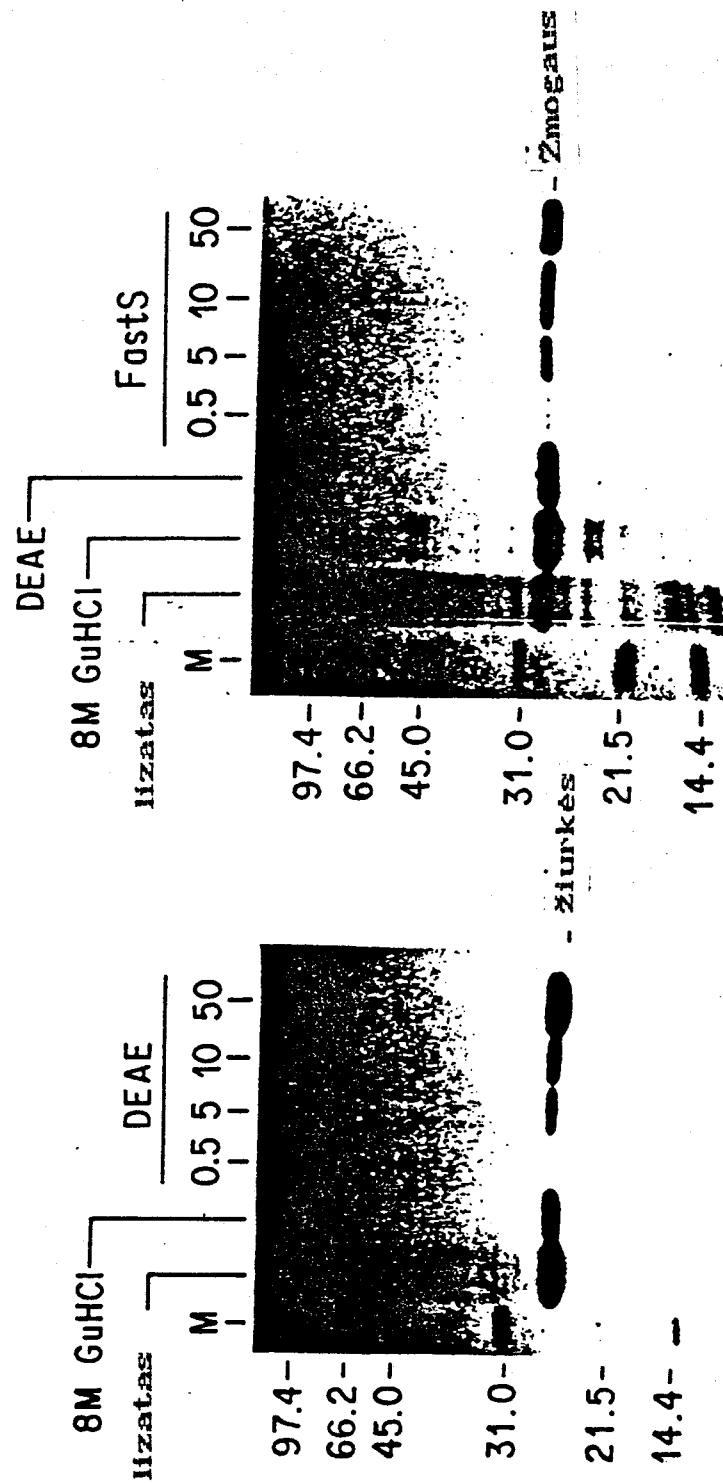


Fig. 19a

Fig. 19b

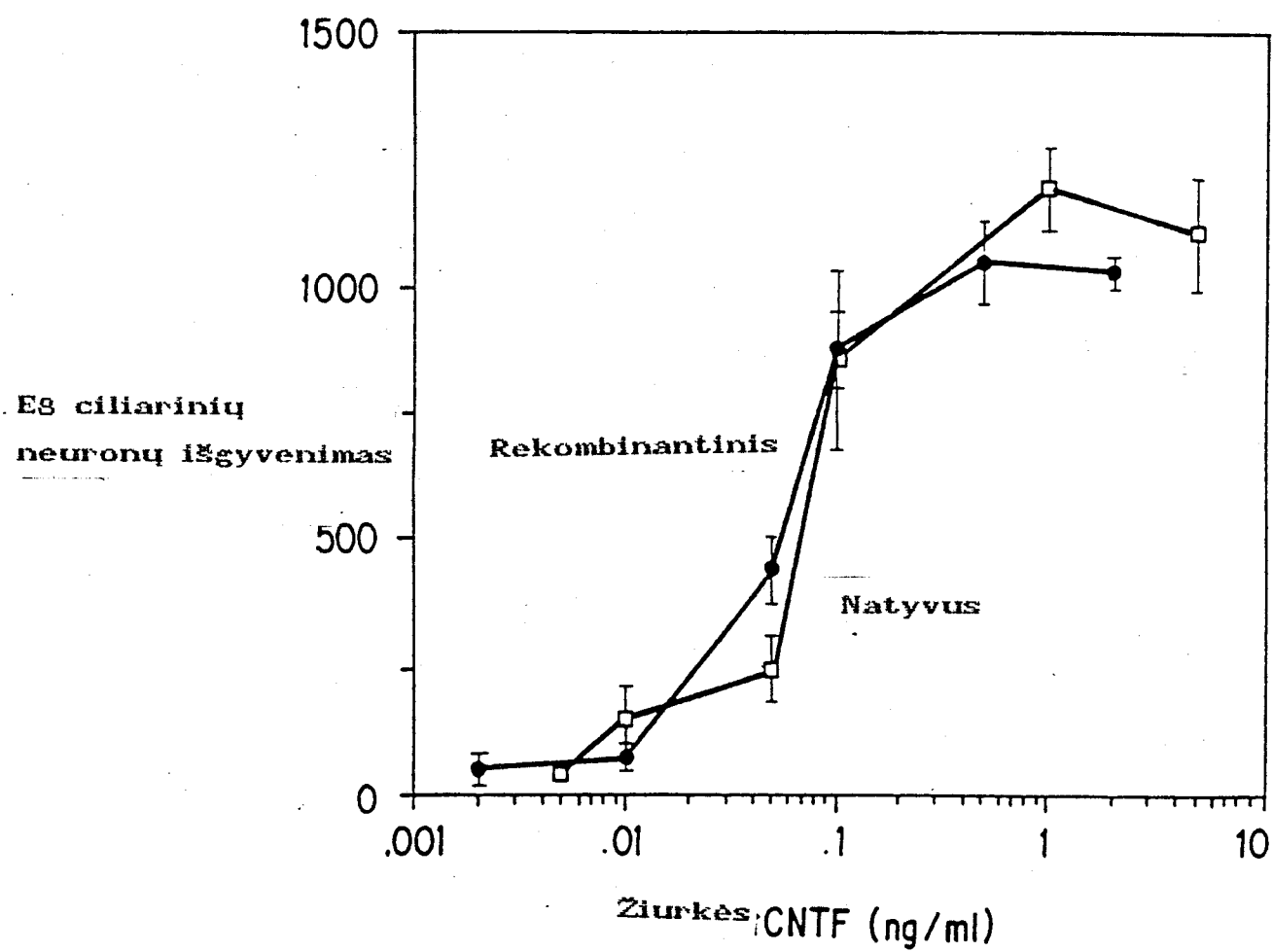


Fig. 20 brėž.

40/68

160

Fig. 21 a .



Fig. 21 b .

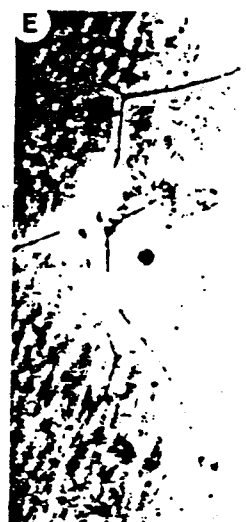
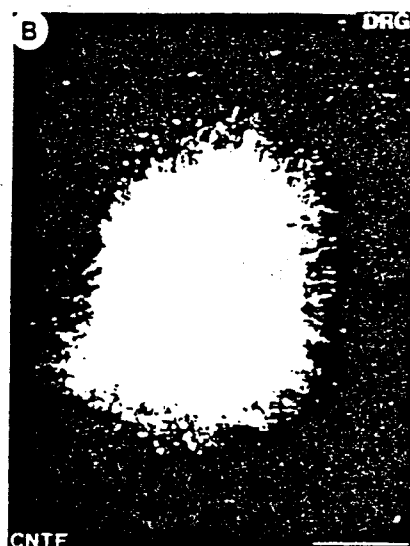


Fig. 21 c

Fig, 21 d

Fig. 21 e

A.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
NAFTEHSP	LT	PH	RD	LC	SR	SI	WL	AR	KI	RS	DL
TA	LT	ES	YV	KH	QGL	NK	NI	LD	SA	DG	MP
VA	ST	DQ	WS	EL	EA	RL	QEN	LQ	AY	RT	FH
VLL	AR	LL	ED	QQ	VH	FT					
..A.QT	..L	..M	..V	..V	..R	..M	..QGM	..TK	..R	..R	..R
M..A	..E	..T	..V	..V	..M	..IM	..IM	..IM	..IM	..IM	..IM

[illegible]

B.

[illegible]

.....	108
.....	109
.....	59
..... <i>rreagwpspl</i>	112
.....	12
..... <i>N</i>	65
.....	82

