

(19)



(10) **LT 4011 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

- (11) Patent numeris: **4011**
- (51) Int. Cl.⁵: **C07K 13/00**
C12N 15/00
A61K 37/02
- (21) Paraiškos numeris: **IP1546**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 08 26**
- (60) SU duomenys: **PCT/US 90/04915, 1990 08 29**
SU 4895661, 1991 04 29
- (31, 32, 33) Prioritetas: **400591, 1989 08 30, US**
570657, 1990 08 20, US
- (72) Išradėjas:
Carolyn Hyman, US
Ralph Alderson, US
George D. Yancopoulos, US
Yves-Alain Barde, DE
Hans Friedrich Erwin Thoenen, DE
Andreas Hohn, US
Friedrich Lottspeich, DE
Ronald M. Lindsay, US
Magdalena Hofer, US
Loachim Leibrock, DE
David Harold Edgar, GB
Bastian Hengerer, DE
Dan Lindholm, DE
Francisco Zafra, ES
- (73) Patent savininkas:
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
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT
- (83) Mikroorganizmo deponavimas:
ATCC 40648, ATCC 40649, American Type Culture Collection, US
-

(54) Pavadinimas:
Smegenų neurotrofinis faktorius

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su nukleino rūgštimis, koduojančiomis smegenų neurotrofinį faktorių (BDNF), o taip pat BDNF baltymu, gautu dideliu kiekiu panaudojant šias sekas, o taip pat su jo peptidiniais fragmentais ir dariniais. Be to, išradime kalbama apie farmacines kompozicijas, turinčias veiklias BDNF genų produktų dozes, arba , priešingai, antikūnus, nukreiptus prieš BDNF genų produktus, o taip pat, atskirai paėmus, BDNF genų produktai pagal išradimą yra vertingi gydymui ir diagnozavimui dopaminerginių neuronų sutrikimams, tokiems kaip Parkinsono liga, o taip pat sensorinių neuronų pažeidimams ir tinklainės degeneracinėms ligoms. Išradimas taip pat susijęs su antikūnais, nukreiptais prieš BDNF arba jo fragmentus, užtikrinamas pakankamo imunogeno kiekio gamybos būdą. Toliau, suteikdamas galimybę lyginti nukleines BDNF ir neuronų augimo faktoriaus (NGF) sekas, šis išradimas įgalina homologinių nukleino sekų sričių identifikaciją tarp BDNF ir NGF, tuo pačiu apibrėžia BDNF/NGF geninę šeimą. Išradimas pateikia papildomų šios šeimos narių identifikacijos ir išskyrimo būdą.

1. Įvadas

Šis išradimas susijęs su nukleininėmis sekomis, koduojančiomis smegenų neurotrofinį faktorių (BDNF), su pagrinde grynu baltymu, peptidiniais fragmentais arba dariniais, gautais iš jo dideliais kiekiais, o taip pat su antikūnais, nukreiptais prieš BDNF baltymą, peptidinius fragmentus ar darinius. Papildomai išradimas susijęs su genais, kurie yra nauji nariai naujai apibrėžtos BDNF/NGF genų šeimos, ir su šių genų produktais. Taip pat, išradimas susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, turinčiomis veiklias BDNF genų produktų dozes, arba, priešingai, antikūnus, nukreiptus prieš BDNF genų produktus, o taip pat, atskirai paėmus, BDNF genų produktai pagal išradimą yra vertingi gydymui ir diagnozavimui dopaminerginių neuronų sutrikimams, tokiems kaip Parkinsono liga, o taip pat sensorinių neuronų pažeidimams ir tinklainės degeneracinėms ligoms.

2. Išradimo prielaidos

2.1. Nervinių ląstelių žuvimas ir neurotrofinių faktorių vaidmuo nervų sistemos vystymesi

Pradiniame vystymosi etape daugelyje stuburinių nervų sistemos dalių yra žymiai daugiau neuronų nei aptinkama pas suaugusius gyvūnus. Ankstyvo vystymosi periodai pasižymi periodiškai vykstančiu natūraliu nervinių ląstelių žuvimu. (Carr ir Simpson 1978, J. Comp. Neurol., 182:727-740; Cohan ir kt., 1984 Science 225: 1258-1265). Besivystančių neuronų išgyvenimą, diferencijavimąsi ir brendimą galima reguliuoti greičiau išorinės aplinkos faktoriais arba "epigenetiniais" faktoriais, negu griežta paveldima genetinė programa. Pavyzdžiui, eksperimentiniai darbai su vištos embrionais parodė, kad periferinių laukų-taikinių, tokių kaip galūnių užuomazga ar akis, transplantacija ar ekstirpacija ankstyvose viščiuko vystymosi stadijose gali sukelti atitinkamą sensorinių simpatinių ir motorinių neuronų, esančių greta padidinto ar sumažinto lauko-taikinio, kiekio padidėjimą ar sumažėjimą (Hamburger 1934, J.Exp.Zool

68, 449; Hollyday ir Hamburger. 1976, J. Comp. Neurol. 170: 311-321; Zandmesser ir Pilar 1976, J.Cell. Biol., 68:357-374). Laukas-taikinys gali palaikyti tik ribotą kiekį neuronų ir per normalų vystymosi procesą gali būti atrenkamas perteklinis neuronų kiekis, kad pritaikyti jam audinio-taikinio neurotrofinę galią. Atradimas ir išskyrimas baltymo dabar vadinamo nervinio augimo faktoriumi (NGF), leido iškelti molekulinę hipotezę, kad taikinys gali reguliuoti neuronų, kurie išgyvena ir inervuoja šį audinį, kiekį (Levi-Montalcini ir kt. 1968, Physiol. Rev., 48: 524-569; Thoenen ir Barde 1980, Physiol. Rev., 60:1284-1335).

Dabar gerai nustatyta, bent jau periferinėje nervų sistemoje, kad nerviniai audiniai-taikiniai sintetina ir išskiria ribotą kiekį įvairių neurotrofinių molekulių, kurios yra lemiamos tam tikrų tipų neuronų išgyvenimui (Korsching ir Thoenen, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 80: 3513-3516; Neumann ir kt. 1984, EMBO, 3:3183-3189; Shelton ir Reichardt 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81: 7051-7955; Korsching ir Thoenen 1985, Neurosci. Lett. 54:201-205).

2.2 Nervinio augimo faktorius

Nervinio augimo faktorius šiuo metu yra pilniausiai apibudinta tokio tipo neurotrofinė molekulė ir, tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, buvo parodyta, kad jis būtinas simpatinių bei kilusių iš nervinės skiauterės sensorinių neuronų išgyvenimui ankstyvoje tiek viščiukų, tiek ir žiurkių, vystymosi stadijoje (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1963, Develop. Biol 7:653-659; Levi-Montalcini ir kt., 1968, Physiol. Rev 48: 524-569). Išvalyto NGF injekcijos į besivystančius vištos embrionus parodė, jog NGF sukelia didelę stuburo smegenų sensorinių neuronų ir simpatinių neuronų hiperplaziją ir hipertrofiją (Levi-Montalcini ir Booker, 1960 Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 46:373-384; Hamburger ir kt., 1981 J. Neurosci 1:60-71). Priešingai, pašalinimas arba suardymas endogeninio NGF, kasdien įvedant anti-NGF antikūnus neonatalinėms žiurkėms, galiausiai buvo susietas su simpatinės nervų sistemos suardymu (Levi-Montalcini ir Booker, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 46:384-391; Levi-Montalcini ir Angeletti, 1966, Pharmacol. Rev. 18:619-628). NGF antikūnų panaudojimas net anksčiausioje vystymosi stadijoje įvedant antikūnus į gimdą ar pasyvaus transplacentinio motinos

antikūnų pernešimo metu iššaukdavo žymų sumažėjimą sensorinių neuronų, kilusių iš nervinės skiauterės, tokių kaip nugaros ir dorsomedialinių trišakio nervo sensorinių neuronų (Goldert ir kt., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81:1580-1584; Gorin ir Johnson 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 76: 5382-5386). Dar visai neseniai, beveik visi NGF tyrimai buvo susiję su jo vaidmeniu periferinėje nervų sistemoje, bet dabar akivaizdu, jog NGF taip pat daro įtaką kai kurių centrinės nervų sistemos neuronų populiacijų vystymuisi ir veiklai (Thoenen ir kt., 1987, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109:145-178; Whittmore ir Senger 1987, Brain Res. Rev. 12: 439-464).