Fig. 22

42/68

162



Fig. 23

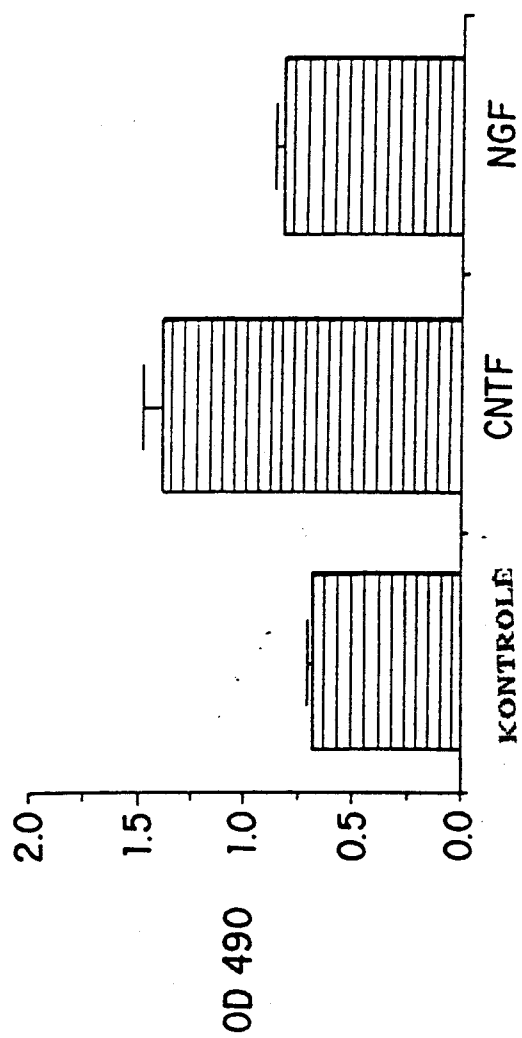


Fig. 24

64

44/68

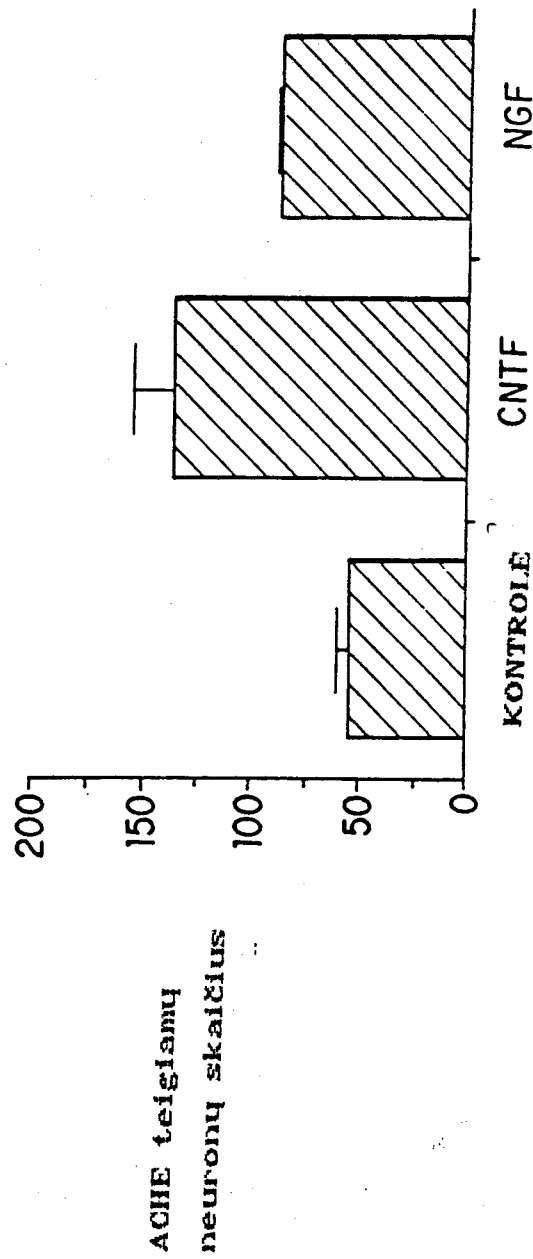


Fig. 25

45/68

166

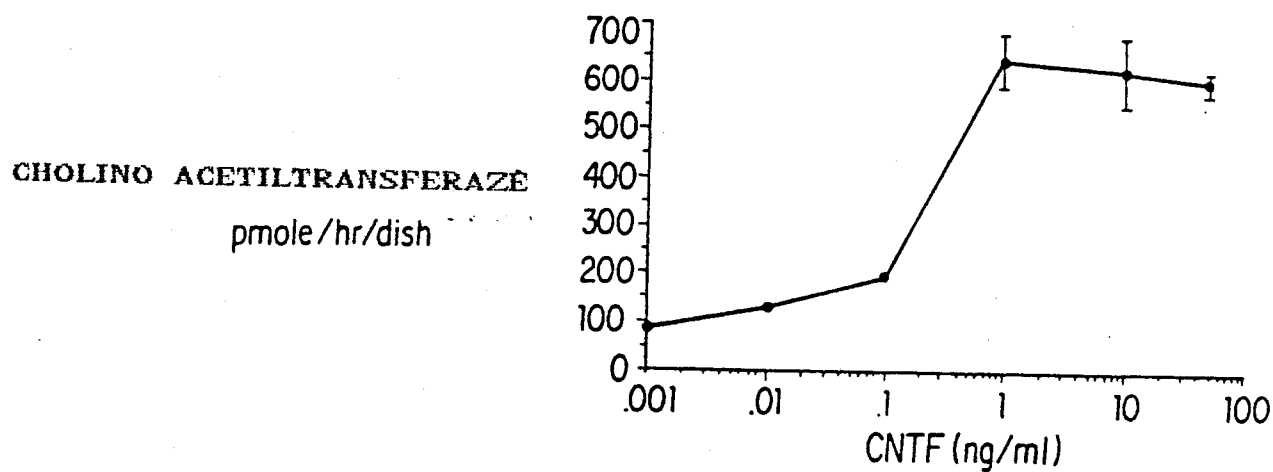


Fig. 26b

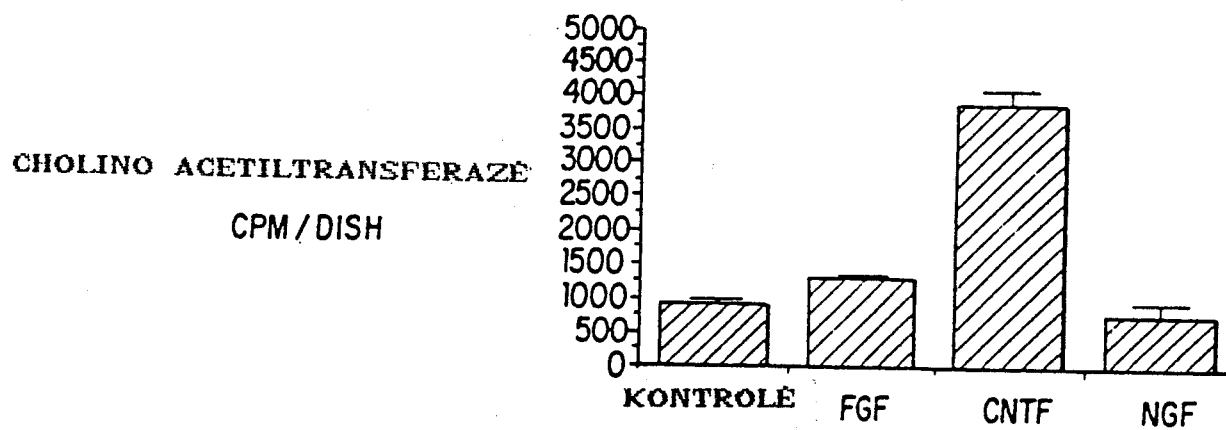


FIG. 26A

161

46/68

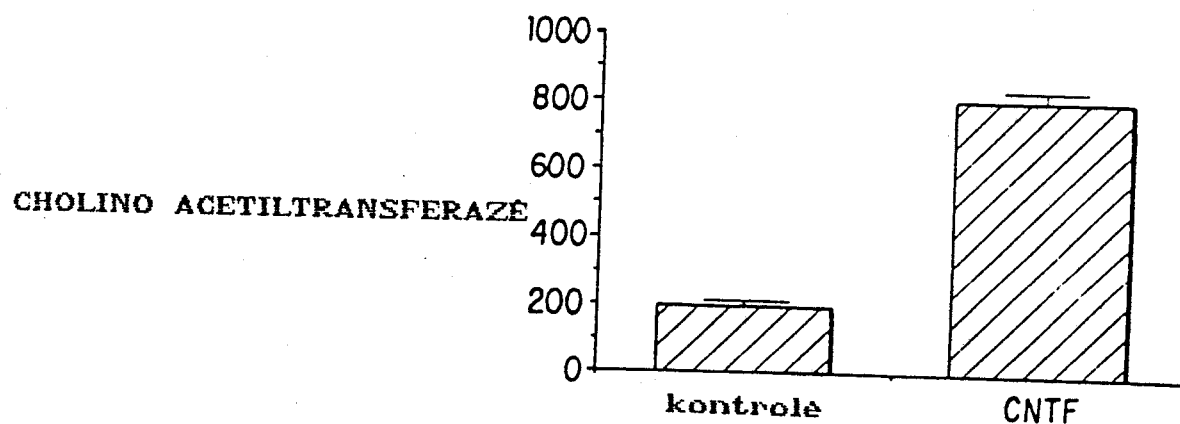


Fig. 27a

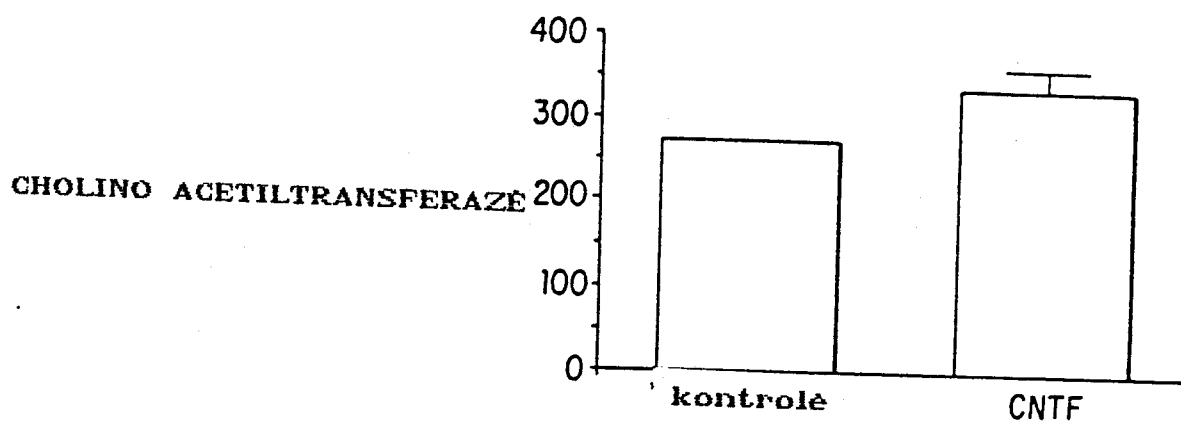


Fig. 27b

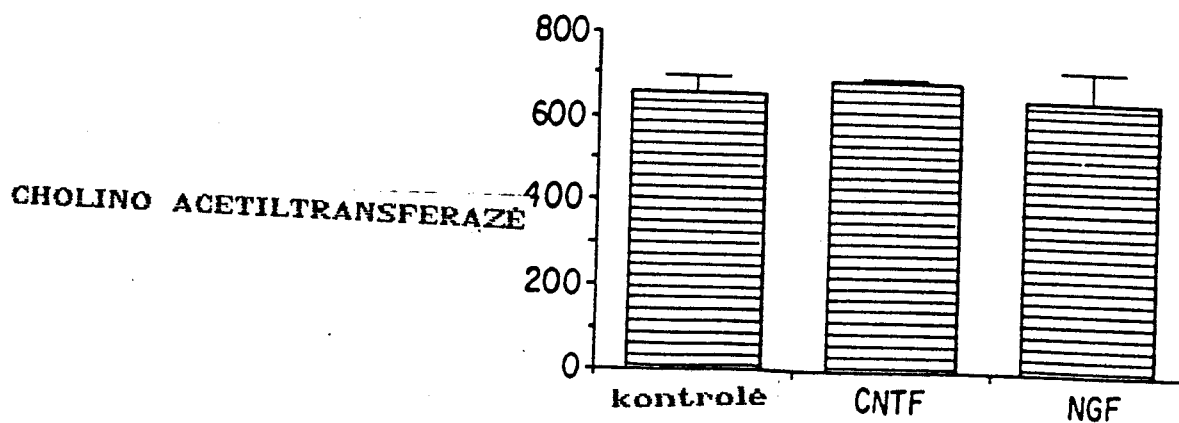