Sėkmingas didelio NGF baltymo kiekio atradimas suaugusio pelės patino pažandės liaukoje (Cohen, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 46: 302-311) ir dar ankstesnis aukšto NGF lygio atradimas gyvatės nuoduose (Cohen ir Levi-Montalcini 1956, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 42:571-574) davė pakankamą NGF kiekį, kad būtų atlikti jo tyrimai fiziologijos, baltymų chemijos ir vėliau molekulinės biologijos (t.y. NGF ir jo receptoriaus molekulinio klonavimo) srityse. Didelių NGF kiekių, esančių suaugusio žiurkės patino pažandės liaukoje, funkcija lieka neišaiškinta, bet, akivaizdu, jog toks turtingas šaltinis negali nevaikinti kokio nors vaidmens periferinės ir centrinės nervų sistemos vystymesi ir palaikyme. Audinyje-taikinyje, inervuotame neuronais, jautriais NGF (tai neuronai, kuriuos tiriant aptikta, kad nuo NGF priklauso jų išgyvenimas, NGF receptorių aukštas afiniškumas, didelio specifiškumo NGF internalizacija ir retrogradinis transportas), pastovus išmatuojamas NGF lygis yra labai žemas, pikogramai ir nanogramai viename grame audinio, lyginant su tūkstą kartų didesniu lygiu suaugusio žiurkės patino pažandės liaukoje. NGF nebuvo aptiktas nors kiek žymesniais kiekiais kraujo serume ir todėl, akivaizdu, jog jis nėra cirkuliuojantis augimo faktorius ar hormonas (Suda ir kt., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 75:4042-4046).

Be svarbaus pagrindinio NGF baltymo šaltinio pelių pažandėje liaukoje atradimo, svarbų vaidmenį NGF biologijos ir biochemijos išaiškinime suvaidino jautrių, patikimų ir efektyvių biologinių eksperimentų atsiradimas. Besivystančio vištos gemalo dorsalinės šaknelės mazgo (DRG) neuronai buvo vieni iš pirmųjų,

kuriuose *in vitro* aptiktas sugebėjimas reaguoti į NGF. Viščiuko E8-E12 DRG eksplantantų kultūros plazmos krešulyje ir, vėliau, viščiuko DRG kultūros, praturtintos neuronais, pasirodė labai naudingomis bioeksperimentuose, tiriančiuose NGF aktyvumą (pavyzdžiui, jo valymo metu), ir NGF biologijos *in vitro* tyrimuose (Levi-Montalcini ir kt., 1954, Cancer Res. 4: 49-57; Levi-Montalcini ir Angeletti 1963, Develop-Biol. 1:653-659; Greene 1977, Develop. Biol. 58:96, ten pat, 58:106). Tai, kad disekcijos pagalba iš vieno vištos embriono galima gauti daugiau nei 40 DRG, nulėmė platų bioeksperimentų su NGF išplitimą daugelyje laboratorijų.

Priedo prie galimybės gauti NGF baltymą dideliais kiekiais ir efektyvių bandymų su NGF sistemų, trečiuoju pagrindiniu faktoriumi, kuris įnešė svarbų indėlį mūsų NGF biologijos supratime, yra santykinis paprastumas, kuriuo gaunami NGF antikūnai iš jūrų kiaulytės, triušio, avies ir t.t.; atrodo, kad pelių NGF yra labai imunogeninis. Cohen (1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 46:302-311) gaudavo antikūnus prieš NGF, išskirtą iš pelių pažandės liaukos, ir kartu su Levi-Montalcini ir Booker (1960, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 46:384-391), kad šie antikūnai sukelia simpatinių mazgų destrukciją arba "imunosimpatektomiją", kai juos kasdien įveda žiurkių naujagimiams (Levi-Montalcini ir Angeletti 1966, Pharmacol. Rev. 18: 619-628).

NGF baltymo gausumas leidžia nustatyti jo pirminę seką panaudojant, palyginti, tradicinius cheminius baltymų tyrimo metodus (Angeletti ir Bradshaw 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 68:2417-2420). Daugelio gyvūnų, tame tarpe pelės (Scott ir kt., 1983, Nature, 302: 538-540), žmogaus (Ullrich ir kt., 1983, Nature 303-821-825), karvės ir viščiuko (Meier ir kt., 1986, EMBO 5: 1489-1493) ir žiurkės (Whittmore ir kt. 1988, J. Neurosci. Res. 20-402-410) NGF genas buvo klonuotas, naudojant pagrįstus molekulinės biologijos metodus, paremtus atitinkamų oligonukleotidinių zondų sukūrimu, pasinaudojant pelės NGF baltymine seka. NGF prieinamumas taip pat žymiai palengvino NGF receptoriaus tyrimą, dėka ko galiausiai buvo atliktas žmogaus ir žiurkės NGF receptoriaus molekulinis klonavimas (Johnson ir kt., 1986, Cell 47, 545-554; Radeke ir kt., 1987, Nature 325:593-597).

Dabar puikiai žinoma, kad NGF nėra visur paplitęs neurotrofinis faktorius. Kaip nustatyta *in vitro* ir *in vivo* tyrimuose, periferinėje nervų sistemoje greičiausiai NGF nėra parasimpatinių neuronų, kilusių iš nervinės plakodės sensorinių neuronų arba žarnyno neuronų, išgyvenimo faktorius. Dar daugiau, greičiausiai NGF nėra išgyvenimo faktoriumi besivystantiems motoneuronams (Appengeim, 1982, J. Comp. Neurol. 210: 174-189), nors šie neuronai ekspresuoja bent jau silpnai afininę NGF receptoriaus formą savo vystymosi metu (Raivich ir kt., 1985, EMBO, 4: 637-644). NGF neveiklumas tokio tipo neuronams, paskatino kitų neurotrofinių faktorių paiešką, ypač faktorių, kurie palaikytų nugaros smegenų motoneuronų ir/arba krumplyninio mazgo parasimpatinių neuronų išgyvenimą.

2.3 Kiti neurotrofiniai faktoriai

Paskutiniaisiais dešimtmečiais pasirodė gausūs pranešimai apie neurotrofinį aktyvumą įvairiausių audinių ekstraktuose ir daugelio tipų ląstelių kondicionuotose auginimo terpėse. Tačiau, beveik visuose atvejuose, išgryninimas ir apibudinimas tų aktyvių medžiagų buvo apsunkintas labai mažais jų kiekiais, piko- ir nanogramų ribose viename grame audinio.

Be to, nors buvo atlikti adekvatūs bioeksperimentai su periferiniais neuronais, sukūrimas patikimų, pasikartojančių ir specifinių eksperimentų su centrinės nervų sistemos neuronais pasirodė problematišku. Tuo tarpu, kai atskiri periferinių neuronų tipai, randami atskiruose, lengvai pasiduodančiuose disekcijai mazguose, centrinės nervų sistemos neuronų pasiskirstymas visada labai nevienalytis. Taip, atskirų CNS neuronų klasių identifikacijai ir išskyrimui reikalingi specifiniai markeriai. Tokių markerių, pavyzdžiui, antikūnų, nukreiptų prieš ląstelės paviršių arba citoskeletinius komponentus, arba specifinius histologinius dažus, gavimo pažanga buvo labai ribota. Atitinkamai, pasirodė, kad labai sunku charakterizuoti neurotrofinius faktorius, kurie:

(I) ne tokie gausūs, kaip NGF (II) su jais sunku atlikti eksperimentus, (III) nėra pakankamo jų kiekio, kad gauti antikūnus.

2.3.1. Smegenų neurotrofinio faktoriaus (BDNF) palyginimas su nervinio augimo faktoriumi

Neurotrofinis aktyvumas, galintis palaikyti vištos embriono dorsalinės šaknelės mazgo neuronų išgyvenimą, buvo *in vitro* identifikuotas kondicinėje terpėje, kurioje kultivavo žiurkės C-6 gliomines ląsteles (Barde ir kt., 1978, Nature 274:818). Šis aktyvumas nebuvo neutralizuotas antikūnais prieš pelių NGF, kas leidžia tarti, jog kondicinėje terpėje yra kitas neurotrofinis faktorius. Panašūs aktyvumai, kuriuos neblokavo NGF antikūnai, vėliau aptikti suaugusios žiurkės galvos smegenų astroglijos normalių ląstelių kultūrose (Lindsay 1979, Nature 282:80-82 Lindsay ir kt., 1982, Brain Res 243:329-343) ir besivystančių ir suaugusių žiurkių galvos smegenų ekstraktuose (Barde ir kt., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 77:1199-1203) ir besivystančio bei subrendusio viščiuko nugaros smegenyse (Lindsay ir Peters 1984, Neurosci 12:45-51). Bet, nei vienu atveju nebuvo išskirti ir identifikuoti veiklūs faktoriai ir lieka neaišku, ar stebėtas aktyvumas priklauso vienam ir tam pačiam ar keliems faktoriams.

Naudodamas kaip pradinę medžiagą kiaulės smegenis, Barde ir kt., (1982, EMBO, I: 549-553) pranešė apie faktorių, dabar pramintą smegenų neurotrofiniu faktoriumi (BDNF), kuris gerindavo dorsalinės šaknelės mazgo iš E10/E11 vištos embriono neuronų išgyvenimą. Buvo aptikta, jog neurotrofinį aktyvumą turi labai šarmingas baltymas (su izoelektriniu tašku pI didesniu už 10,1), kuris elektroforezės gelyje su natrio dodecilsulfatu (SDS) migravo, sudarydamas vienintelę juostą, atitinkančią molekulinę masę 12,3 kD. Išvalytas faktorius buvo vertinamas $1,4 \times 10^6$, bet jo išeiga buvo labai maža, apytiksliai tik 1 μ g valyto BDNF iš 1,5 kg. kiaulės smegenų. Be to, kadangi paskutinė valymo proceso stadija buvo gelio elektroforezė, BDNF aktyvumas negalėjo būti pakartotinai visiškai renatūruotas, dėl liekamojo SDS buvimo (Barde ir Thoenen, 1985, "Hormones and Cell Regulation", T 3, leid. Dumon ir kt., Alsvir Science Publishers, 385-390). Buvo atkreiptas dėmesys, jog BDNF didelis šarmingumas ir molekulinis dydis labai panašūs į NGF monomero savybes. Vienok, BDNF turi savybių, kurios skiriasi nuo žinomų NGF savybių tuo, kad (a) bioeksperimente su viščiuko dorsalinės šaknelės mazgu, antikūnai prieš NGF

nedarė pastebimo poveikio BDNF biologiniam aktyvumui; (b) kaip pasirodė, BDNF ir NGF veikla papildo viena kitą; ir (c) skirtingai nuo NGF, buvo aptikta, jog BDNF neturi įtakos E12 vištos embriono simpatinių neuronų išgyvenimui. Be to, ankstyvesniuose smegenų ekstrakto tyrimuose pastebėta, jog šių šaltinių neurotrofinis aktyvumas veikia sensorinius neuronus vėlesnėse stadijose, nei aktyvumas surištas su NGF. Naudojant disocijuotas vištos embriono neuronų kultūras, augintas polikatijoniniame substrate, tokiaime kaip polilizinas arba poliornitinas, buvo aptikta, kad BDNF palaiko išgyvenimą daugiau kaip 30% E10-E11 (dešimos arba vienuoliktos embrioninio vystymosi dienos) neuronų iš dorsalinės šaknelės mazgo, bet mažai veikia tų pačių neuronų išgyvenimą prie E6 (Barde ir kt., 1980, Proc. natl. Acad. Sci. JSV, 77: 1199-1203, aukščiau). Buvo paskelbta, kad NGF palaiko 30-40 procentų E6 DRG neuronų išgyvenimą prie panašių sąlygų. Įdomu, kad vėliau buvo aptikta, jog auginant substrate, padengtame ekstraląstelinio matriciniu glikobaltymu lamininu, tiek NGF tiek ir BDNF palaikydavo išgyvenimą apytiksliai 50% DRG neuronų iš vištos embrionų E6-E12 amžiaus (Lindsay ir kt., 1985, Develop. Biol. 112: 319-328). Vėlesniuose tyrimuose aptikta, jog NGF ir BDNF veikimai papildo vienas kitą, kai abi medžiagos turi įsotinančias koncentracijas.

Ankstyvieji Levi-Montalcini (1966, Harvey Lectures 60: 217-259) NGF neuroninio specifiškumo tyrimai, leido numatyti, kad NGF nėra visur paplitęs neurotrofinis faktorius, net sensorinių neuronų tarpe, nes NGF neveikė neuronų iš tam tikrų viščiuko galvos sensorinių mazgų, ypač iš dešimtojo galvinio nervo mazginio ganglijo. Vėliau *in vitro* tyrimai (Johnson ir kt., 1980, Science 210: 916-918; Pearson ir kt., 1983, Develop. Biol. 96:32-36) parodė, jog NGF trūkumas embriogenezės metu neturi įtakos neuronų iš daugelio žiurkių galvos sensorinių mazgų išgyvenimui, tuo tarpu, panašus poveikis stipriai sumažina neuronų skaičių sensoriniuose mazguose, kilusiuose iš nervinės skiauterės. Detalesni *in vitro* tyrimai (Lindsay ir Rohrer 1985, Develop. Biol. 112: 30-48; Davies ir Lindsay, 1985, Develop. Biol. 11:62-72, Lindsay ir kt., 1985, J. Cell. Sci. Suppl. 115-129) aiškiai parodė, kad NGF palaiko daugumos nervinės skiauterės

sensorinių neuronų išgyvenimą, bet nedaro pastebimos įtakos galvos smegenų sensorinių neuronų, kilusių iš nervinių plakodžių išgyvenimą.