Fig. 27c

167

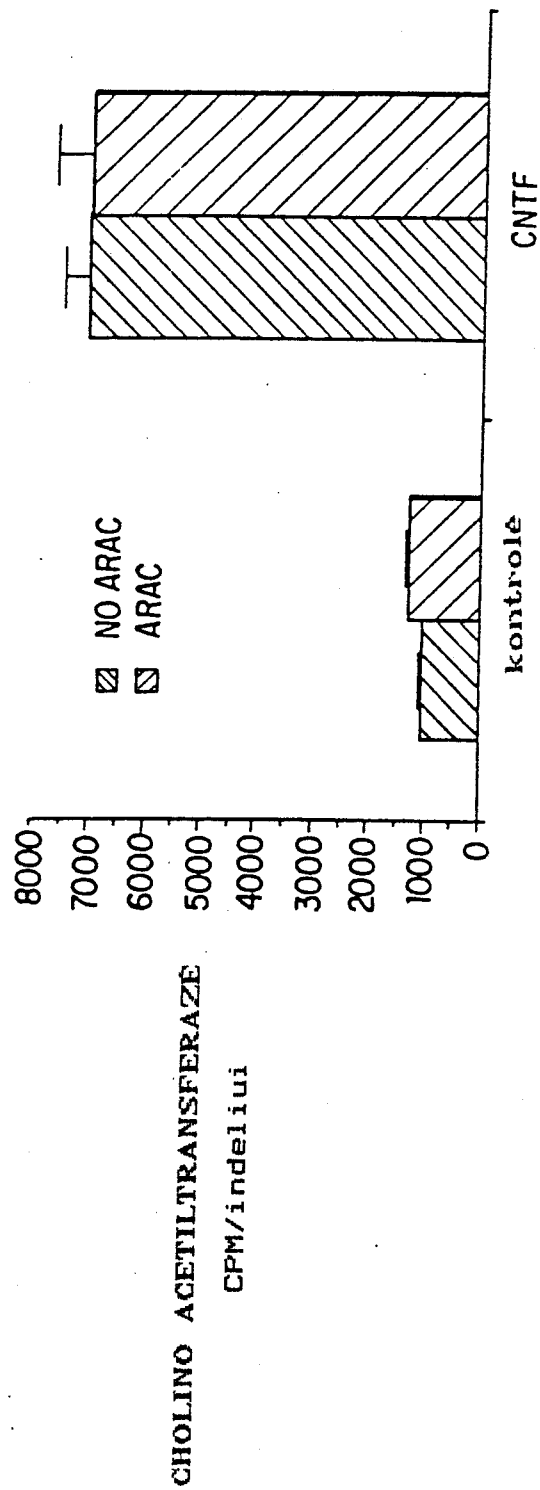


Fig. 28

168

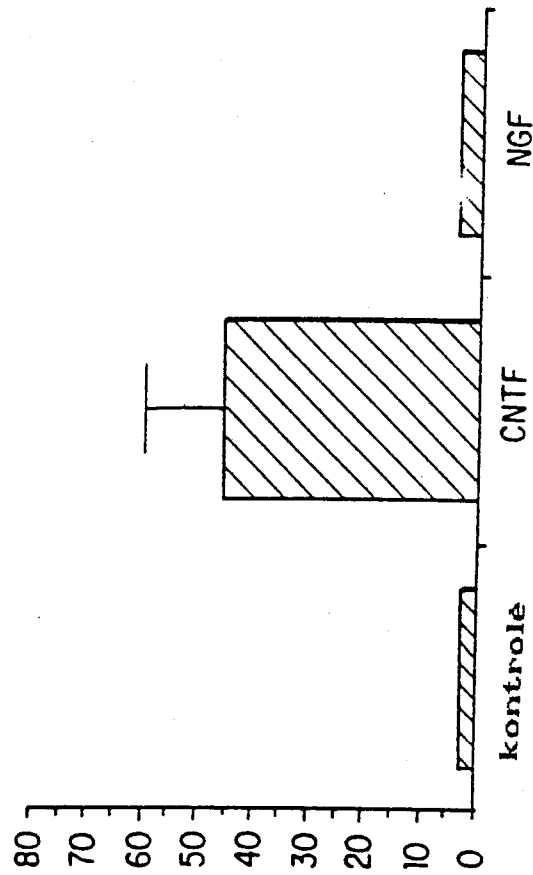


Fig. 29

CHOLINO ACETILTRANSFERAZE
PMOL/HR/duobelei

168

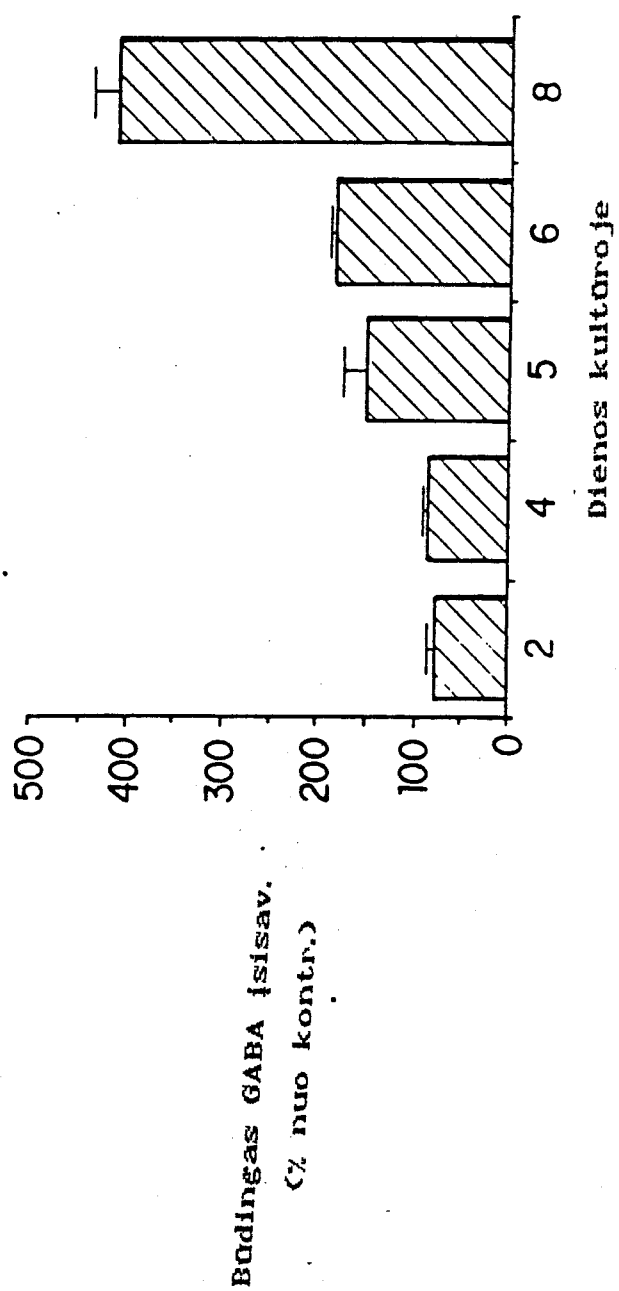


Fig. 30a

50/68

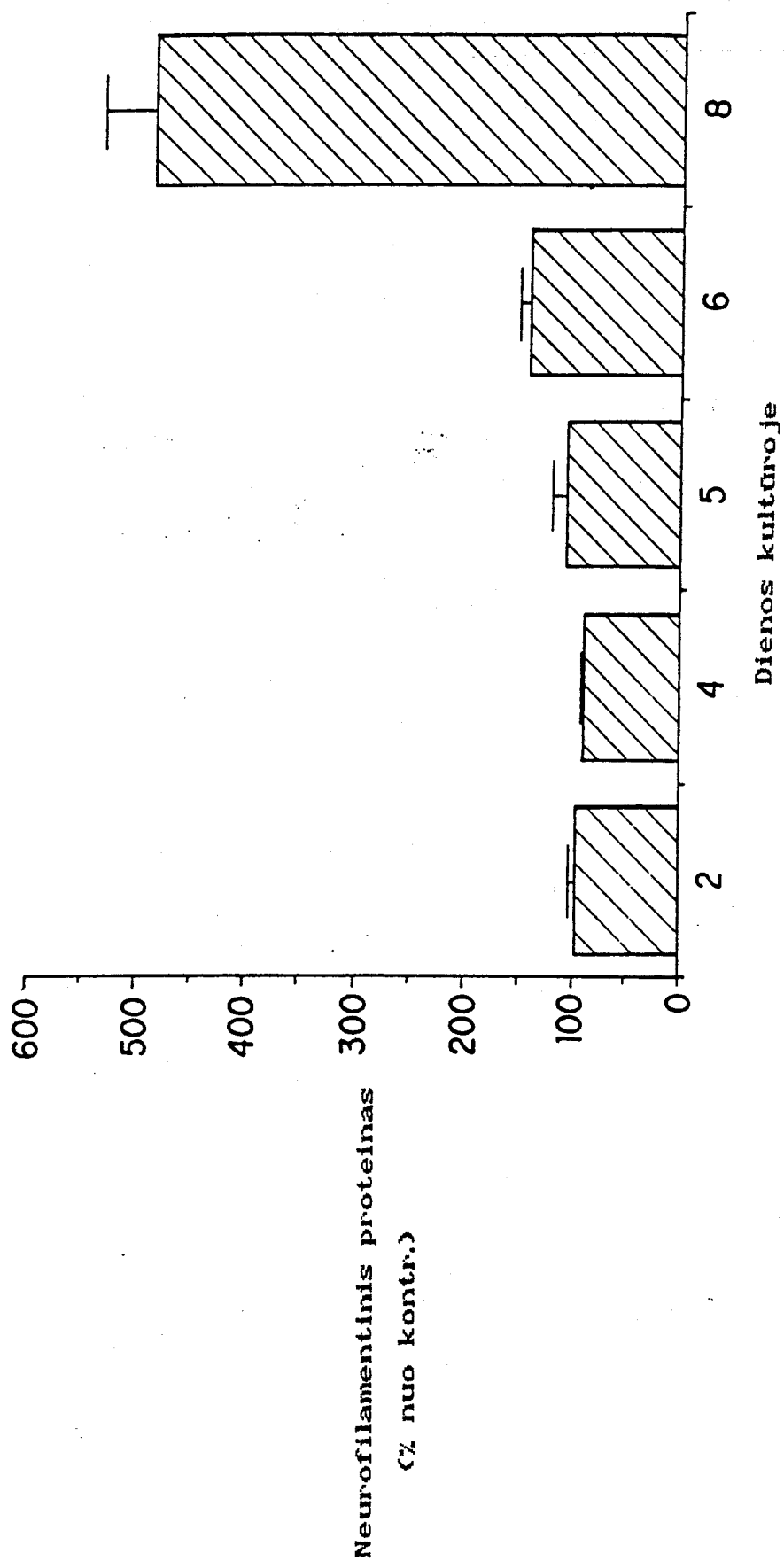


Fig. 30b

OR

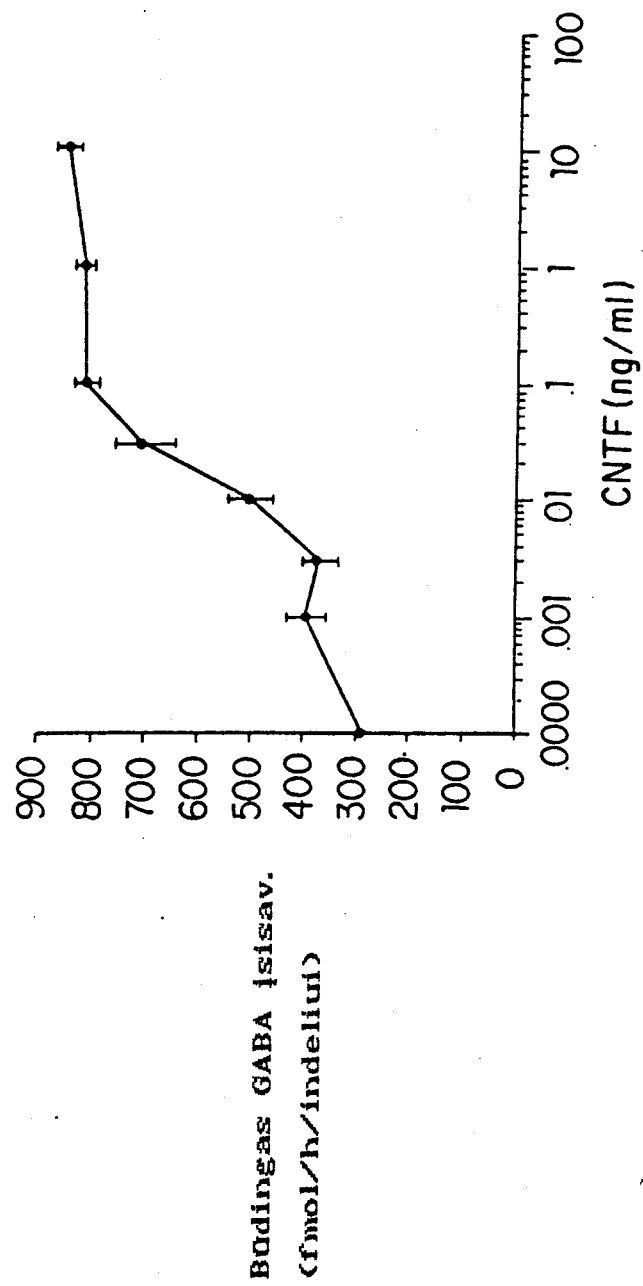


Fig. 31a

172

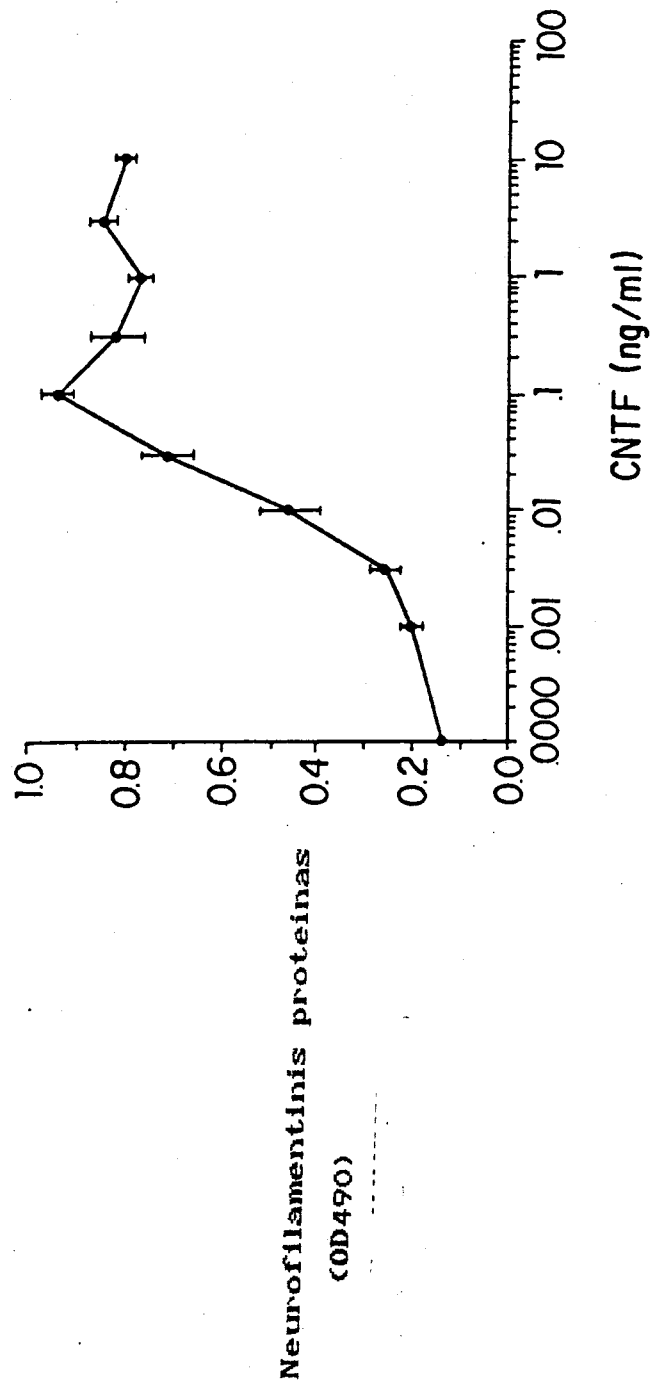


Fig.31b