Pirmuoju įrodymu BDNF neuroninio specifiškumo, skirtingo nuo NGF aktyvumo, buvo *in vitro* demonstracija, jog valytas BDNF palaiko 40-50% sensorinių neuronų, disocijuotų iš viščiuko embriono E6, E9 arba E12 amžiaus nervinės plakodės mazginio ganglijo (Lindsay ir kt., 1985, J. Cell. Sci. Suppl, 3: 115-123). NGF neturėjo pastebimos įtakos šiems neuronams, veikdamas tiek vienas, tiek ir kartu su BDNF. Vėliau eksplantantų kultūrų tyrimuose buvo parodyta, kad BDNF palaiko aksono išgyvenimą ir ataugimą sensoriniuose mazguose, kilusiuose iš nervinės plakodės, įskaitant klajoklio nervo smilkininį, alkūninį ir ventrolateralinį mazgus (Davies ir kt., 1986, J. Neurosci. 6: 1897-1904), iš kurių nei viename nebuvo aptiktas jautrumas NGF poveikiui. Visuose aukščiau minėtuose tyrimuose NGF antikūnai neturėjo pastebimos įtakos BDNF aktyvumui. Be šių efektų, gautų su periferinių mazgų neuronų kultūromis, buvo aptikta, kad BDNF skatina išgyvenimą ir ląstelių neuroninę diferenciaciją putpelės nervinės skiauterės neuronų kultūrose (Kalcheim ir Geandreau 1988, Develop. Brain Res. 41:79-86).

Iki šio išradimo, nebuvo įmanoma gauti pakankamo kiekio BDNF, imuninės reakcijos sukėlimui, kas stabdė anti-BDNF antikūnų gamybą ir palyginimą su antikūnais prieš NGF pagal jų poveikį į neuronines populiacijas, ir neleido įvykdyti BDNF/NGF eksperimentus su jų kryžmine neutralizacija. Dnes BDNF tyrimai (Kalcheim ir kt., 1987, EMBO 6: 2873; Hofer ir Barde 1988, Nature 331:261-262) vis dėlto parodė BDNF fiziologinę rolę paukščių periferinės nervų sistemos vystymesi. Jei kiaušinyje tarp E3/E4 DRG ir jų CNS taikinio nerviniame vamzdelyje buvo pastatoma mechaninė kliūtis, tai buvo stebimas daugelio DRG neuronų žuvimas (Kalcheim ir Le Donarin 1986, Develop Biol. 116:451-466). Buvo postuliuota, kad šis neuronų žuvimas gali įvykti dėl to, kad CNS (nervinis vamzdelis) neteko neurotrofinio faktoriaus. Vėliau pastebėjo, kad BDNF, pritvirtintas prie padengtos lamininu sialastinės membranos, sugebėjo užkirsti kelią šiam žuvimui (Kalcheim ir kt., 1987, EMBO 6:2871). Buvo aptikta, kad injekcijos į putpelės kiaušinį sumažino natūraliai

vykstančią ląstelių mirtį mazginiuose ganglijuose, kas nebuvo pastebėta su NGF (Hofer ir Barde 1986, Nature 331:261-262). Be šio efekto, gauto su periferiniais sensoriniais neuronais, kilusiais tiek iš nervinės skiauterės tiek ir iš nervinių plakodžių, buvo aptikta, kad BDNF palaiko besivystančių CNS neuronų išgyvenimą. Džonsonas ir kt.(1986, J. Neurosci. 6: 3031-3938) pateikė duomenis, rodančius, kad BDNF palaiko tinklainės ganglijinių ląstelių išgyvenimą kultūrose, pagamintose iš žiurkių E17 embrionų. Tai derinasi su ankstesniais tyrimais, parodančiais, kad kondicinės terpės ir smegenų ekstraktai paruošti iš sričių-taikinių, inervuojamų tinklainės ganglijinių ląstelių, palaiko šių neuronų išgyvenimą (Mecaffery ir kt., 1982, Ex. Brain Res. 48:37-386; Sartley ir kt., 1983, J. Neurosci 3:2532-2544; Turuer ir kt., 1983, Dev. Brain Res. 6:77-83).

Be šio poveikio į besivystančių neuronų išgyvenimą kultūrose, parodyta, jog BDNF veikia suaugusius periferinės ir CNS neuronus jų kultūrose. BDNF kaip ir NGF stimuliuoja aksonų regeneraciją suaugusios žiurkės DRG neuronų kultūroje (Lindsay 1988, J. Neurosci 8:2394-2405), nors suaugę sensoriniai neuronai nereikalauja neurotrofinių faktorių savo palaikymui *in vitro* 3 arba 4 savaitių bėgyje. Be to, suaugusios žiurkės tinklainės kultūrose pastebėta, kad BDNF skatina tinklainės ganglijinių ląstelių išgyvenimą ir aksonų tįsimą (Thonos ir kt., Eur. J. Neurosci 1:19-26). NGF ir BDNF biologinių poveikių palyginimas pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė

BDNF ir NGF* biologinių aktyvumų palyginimas

		Išgyvenimas **	
Periferinė nervų sistema		BDNF	NGF
(I)	E6 viščiuko DRG	-	++
	E10 viščiuko DRG	-	++
	E12 viščiuko simpatiniai neuronai	-	++
(II)	E6-E12 viščiuko DRG	++	++
	E6-E12 viščiuko mazginis g.	++	-

	E12 viščiuko simpatiniai neuronai	-	++
	E12 viščiuko krumplinis mazgas	-	-
	(Lindsay ir kt., 1985, žr. aukščiau)		
(III)	E3-E14 viščiukas:		
	kaklo	+/++	++
	DM-trišakis	+/++	++
	smilkininis	+/++	-
	alkūninis	+/++	-
	VL-trišakis (ventrolateralinis)	++	-
	prieanginis	-	-
	mezencefalinis	++	-
	(Davies ir kt., 1986, žr. aukščiau)		
	(Barde ir kt., 1987, Proc. Natl. Res. 71:185-189)		
	Centrinė nervų sistema		
(I)	E17 žiurkės tinklainės ganglijinės ląstelės	++	-
	(Johnson ir kt., 1986, J. Neurosci. 6:3031-3038)		

* publikacijų chronologine tvarka, *in vitro* aptikti efektai

** išgyvenimo nėra (-), vidutinis išgyvenimas (+), geras išgyvenimas (++)

2.3.2. Smegenų neurotrofinio faktoriaus neuroniniai taikiniai

Buvo aptikta, kad periferinių nervinių mazgų sensoriniai neuronai yra kilę iš dviejų skirtingų laikinų embriologinių darinių, būtent, iš nervinės skiauterės ir nervinių plakodžių. Nervinė skiauterė duoda pradžią autonominių mazgų ir nugaros smegenų sensorinių mazgų neuronams bei satelitinėms ląstelėms t.y. DRG. Nervinės skiauterės ir nervinių plakodžių indėlis galvinių nervų sensorinių mazgų susidarymui buvo tyrinėjamas, naudojant putpelės/viščiuko chimerinę transplantavimo sistemą pagal Le Donarin (1973, Develop. Biol. 20: 217-222; Noden 1987, Develop. Biol. 67: 313-329; Narayanan ir Narayanan 1980, Anat. Rec. 196: 71-82; Ayer - Le Liuze ir Le Donarin 1982, Develop. Biol. 34: 291-310; D'Amico-Maratel ir Noden 1983, Am. J. Anat. 166: 445-468). Kaip nurodyta

Lindsay ir kt. apžvalgoje (1985, J.Cell. Sci. Supp. 3:11-129), dabar manoma, bent jau paukščių atveju, kad aštunto, devinto ir dešimto galvinių nervų distalinių mazgų neuronai (alkūninis, smilkininis ir mazginis ganglijai, atitinkamai) ir aštunto galvinių nervo vestibulioakustinio komplekso neuronai yra kilę tik iš nervinių plakodžių. Trišakinis mazgas penkto galvinio nervo turi neuronus tiek skiauterinės tiek ir plakodinės kilmės (su plakodinės kilmės neuronais, vyraujančiais viršutinio ir apatinio žandų skilčių ventrolateraliniame poliuje), tuo tarpu visų galvos mazgų satelitinės ląstelės kilusios iš skiauterės.

In vitro eksperimentuose, naudojant tiek ir eksplantantus tiek ir disocijuotas, praturtintas neuronais, nugaros smegenų ir galvinių nervų sensorinių neuronų kultūras, buvo aptikta, kad sensoriniai neuronai, kilę iš nervinės skiauterės, reaguoja į NGF, o neuronai, kilę iš plakodžių (tame tarpe ir neuronai iš ventrolateralinės dalies nervo trišakinio mazgo ir visą neuroninę populiaciją prieanginio, alkūninio, smilkininio ir mazginio ganglijų) embrioninio vystymosi metu pagrinde buvo nejautrūs NGF. Nežiūrint į jų skirtumus poreikiuose ir jautrume į NGF, tiek plakodiniai, tiek ir skiauteriniai sensoriniai neuronai, kaip buvo aptikta, reaguoja į BDNF, skatinantį išgyvenimą ir aksonų augimą (Lindsay ir kt., 1985, J.Cell. Sci. Supp. 3:115-129; Lindsay ir kt. 1985, Develop. Biol. 112:319-328; Kalcheim ir Geandreau 1988, Develop. Brain Res. 41:79-86). Tebar ir Barde (Tebar ir Barde 1988, J. Neurosci 8: 3337-3342) tyrinėjo, kaip vištos embriono dorsalinės šaknelės mazgo neuronai suriša žymėtąjį radioaktyvųjį BDNF; šie rezultatai derinasi su dviejų BDNF receptorių klasių egzistavimu, viena - su dideliu afiniškumu BDNF, kita - su mažu afiniškumu. Simpatiniuose neuronuose receptorių su dideliu afiniškumu neaptikta.

Žinomi neuroniniai BDNF taikiniai toliau buvo nagrinėjami Barde ir kt. apžvalgoje (1987, Prog. Brain Res. 71:185-189). Iki šio išradimo, ląstelių, sintetinančių BDNF, identifikacija buvo neįmanoma, kadangi nebuvo nukleino rūgščių ar antikūninių zondu, kurie yra specifiniai BDNF. Bandymai paruošti poli- arba monokloninius antikūnus prieš BDNF nepavyko. Ši nesėkmė antikūnų gavime neleido atlikti molekulinio BDNF klonavimo, nustatyti fiziologinį

veikimą, vykstantį neuronuose *in vivo*, pašalinus iš jų BDNF, kiekybinio BDNF nustatymo audiniuose nustatymo, naudojant imunobandymus, ir atlikti BDNF lokalizaciją, naudojant imunocitochemiją.

II lentelė

Reaguojančių ir nereaguojančių į BDNF neuronų sąrašas*

- | | |
|-----|---|
| | A. Reaguojantys neuronai |
| I | Viščiuko sensoriniai neuronai, kilę iš skiauterės: |
| | a) dorsalinės šaknelės mazge, |
| | b) kaklo mazge |
| | c) dorsomedialiniame trišakio nervo mazge |
| | d) mezencefaliniame trišakiame branduolyje**. |
| II | Viščiuko sensoriniai neuronai, kilę iš ektoderminės |
| | plakodės: |
| | a) mazginiame ganglijuje |
| | b) prieanginiame mazge |
| | c) smilkininiame mazge |
| | d) alkūniniame mazge |
| | e) ventrolateraliniame trišakio nervo mazge |
| III | Žiurkės tinklainės ganglijinės ląstelės |
| | B. Nereaguojantys neuronai |
| I | Žiurkės ir viščiuko simpatiniai neuronai |
| II | Viščiuko parasimpatiniai krūmplyniniai neuronai |

*iš Barde ir kt., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189

**žr. Davies ir kt., 1986, Nature 319: 497-499

3. Trumpas išradimo aprašymas

Šis išradimas susijęs su nukleino rūgščių sekomis, koduojančiomis smegenų neurotrofinių faktorių (BDNF), su išgrynintu baltymu, o taip pat su peptidiniais fragmentais arba dariniais, dideliais kiekiais gaunamais iš jo, ir su antikūnais, nukreiptais prieš BDNF baltymą, peptidinius fragmentus ir darinius. Šis išradimas pirmą kartą leidžia gauti pakankamus BDNF kiekius, kurių pagalba

galima būtų gaminti anti-BDNF antikūnus ir palaikyti diagnostinį ir terapinį BDNF panaudojimą.

Įvairiuose išradimo įkūnijimuose, BDNF nukleino rūgštys, baltymai, peptidai, dariniai ir antikūnai, gauti pagal šį išradimą, gali būti panaudojami įvairių nervinių ligų ir sutrikimų diagnostikos ir gydymo metoduose, ir, atskirai imant, diagnostikoje ir gydyme sutrikimų, susijusių su sensoriniais neuronais, o taip pat tinklainės degeneracija. Be to, tam tikruose išradimo įkūnijimuose, BDNF nukleino rūgštys ir BDNF genų produktai gali būti panaudoti neuroblastominių navikų, Parkinsono ir Alchaimerio ligų diagnostikai ir gydymui. BDNF genų produktai papildomuose specifiniuose išradimo įkūnijimuose, taip pat, gali būti panaudoti implantantų įjungimo į nervinį audinį palengvinimui, arba, atvirkščiai, nervinės regeneracijos skatinimui po pažeidimų, sukeltų traumos, infarkto, infekcijos ir chirurginio įsikišimo (po operacijos).

Išradimas taip pat susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, turinčiomis veiklų kiekį BDNF genų produktų arba, iš kitos pusės, su antikūnais, nukreiptais prieš BDNF genų produktus, ir kurie gali būti panaudoti įvairių nervinių ligų ir sutrikimų diagnostikai ir gydymui.

Papildomai, pateikdamas pilną BDNF nukleotidinę seką, šis išradimas leidžia sulyginti BDNF ir NGF genus, tuo pačiu identifikuoti homologinius fragmentus ir apibrėžti BDNF/NGF geninę šeimą. Atitinkamai, šis išradimas susijęs su BDNF/NGF genetinės šeimos papildomų narių identifikacijos būdu. Konkrečiame įkūnijime, šis būdas pagal išradimą, naudojamas naujo, ne BDNF ir ne NGF nario iš BDNF/NGF genetinės šeimos identifikacijai. Toliau išradimas palaiko naujus narius iš BDNF/NGF genų šeimos, nustatytus pagal aprašytą būdą, o taip pat jų genų produktus.