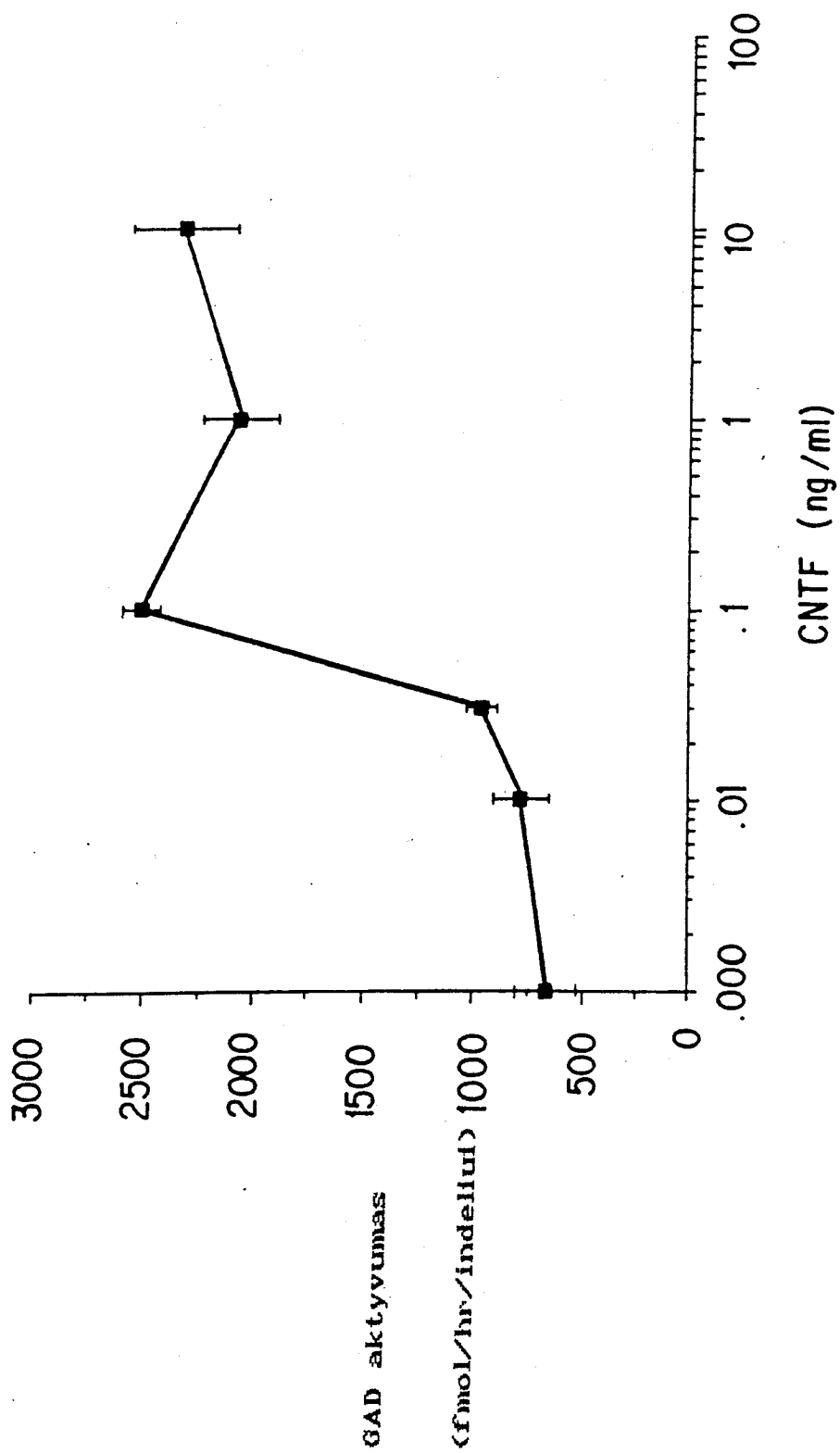


Fig. 31c

174

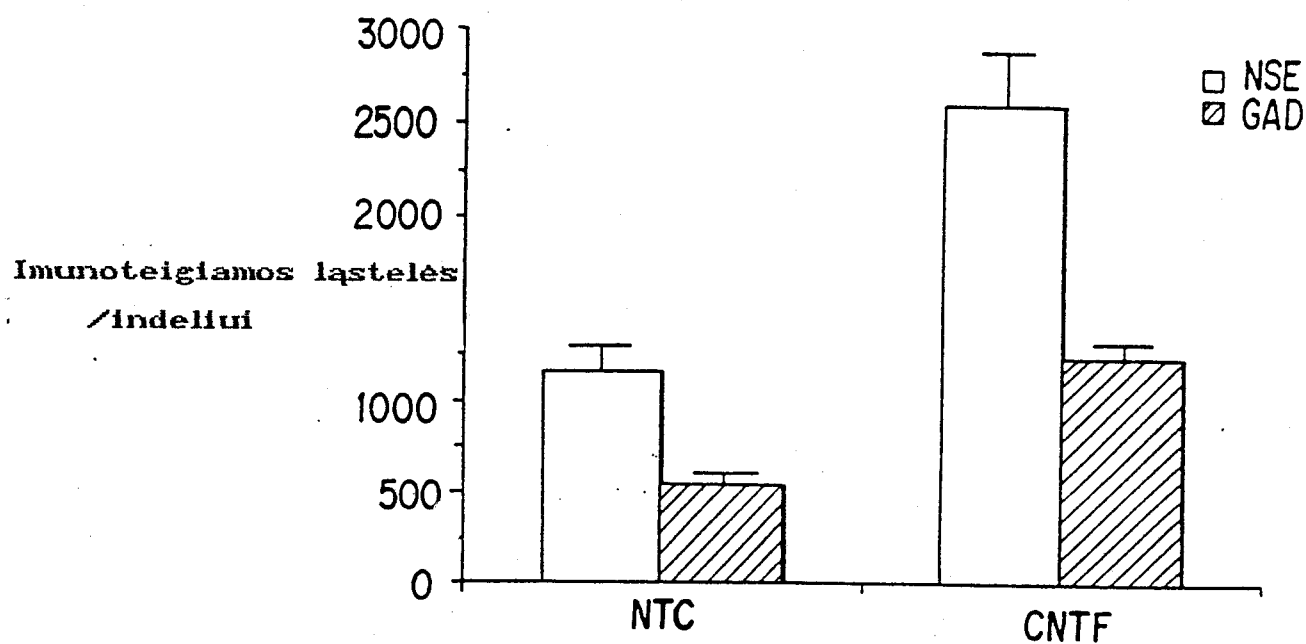


Fig. 32a

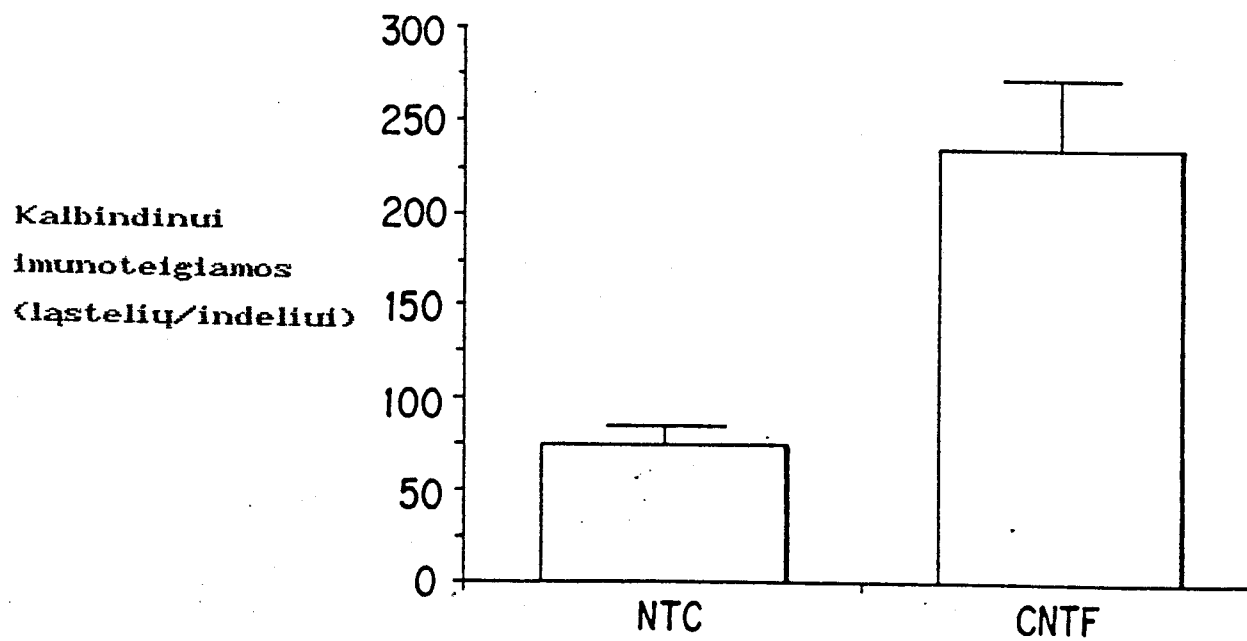


Fig. 32b

175

GABA
imunoteigiamos
ląstelės
(ląstelės sk.
12 laukų)

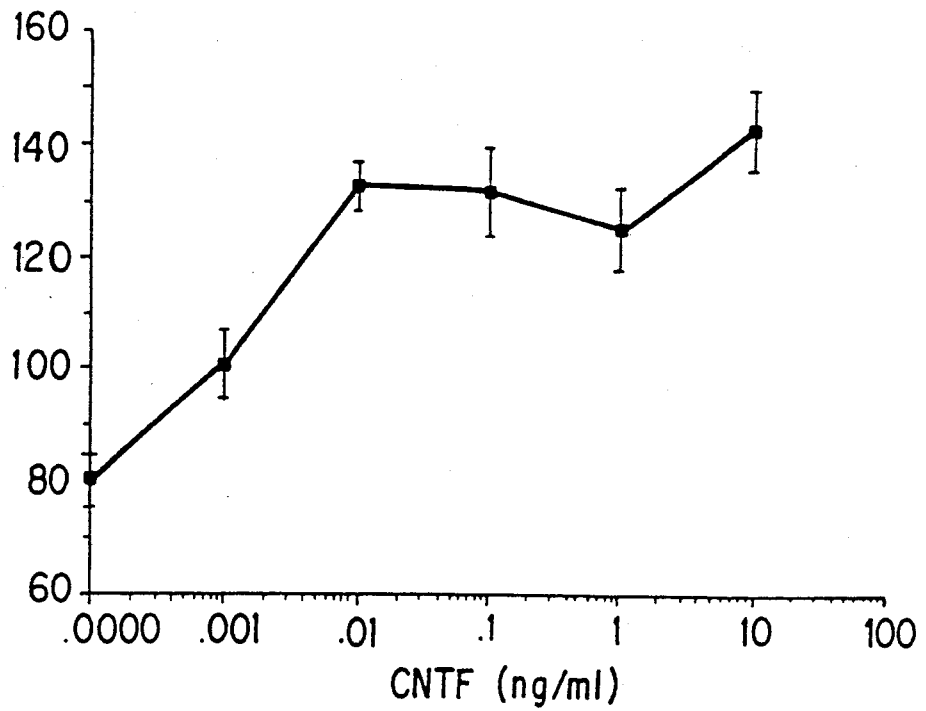


Fig. 33a

ACHE
imunoteigiamos
ląstelės
(ląstelės sk.
duobelėje)

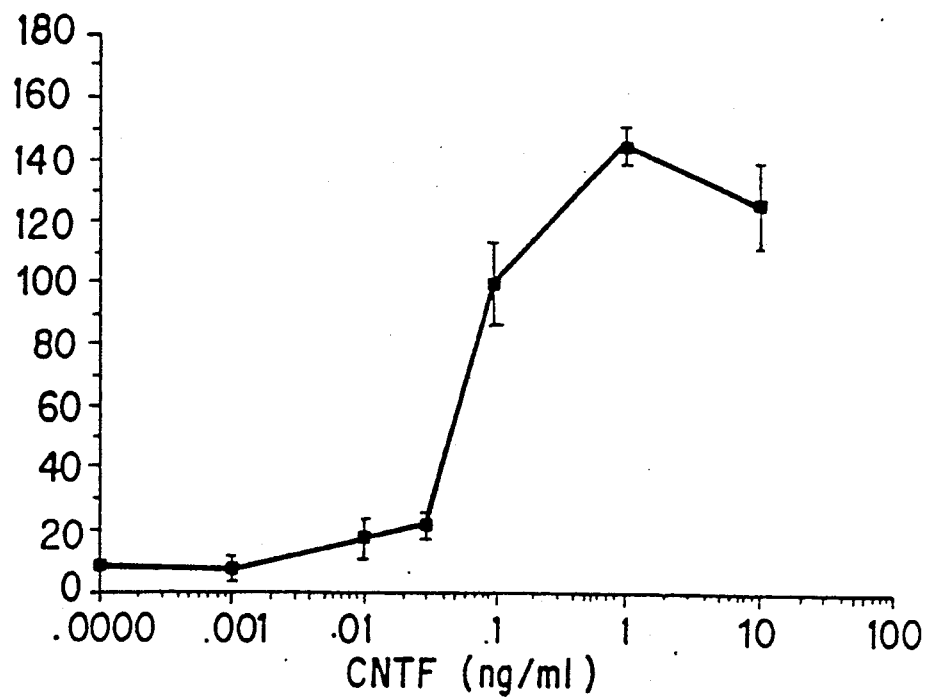


Fig. 33b

56/68

176

BŪDINGAS GABA ĪSISAV.
(fmol/hr/indellui)

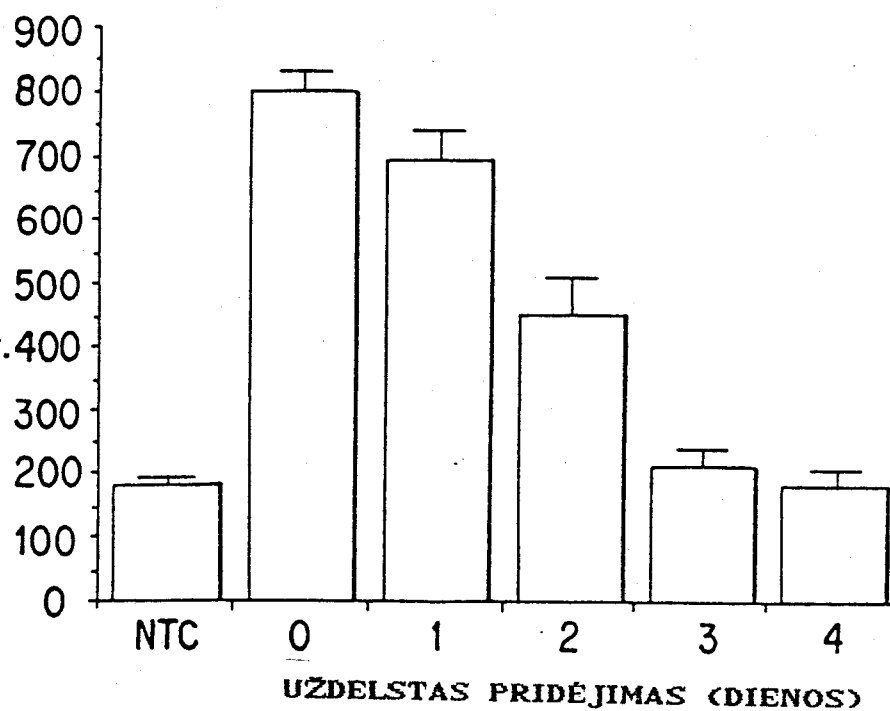


Fig.34a brēž.

BŪDINGAS GABA ĪSISAV.
(fmol/hr/indellui)

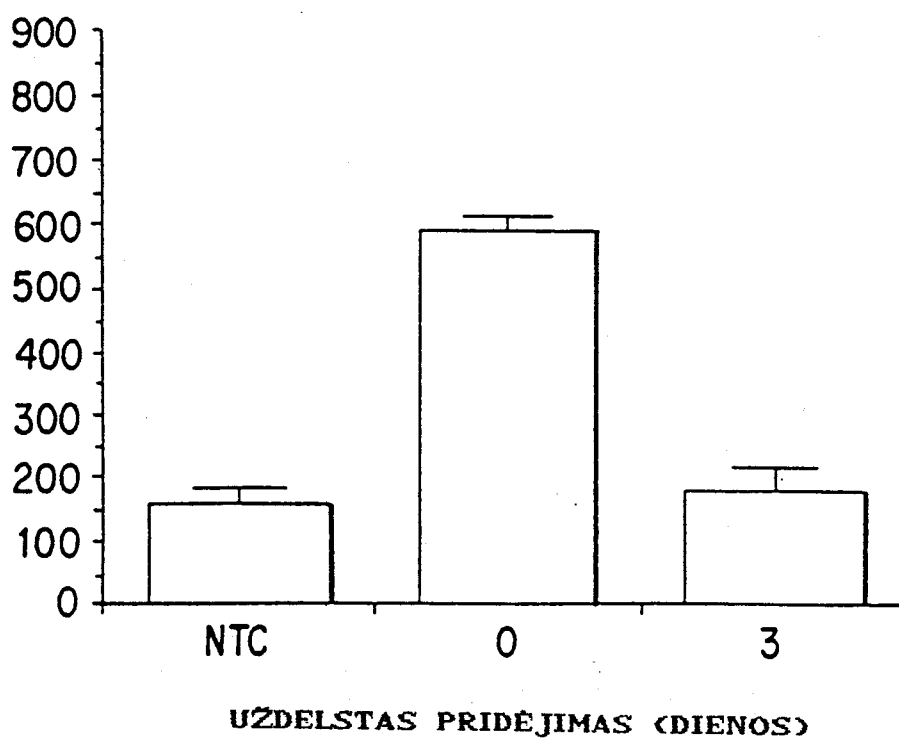


Fig.34b brēž.