3.1. Sutrumpinimai ir jų reikšmės

BDNF	smegenų neurotrofinis faktorius
hBDNF	žmogaus BDNF
CAT	cholinacetiltransferazė
CNS	centrinė nervų sistema
DRG	dorsalinės šaknelės mazgas (mazgai)

EDTR	etilendiamintetraacto rūgštis
NGF	nervinio augimo faktorius
PFS	fiziologinis tirpalas buferizuotas fosfatu
PCR	grandininės polimerizacijos reakcija
RNG	periferinė nervų sistema
SDS	natrio dodecilsulfatas
Tris	3 - (hidroksimetil)aminometanas

4. Brėžinių aprašymas

Fig.1. nukleotidinė seka ir iš jos išvesta aminorūgščių seka kiaulės prepro BDNF kDNR. Šioje fig. parodyta dviejų persidengiančių kDNR klonų pilna seka. Pabrauktos peptidinės sekos, gautos mikrosekvenavimo būdu (III lentelė). Vienintelė N-glikozilavimo konsensuso seka, pabraukta dviem linijomis. Subrendusios BDNF sekos pradžia pažymėta dviem žvaigždutėmis.

Fig. 2. NGF ir BDNF sekų palyginimas

Pažymėtos sritys, su daugiau kaip dviem aminorūgštimis, aptiktomis identiškosiose vietose. Šios sekos prasideda nuo subrendusių baltymų pirmųjų aminorūgščių ir baigiasi su paskutinėmis aminorūgštimis prieš stop-kodonus. 51 aminorūgštis yra bendros BDNF ir įvairioms NGF (Schwarz ir kt., 1989, J. Neurochem. 52:1203-1209) tame tarpe šešios cisteino liekanos.

Fig. 3. Žmogaus, beždžionės, žiurkės, pelės, šuns, karvės, triušio, viščiuko ir mielių genominės DNR, hibridizuotos su žymėtais 32P NGF ir BDNF zondais, Eco RI pjūvio southern-blotingo autoradijografija.

Fig. 4. Northern-blot analizė. Iš kiekvieno audinio panaudota po 20 µg bendros RNR kiekvienam takeliui ir sukryžmintas su pelės BDNF 32P-žymėtuojančiu kRNR zonu. Smegenų audinyje, skirtingai nuo kitų septynių audinių, stiprus signalas matomas apie 1,45 kD.

Fig. 5. Žmogaus BDNF kDNR seka ir iš jos išvesta aminorūgščių seka, bei kiaulės, žiurkės ir viščiuko DNR sekų palyginimas.

Fig. 6 . BDNF ekspresuojanti plazmidė pCMVI - pBDNF.

Fig. 7. (a) Antiserumo susirišimo su B5 peptidu rezultatai, nustatyti ELISA pagalba, panaudojant serijinį antiserumų skiedimą.

b) Kiekybinis susirišimo nustatymas, skiedžiant 1:500 įvairius antiserumus su 50 ng BDNF.

Fig. 8. Apdorotų su BDNF (punktyrinės linijos) ir kontrolinių (ištisinės linijos) kultūrų, iš ventralinių vidurinių smegenų, imunohistocheminio dažymo, tirozinhidroksilazės pagrindu, rezultatai.

Fig. 9. Ventralinių vidurinių smegenų kultūrų sunaudojamas dopaminas. Kultūros su BDNF pažymėtos punktyrinėmis linijomis, kontrolinės kultūros pažymėtos ištisinėmis linijomis.

Fig. 10. (a) BDNF poveikis į keletą CAT teigiamų ląstelių iš galinių smegenų cholinerginių neuronų kultūrų.

(b) Galinių smegenų cholinerginių neuronų kultūras, turinčias tankį 260000 ląstelių (juoda juosta) arba 150000 ląstelių (punktyrinė juosta) į duobutę, apdorojo su 150 ng/ml NGF. Buvo palyginti CAT imunoteigiamų ląstelių kiekiai tarp apdorotų ir neapdorotų su NGF ląstelių.

Fig. 11. CAT fermentinio aktyvumo pokyčiai galinių smegenų cholinerginių neuronų kultūrose, išreikšti pikomoliais substrato, katalizuojamo per minutę, kaip funkcija nuo BDNF koncentracijos,

Fig. 12. Astroglijos ląstelių kultūros, su apytiksliai 60% sukibimu, buvo veikiamos (a) epiderminio augimo faktoriumi arba (b) BDNF 46 valandas, o po to inkubuojamos su [³H] metiltimidinu. Prijungto [³H] kiekis matuotas EGF ir BDNF koncentracijų atžvilgiu (EGF epiderminio augimo faktorius).

Fig.13. Viščiuko, pelės, žiurkės BDNF/NGF, kryžmintų su RIB/20 zondų, EcoRI pjūvių southern-blotingas. NGF ir BDNF genų Eco RI fragmentų padėtys, pažymėtos kaip N ir B atitinkamai.

Fig. 14. BDNF ir NGF sekų palyginimas su nauju BDNF/NGF genų šeimos nariu, identifikuotu panaudojant PCR reakciją pelės DNR su praimeriais boksas 3/boksas 4: naujas genas (čia žymimas M3-4), o taip pat žinomas kaip neurotrofinas 3 (NT-3); rodantis tik koduojančio siūlo seką, o taip pat išvestą aminorūgščių seką, palyginimui su pelių subrendusiu NGF ir su kiaulės, žiurkės, pelės arba žmogaus subrendusiu BDNF. Brūkšnelis reiškia pozicijas, kuriose panaudota delecija vieno kodono iš NGF tam, kad optimizuoti palyginimą

BDNF ir M3/4 atžvilgiu. Rašytiniu šriftu nurodyti sutapimai aminorūgščių sekoje ir/arba konservatyvūs aminorūgščių pakeitimai.

Fig. 15. Žmogaus navikų įvairių linijų ląstelių RNR, hibridizuotos su žmogaus BDNF zondų, northern-blotingas.

Fig. 16. Amonio rago neuronų BDNF mRNR lygių depoliarizacijos efektas.

(a) BDNF mRNR ekspresija laike pirminėse amonio rago neuronų kultūrose, esant 50 mM kalio chlorido. Bendrąją ląstelinę RNR ekstrahavo iš $0,5 \times 10^6$ ląstelių, glikozilino ir analizavo elektroforezės ant 1,3% agarinio gelio pagalba (Biziere, K. ir Coyk, T. Neurosci., 1978, Lett. 8:303; McGeer ir kt., 1978, Brain Res. 139:381). RNR, pernešta ant filtrų Hybond N- kryžmino su ^{32}P -žymėtuju kRNR zondų (specifinis aktyvumas 109 cpm/ μg), kuris yra specifinis pelės BDNF ir gautas nubėgančios transkripcijos pagalba *in vitro*. Dvi viršutinės juostos atitinka (4 ir 1,5 kD) BDNF mRNR; dvi BDNF juostos (4 kb ir 1,5 kb) yra ribonukleazėi-A-atsparios ir atitinka du skirtingus transkriptus, kurie, tačiau, yra reguliuojami vienodu būdu, o apatinė juosta (700 b) atitinka 10 pikogramų trumpos BDNF mRNR standartinės išėigos, kuri buvo pridėta į pavyzdžius prieš RNR ekstrakciją.

(b) Priklausomybė nuo kalcio. Neuronus inkubavo 3 valandas normalioje augimo terpėje (CM), modifikuotoje terpėje be kalcio (-Ca) arba terpėje su 10 mM nifedipino (NIF). Kur nurodyta (+K), ten buvo pridėta 50 mM KCl.