57/68

177

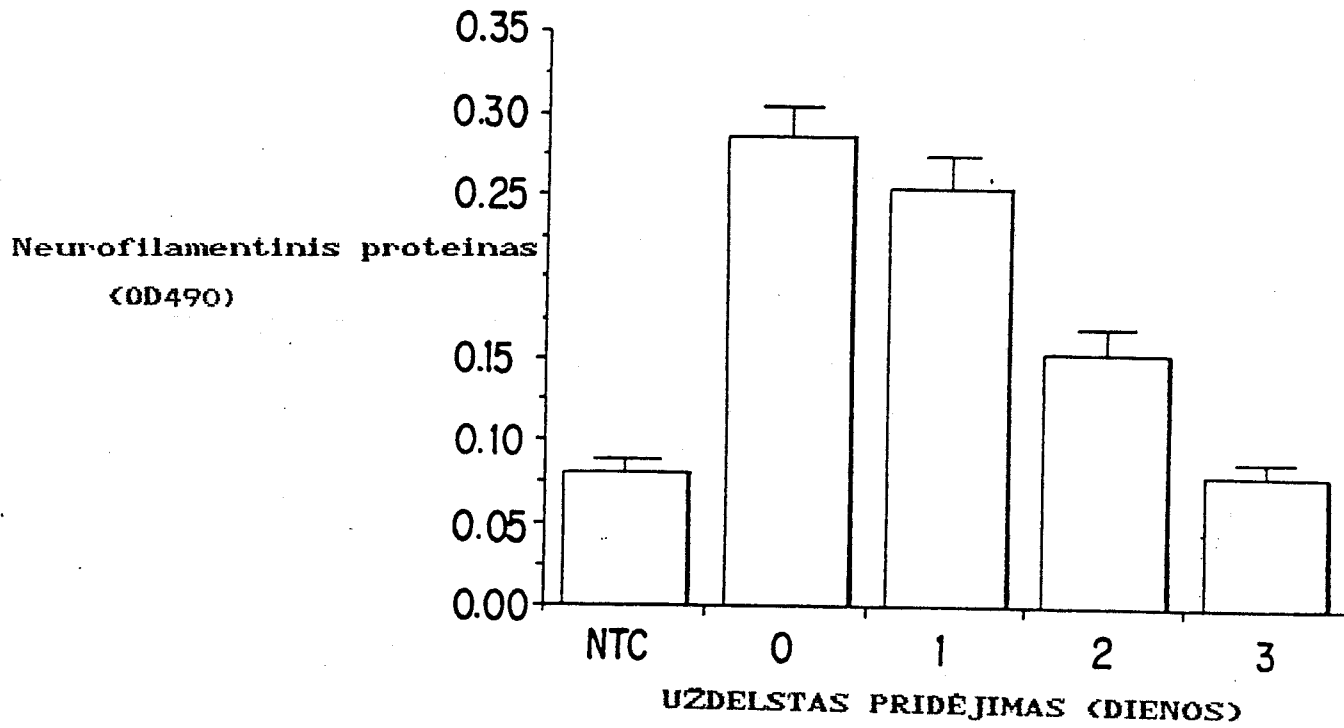


Fig. 35a

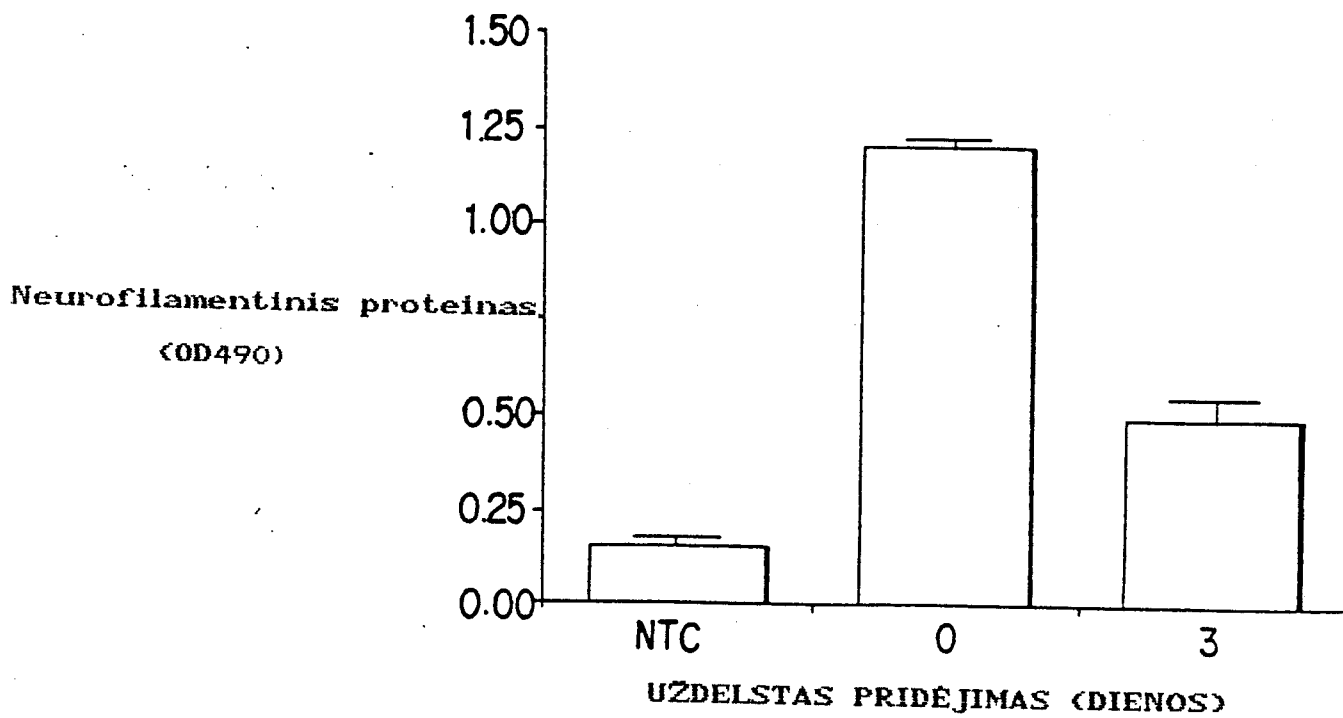


Fig. 35b

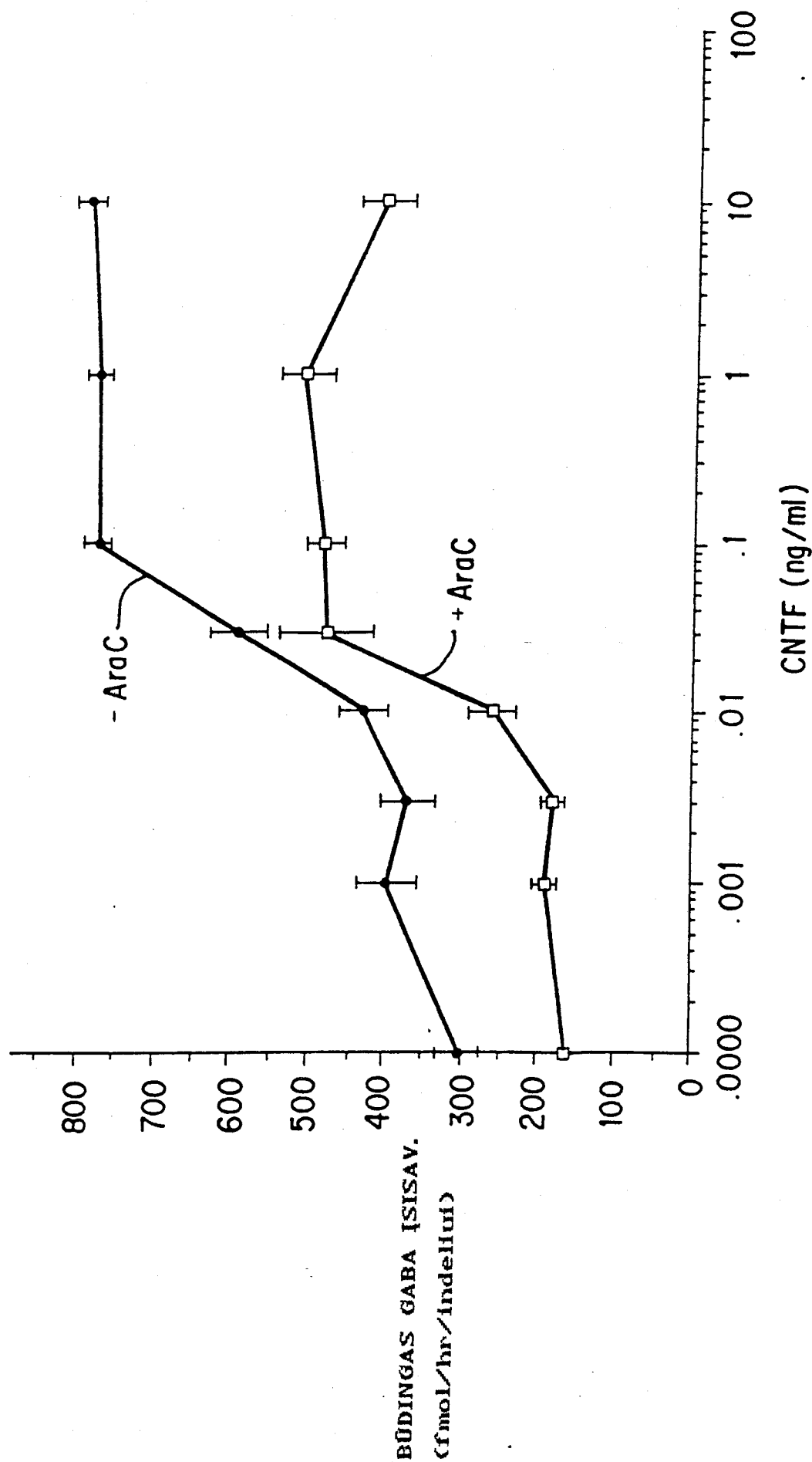


Fig.36

59/68

179

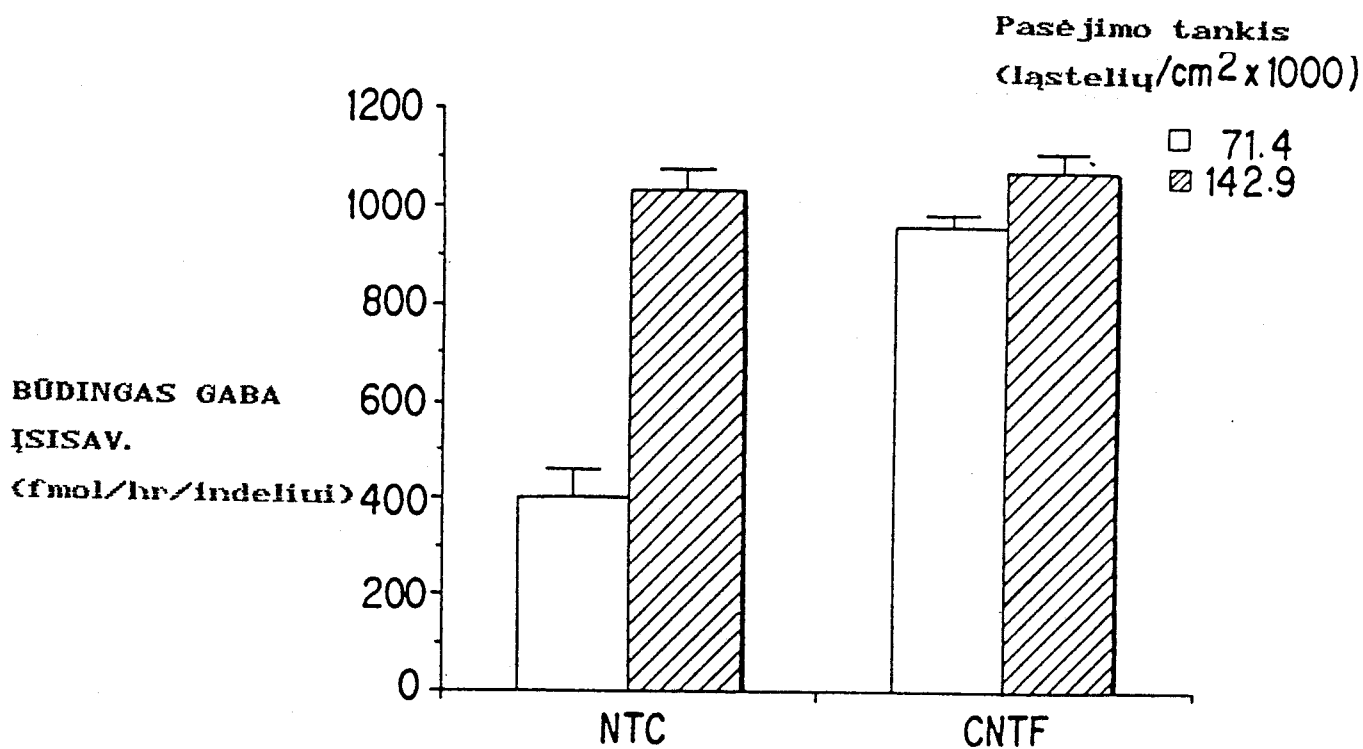


Fig. 37a

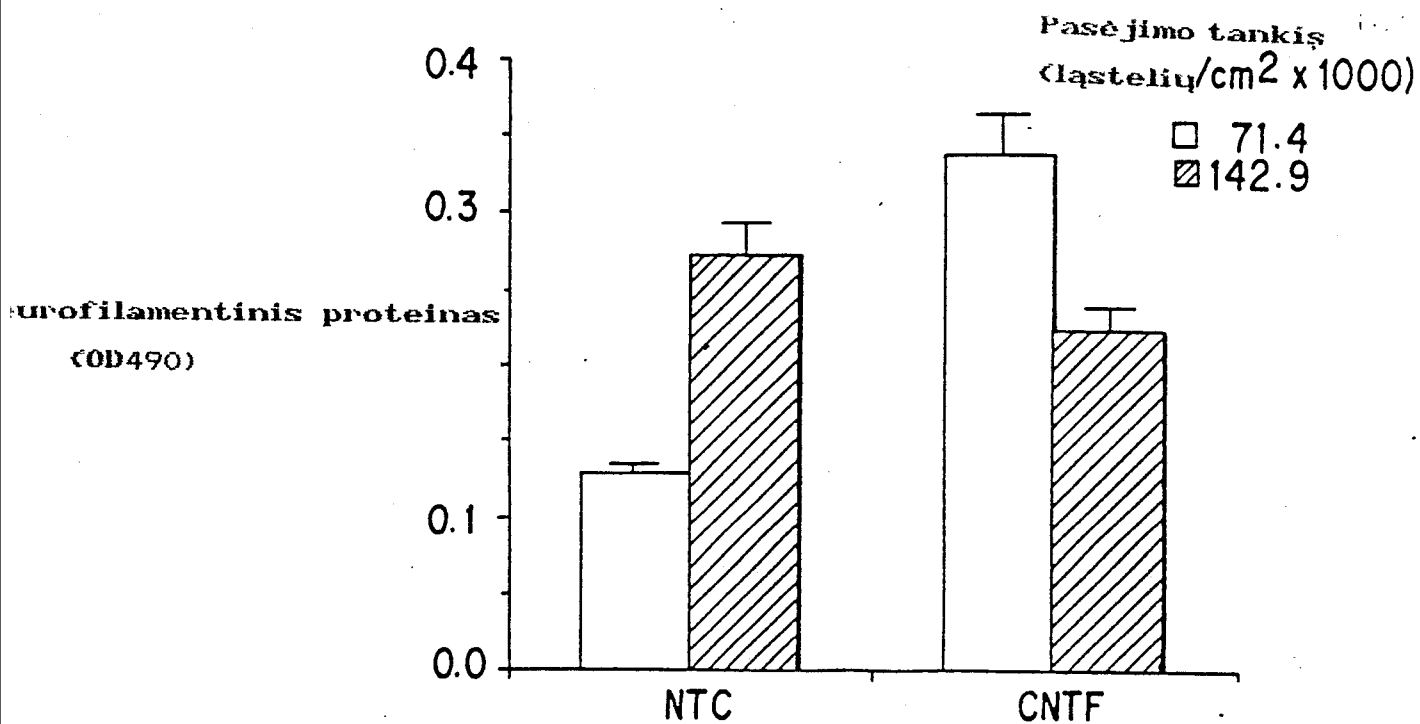


Fig. 37b

60/68

180

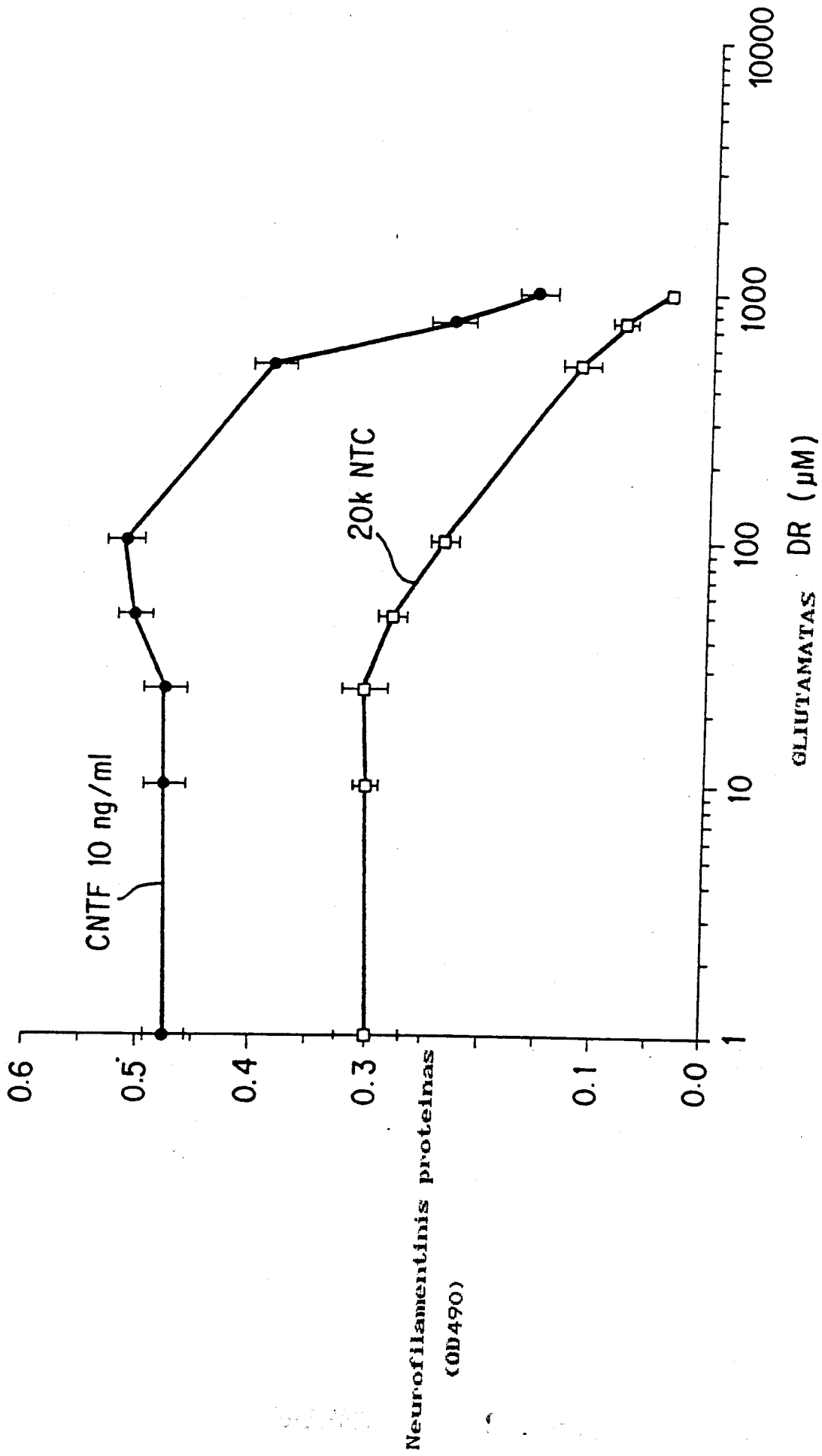


Fig. 38

181

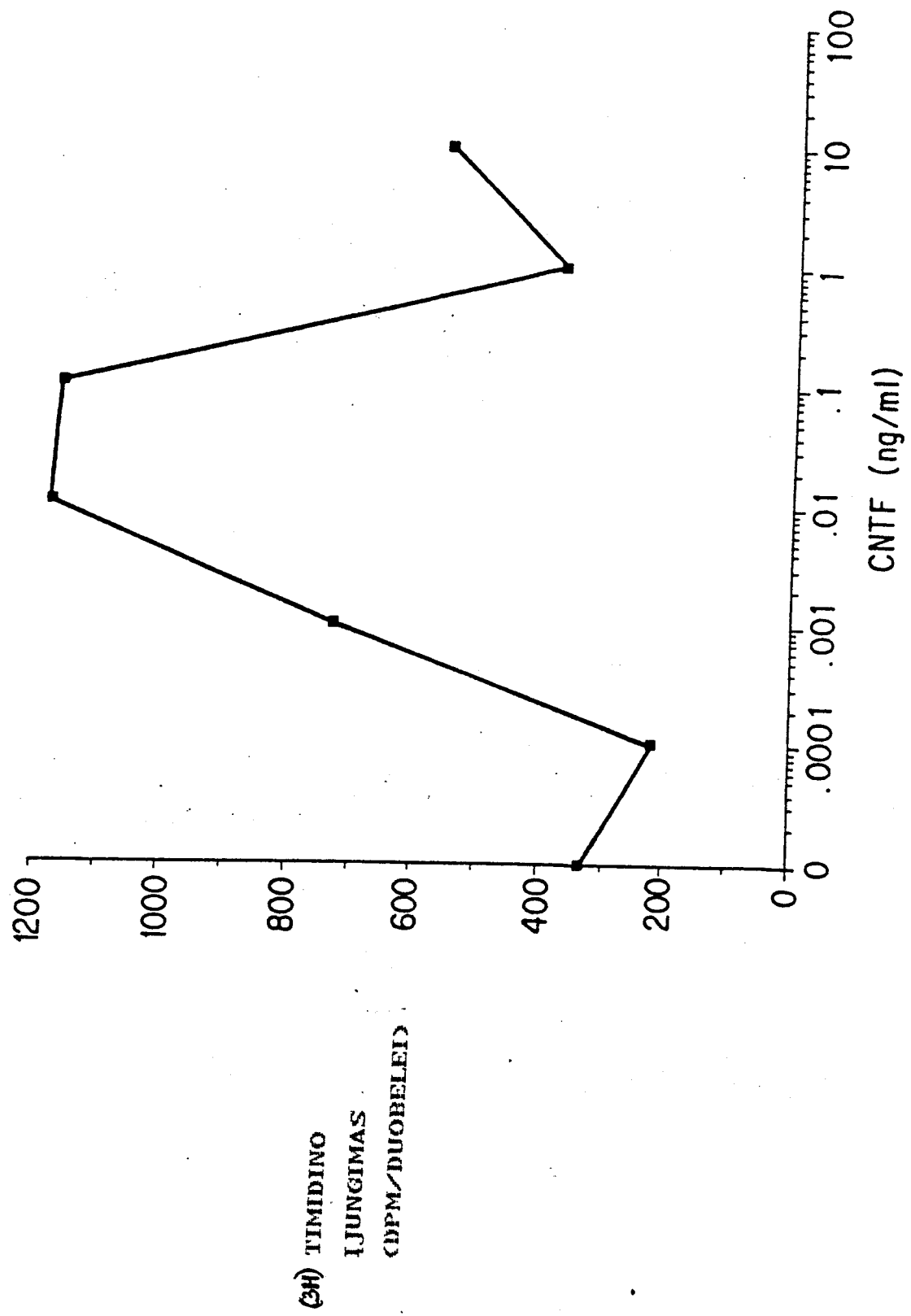


Fig. 39

62/68

482

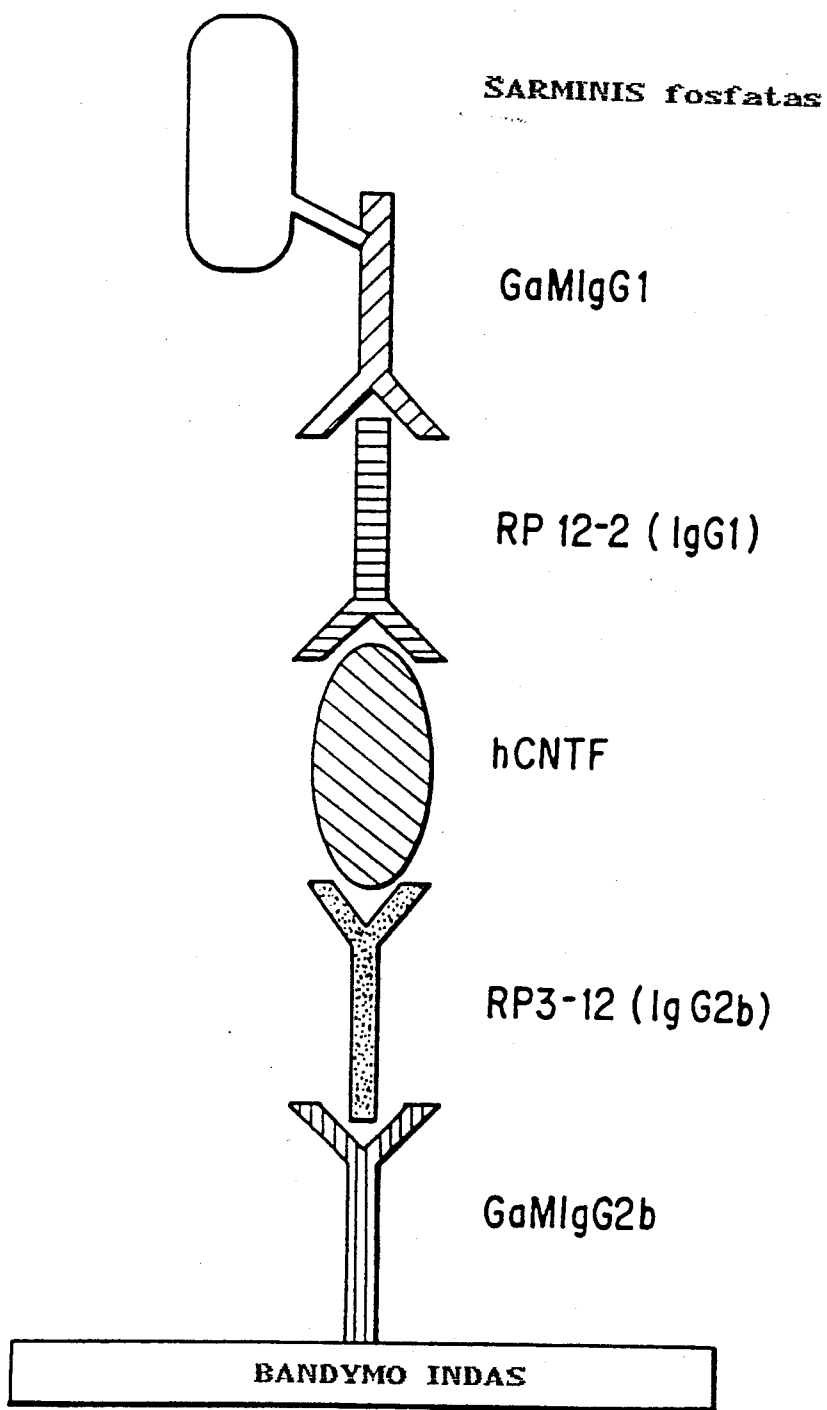


Fig. 40

63/68

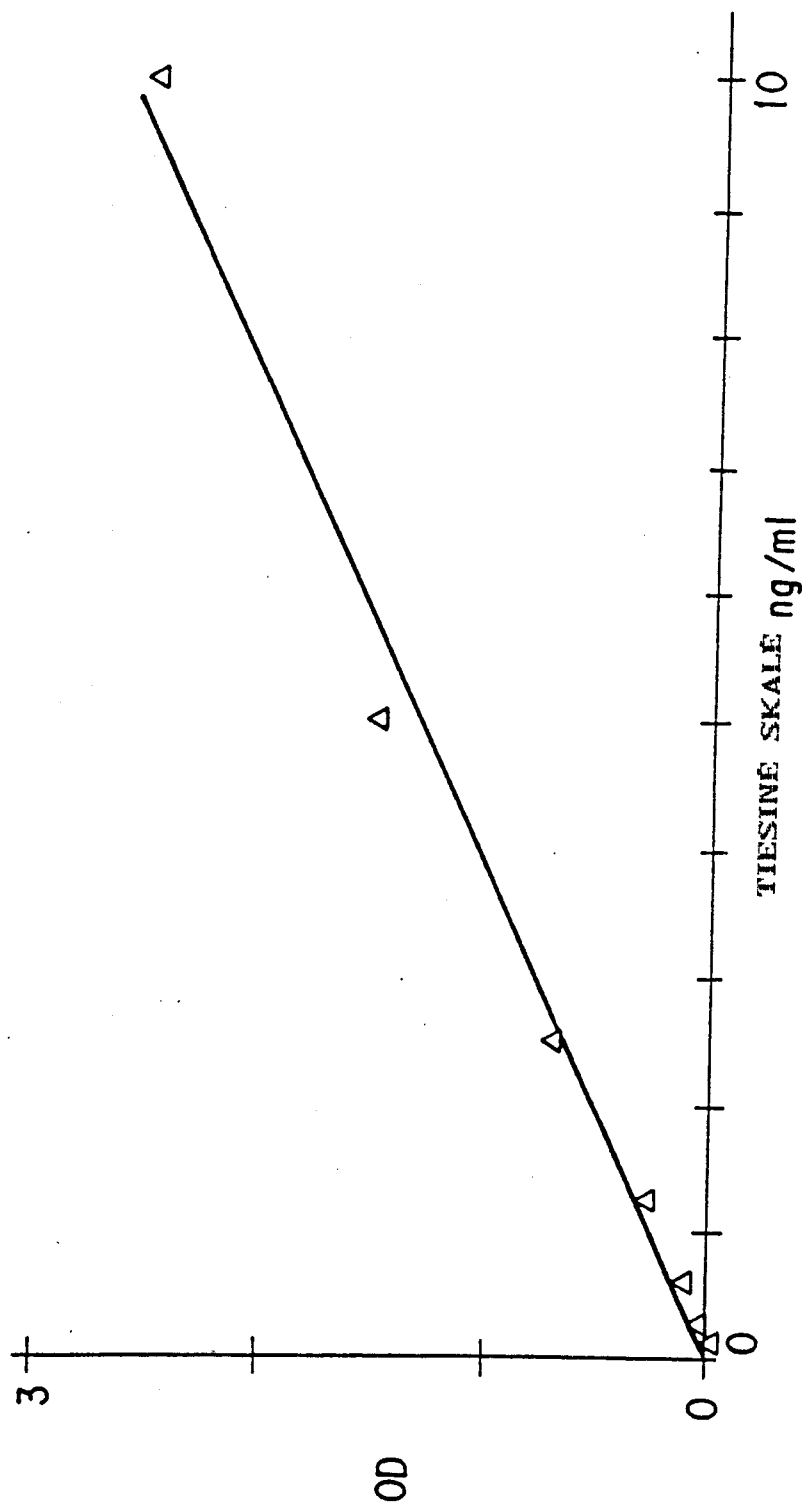


Fig. 41

184

Fig. 42a

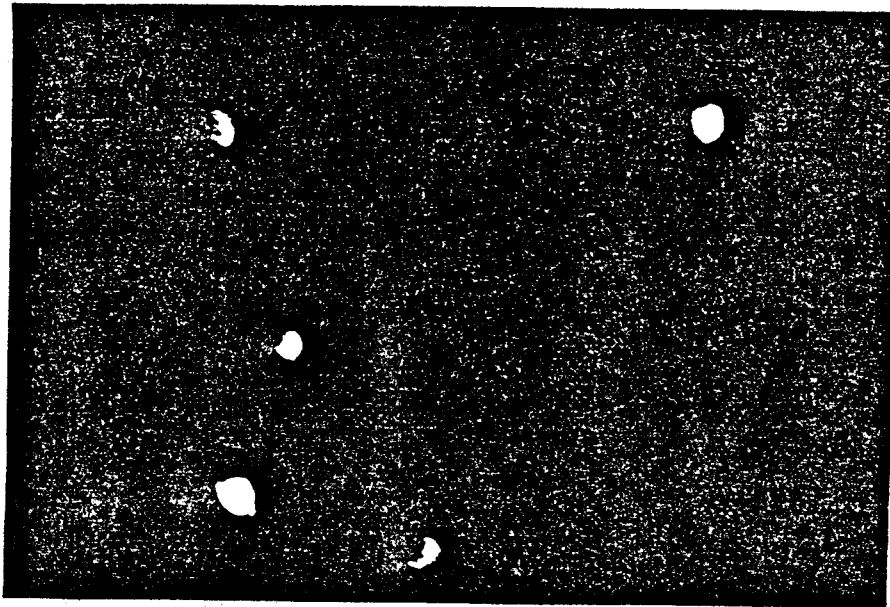
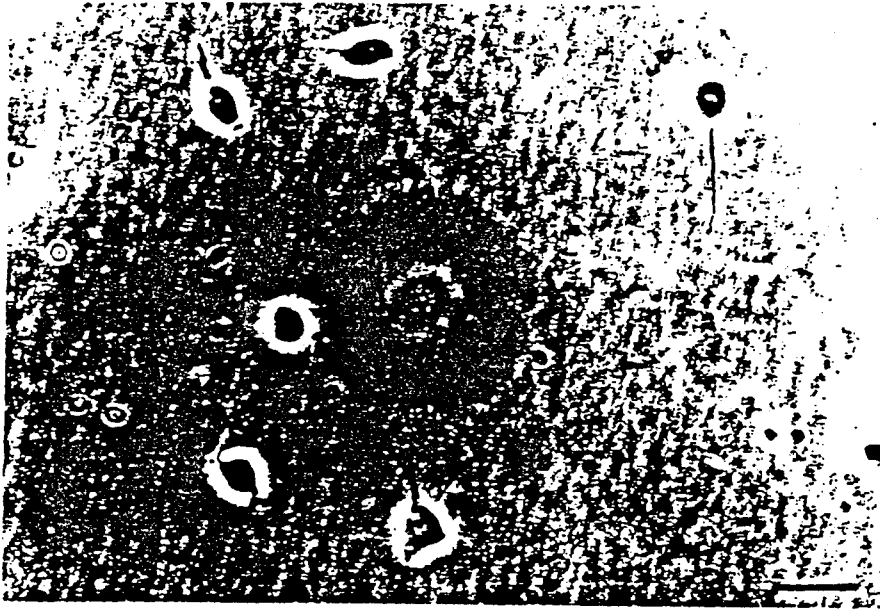