Fig. 17. NGF mRNR lygio pakėlimas amonio rago neuronuose kalio ir kaininės rūgšties pagalba. Neuronai buvo inkubuojami 3 valandas kontrolinėje terpėje (C) arba esant 50 mM kalcio chlorido (+K) arba 25 μM kaininės rūgšties (KA). RNR ekstrahavo ir nustatė NGF mRNR lygį kiekybinės PCR reakcijos (H) pagalba. Duoti įvertinimai: vidurkis $\pm$.

Fig. 18. Dozė-reakcija kreivė, rodanti kaininės rūgšties poveikį. Amonio rago neuronus inkubavo 3 val. prie įvairių kaininės rūgšties koncentracijų. RNR ekstrahavo ir analizavo kaip aprašyta Fig.16 Įvertinimai tai vidurkis $\pm$ SEM iš trijų eksperimentų.

Fig. 19. BDNF ir NGF mRNR lygio padidėjimo, sukkelto apdoravimo kainine rūgštimi, priklausomybė nuo laiko. Bendrąją ląstelinę RNR ekstrahavo ir

analizavo kaip aprašyta Fig.16, iš amonio rago (a) arba žievės (b) nurodytais laiko momentais (valandomis) po kaininės rūgšties (12 mg/kg) injekcijos į pilvo ertmę. Vieną vienkartinę dozę diacepamo (10 mg/kg) įvesdavo injekcijos pagalba praėjus 90 min. po kaininės rūgšties (dvi BDNF juostos (4 kb ir 1,5 kb) yra ribonukleazei A atsparios ir atitinka du skirtingus transkriptus, kurie, tačiau, yra reguliuojami panašiu būdu). Parodytos reikšmės atitinka 1,5 kb BDNF mRNR (o) ir 1,3 kb NGF mRNR (o). Panašus lygio padidėjimas buvo gautas su 4 kb BDNF mRNR. Duotos piešinyje reikšmės atitinka vidurkį $\pm$ SEM iš 3-4 eksperimentų.

Fig. 20. Antikonvulsantų poveikis į kaininės rūgšties sukeltą BDNF mRNR ekspresiją. Žiurkėms į pilvo ertmę suleisdavo (10 mg/kg) diacepamo (DZ), MK-801 (1 mg/kg) (MK) arba ketamino (20 mg/kg) (KET) 15 min. prieš kaininės rūgšties injekciją (12 mg/kg) (+Ka) arba fiziologinio tirpalo (kontrolė). Po 3 val. amonio rago audinys buvo panaudojamas bendrosios RNR išskyrimui, kaip nurodyta Fig.16 Duotos piešinyje reikšmės atitinka vidurkį $\pm$ SEM iš 3 eksperimentų.

Fig. 21. Pertvarinės ląstelių kultūros. A-fazokontrastinė ląstelių augimo kultūroje, priklausomai nuo laiko, mikrofotografija. Ląsteles patalpindavo į lėkštelę su tankiu $1,3 \cdot 10^5$ ląstelių cm^2 ir palaikydavo 5 HS/NS, kaip aprašyta tekste. Nurodyti laiko momentai: A, C - 1 diena, C, D - 2 dienos ir D, F - 4 dienos.

Specifiniai ląstelių tipams markeriai buvo panaudoti ląstelių populiacijų, ACL histochemiškai nudažytų neuronų (G, H) ir NGF receptoriams imunoteigiamų neuronų (I), identifikacijai. Skalės mastelis - 25 μm .

Fig. 22. Disocijuotų pertvarinių ląstelių reakcijų į poveikį su BDNF ir NGF palyginimas, remiantis AChE kiekiu ląstelėse.

A. Reakcijų į BDNF (25 ng/ml), NGF (50 ng/ml) arba į abiejų ligandų derinį, esant įvairiems tankiams lėkštelėse, palyginimas.

B. Cholinerginių neuronų reakcijų į įvairias BDNF ir NGF koncentracijas (nuo 0 iki 50 ng/ml) palyginimas. Ląstelės, su kuriomis buvo gauti šie rezultatai, buvo auginamos 11-12 dienų terpėje, turinčioje sieros. Duotos piešinyje reikšmės atitinka vidurkį $\pm$ SEM iš 6-9 eksperimentų.

Fig. 23. Stulpelinis grafikas, atvaizduojantis BDNF ir NGF pridėjimo užlaikymo įtaką į disociavusias pertvaros kultūras. BDNF (50 ng/ml) ir NGF (50 ng/ml) pridėdavo į disociavusias ląstelių kultūras su 5-6 valandų (+12), 5 dienų (-5/+7) arba 7 dienų (-7/+5) užlaikymu. Kultūros buvo palaikomos 12 dienų. Ląstelės suskaičiuodavo remdamiesi teigiamu histocheminiu dažymu. Rezultatai išreikšti kaip vidurkis $\pm$ SEM iš 4-5 pakartojimų.

Fig. 24. Stulpelinis grafikas, atvaizduojantis BDNF ir NGF sugebėjimą reguliuoti NGF receptoriams imunoteigiamų ląstelių kiekį. NGF receptorių imuninis tyrimas buvo atliktas su monokloniniu antikūnu 192-IgG prie skiedimo 121000. Disocijuotas pertvaros ląsteles patalpindavo į indą su tankiu $1,3 \times 10^5$ ląstelių į kv. cm ir veikdavo be pertraukos 12 dienų. Lyginimas buvo atliekamas tarp įsotintos NGF dozės ir įvairių BDNF dozių (nuo 0 iki 100 ng/ml). Pateikti vidurkiai $\pm$ SEM iš 4 pakartojimų.

Fig. 25. Pertvaros cholinerginių neuronų reakcijos į BDNF (A) ir NGF (B) dozes, sukeliančias CAT aktyvumą. Kultūras patalpindavo į lėkšteles, padengtas poliornitinu ir lamininu, su 6 mm duobutėmis ir palaikydavo 12 dienų su 5 HS/NS. Ląstelės buvo veikiamos su BDNF ir NGF praėjus 5-6 valandoms po patalpinimo į lėkštelę. Faktorių pakeisdavo kas 3 dienas, kai keisdavo terpę. Parodyti vidurkiai $\pm$ SEM iš 5-6 pakartojimų.

Fig. 26. AChE fermentinio aktyvumo priklausomybė nuo BDNF ir NGF dozių. Žiurkės pertvaros cholinerginiai neuronai buvo auginami 12 dienų terpėje, turinčioje sieros, su hormoniniais priedais. Ląstelės buvo veikiamos su BDNF (tušti kvadratai) ir NGF (užpildyti kvadratai), kaip aprašyta Fig. 25. Pateikti vidurkiai $\pm$ SEM iš 6-9 pakartojimų. AChE aktyvumas nepaveiktose kultūrose buvo $16,4 \pm 2$ nmolio (HR) duobutė.

Fig. 27. CAT fermentinio aktyvumo, sukulto BDNF pagalba, priklausomybė nuo laiko lyginant su aktyvumu, sukeltu NGF pagalba. Laiko, būtino CAT aktyvumo sužadinimui, nustatymą atliko su ląstelėmis, patalpintomis į lėkšteles su tankiu $2,3 \times 10^5$ ląstelių į kv. cm., kurios buvo auginamos skirtingus laiko periodus terpėje, turinčioje sieros ir hormoninių priedų bei egzogeninių faktorių. Ląstelės iš pradžių paveikdavo su BDNF (tušti kvadratai) ir NGF

(užpildyti kvadrateliai) praėjus 5-6 valandoms po patalpinimo į lėkšteles. Rezultatai tai aktyvumas paveiktose kultūrose, išreikštas procentais nuo aktyvumo nepaveiktose kultūrose ($n=6$, BDNF 12 dienų $n=3$).