Fig.42b

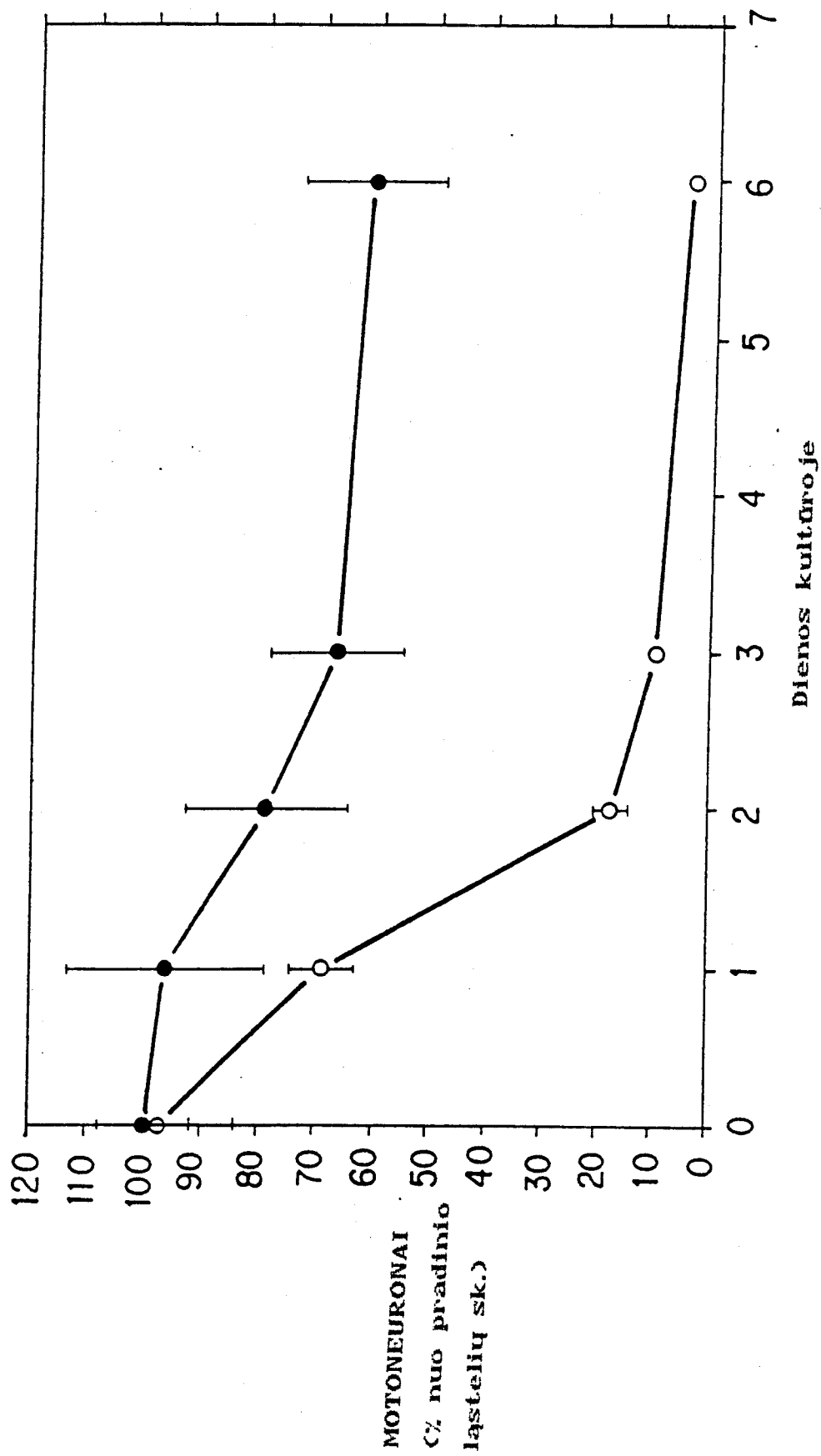


Fig. 43

185

Fig. 44a

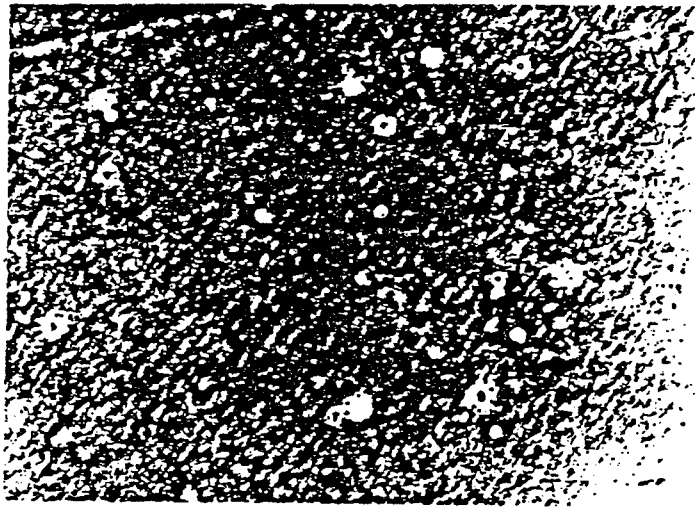


Fig. 44b

MOTONEURONŲ
IŠGYVENIMAS
(3 dienos
kultūroje,
% nuo pradinio
ląstelių sk.)

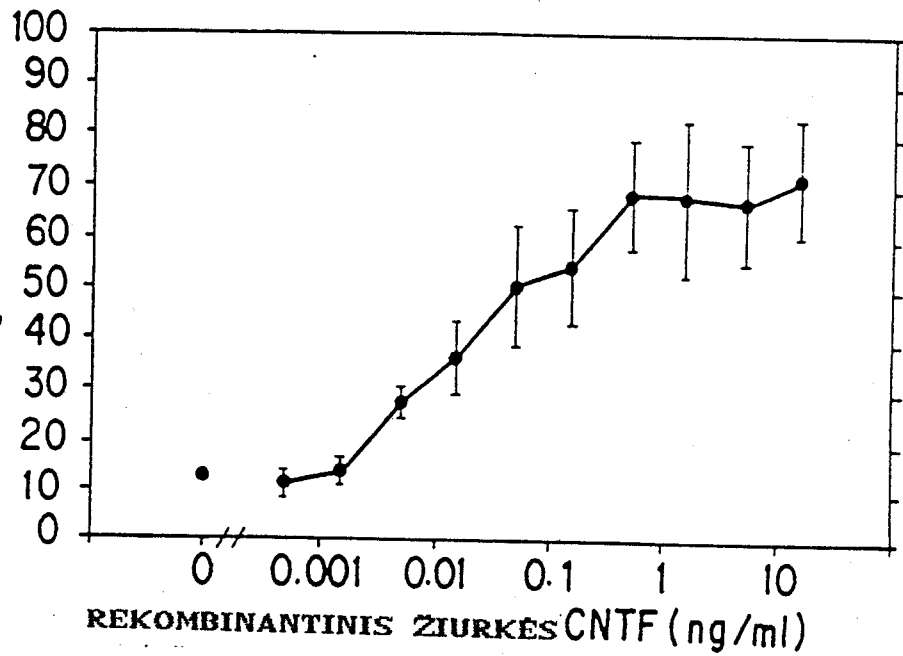


Fig. 45a

MOTONEURONŲ
IŠGYVENIMAS
(%)

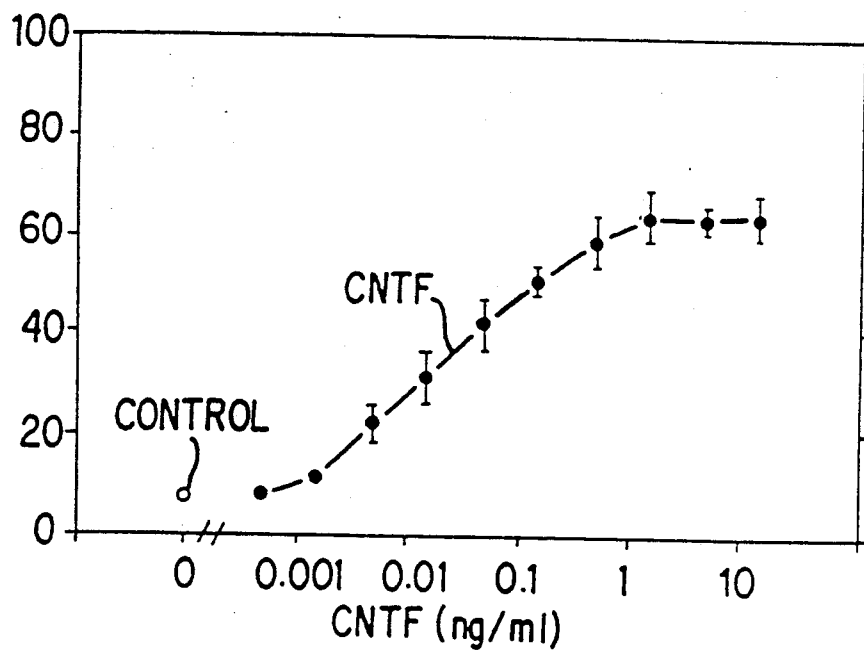


Fig. 45b

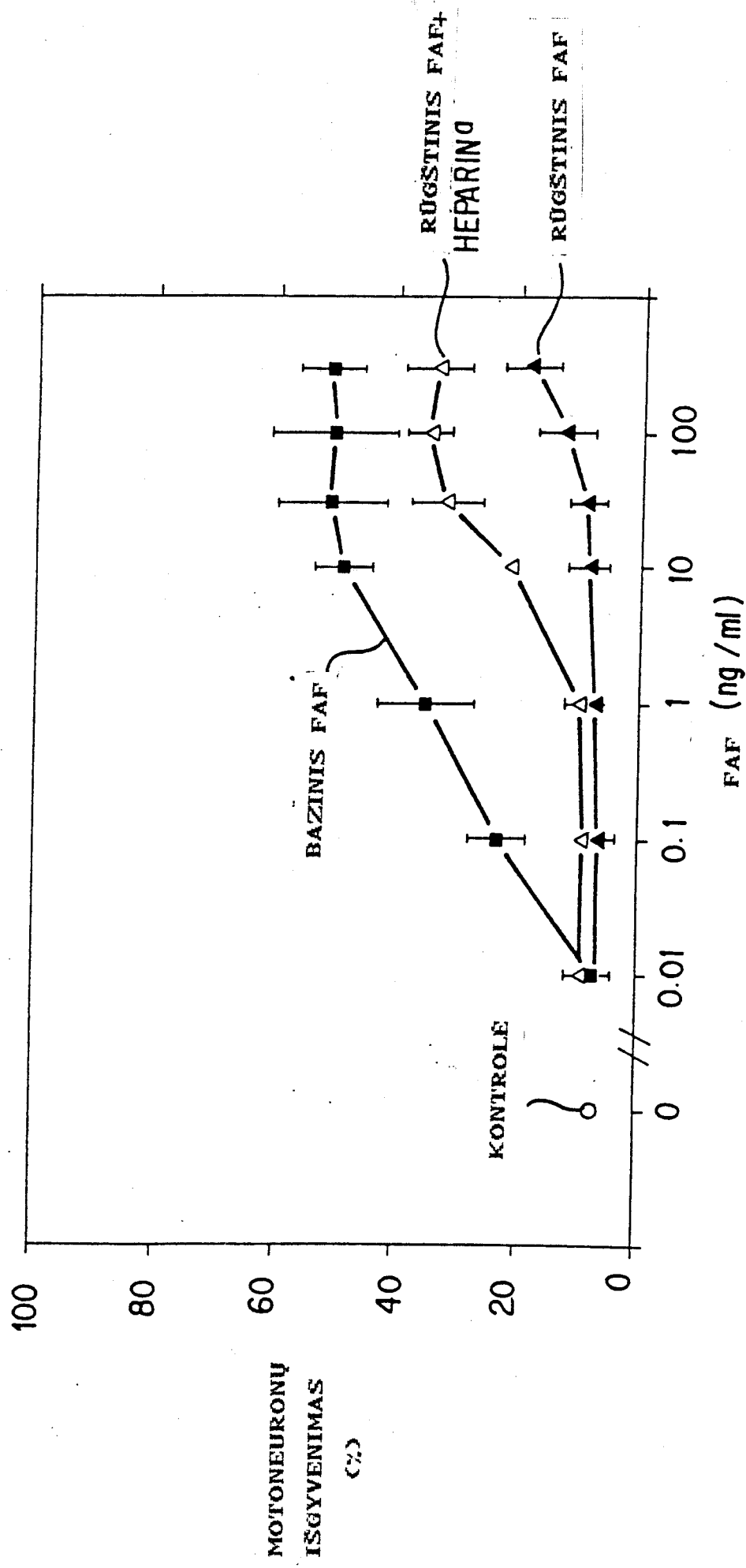


Fig. 45c