Fig. 28. Glijos ląstelių poveikio į BDNF sugebėjimą sukelti CAT fermentinį aktyvumą palyginimas.

Pertvarinės ląstelės buvo patalpinamos į lėkšteles $2,3 \times 10^5$ ląstelių į kv. cm tankiu. Praėjus 5-6 valandoms po sėjos terpę pakeisdavo arba terpe, neturinčia sieros, arba terpe su siera, kiekvienu atveju, turinčia 1% NS, kaip nurodyta aprašo tekste. 24 valandoms pridėdavo citozin-arabinozidą ($1 \mu\text{M}$), kad dar labiau sumažėtų astrocitų kiekis. Šios kultūros po to palaikomos 12 dienų. Pateikti vidurkiai $\pm$ SEM iš 4 pakartojimų.

Fig. 29. Stulpelinis grafikas, atvaizduojantis BDNF ir NGF poveikį į aukšto afiniškumo cholino sunaudojimo lygį. Cholino suvartojimo tyrimas buvo atliktas su ląstelėmis, laikomomis 11 dienų su tankiu $1,3 \times 10^5$ ląstelių į kv. cm. Su BDNF (50 ng/ml) arba NGF (50 ng/ml) buvo veikama visą auginimo periodą. Pateikti vidurkiai $\pm$ SEM iš 5 pakartojimų su BDNF ir 10 pakartojimų su NGF.

Fig. 30. SDS lapas su 35S-žymėtais reakcijos produktais, po žmogaus smegenų neurotrofinio faktoriaus skaldymo su tripsinu ir Arg-G endoproteinaze.

Fig. 31. Grafinis atvaizdavimas bioeksperimento su DRG, lyginančio nepaveiktą CHO-hBDNF ir suskaldytą endoproteinaze CHO-hBDNF. Aksonų ataugimas buvo įvertinamas skalėje nuo 0 iki 5, žyminčiais maksimalų bioaktyvumą.

Fig. 32. E14 žiurkių ventralinių mesencefalinių disocijuotų ląstelių kultūrų, nudažytų po 9 dienų auginimo su monokloniniu antikūnu prieš tirozinhidroksilazę (TH), fotomikrografijos, fazokonstrastinė (A) ir šviesos lauke (B,C).

A ir B. To paties lauko fazokonstrastinė ir šviesos lauko fotografijos, rodančios mažą TH+ neuronų skaičių šiose kultūrose. Tik vienas TH+ neuronas (strėliukė) matosi lauke, turinčiame daug fazoryškių neuronų su ilgais aksonais. Akivaizdžiai matosi keletas ne neuroninių ląstelių remiantis morfologija, arba dažant su GFAP (neparodyta).

C. Ryškaus lauko fotografija, rodanti 2 TH+ neuronus (mažos strėliukės) lauke, turinčiame apie 98 fazoryškas ląsteles neuroninės morfologijos. Skalės mastelis 100:1 M.

33 pav. E14 žiurkių ventralinių mezencefalinių ląstelių 6-dienų kultūrų stipriai padidintos fotomikrografijos, rodančios skirtingą TH+ neuronų morfologiją, kai kurie iš jų su ekstensyviu aksonų augimu ir labai išvystytais augimo konusais (A, B). Kultūros buvo sukurtos ir nudažytos kaip aprašyta Fig. 32. paaiškinime. Skalės mastelis = 25 μ m.

Fig. 34. BDNF pagerina TH+ dopaminerginių mezencefalinių neuronų išgyvenimą kultūrose, priklausomai nuo dozės, kas akivaizdžiai matosi kultivuojant su trijų dienų periodais.

A. Palyginimas TH+ neuronų skaičiaus kultūrose iš E14 žiurkių ventralinių mezencefalinių ląstelių, veikiamų su BDNF (ištininė linija) arba be BDNF (punktyrinė linija). Paveiktose kultūrose, BDNF (50 ng/ml) pridėdavo vieną kartą antrą auginimo dieną. Trečią dieną nebuvo aptikta skirtumo tarp kontrolės ir paveiktų kultūrų, bet 8-tą dieną TH+ neuronų kiekis paveiktose su BDNF kultūrose buvo didesnis 1,8 karto už kontrolę. Įvertinimai duoti kaip vidurkis iš dviejų pavyzdžių.

B. BDNF poveikis į TH+ neuronų išgyvenimo pagerėjimą priklauso nuo dozės. TH+ neuronų kiekį nustatydavo dvigubose kultūrose po 8 dienų auginimo terpėje be BDNF arba terpė turėjo didėjančias koncentracijas BDNF, pridėto antrą dieną.

C. NGF neturėjo įtakos į TH+ neuronų išgyvenimą. Kad įvertinti BDNF specifiškumą, kultūras taip pat auginavo veikdami su arba be NGF (50 ng/ml), 8 dienas ir analizavo TH+ ląsteles. NGF, pridėtas antrą dieną, nepadidino TH+ neuronų išgyvenimo kultūrose, patikrintose 6-tą ir 8-tą dieną. Pateikti rezultatai tai vidurkiai iš dviejų lėkštelių.

Fig. 35. Pakartotinos BDNF dozės dar labiau padidina TH+ neuronų išgyvenimą, lyginant su vienkartinio BDNF pridėjimu antrą dieną. Kultūras paruošdavo kaip aprašyta tekste. Rekombinantinį žmogaus BDNF išvalydavo iš COS M5 ląstelių supernatantą. Kultūras paveikdavo arba vieną kartą pridėdami

(SA, punktyras) BDNF (50 ng/mM) antrą dieną arba pasikartojančiomis BDNF dozėmis (50 ng/ml) 1, 2, 4 6 ir 8-tą dienomis (MA-daugkartiniai pridėjimai; ištisinė linija) arba augino be BDNF (kontrolė; tuščios juostos). Nurodytu laiku kultūros buvo fiksuojamos ir nudažomos TH imunoaktyvumo nustatymui.

BDNF papildymai daugkartiniais pridėjimais 2,7 karto padidino TH+ neuronų kiekį 11-tą dieną lyginant su kontrole, tuo tarpu, maksimalus padidėjimas, gautas vieną kartą pridėjus BDNF, buvo šiek tiek mažiau nei du kartai po 11 dienų. Pateikti tipiški keliems eksperimentams vidurkiai iš dviejų pavyzdžių.

Fig. 36. Užvėlintas BDNF pridėjimas nepadidindavo TH+ neuronų kiekio tokiu laipsniu kaip pridėjimas antrą dieną. Kultūras paruošdavo kaip aprašyta tekste, išskyrus egzogeninio BDNF pridėjimo laiko momentus. Antrą dieną visos kultūros buvo perkeltos į neturinčią sieros terpę ir buvo pridedamas BDNF (50 ng/ml, kiaulės galvos smegenų BDNF) tik vieną kartą antrą arba penktą arba septintą dieną (CD2, CD5, CD7). Šeštą, aštuntą ir dešimtą auginimo dieną TH+ neuronų kiekis buvo nustatomas dvigubose kultūrose. Šiame eksperimente, vienintelis BDNF pridėjimas antrą dieną TH+ neuronų kiekį 10-tą dieną padidino 3 kartus. Kada BDNF pridėdavo su užlaikymu, penktą dieną, TH+ neuronų kiekio padidėjimas 10-tą dieną, lyginant su kontrole, buvo mažesnis nei 2 kartai, ir šis TH+ ląstelių kiekio skirtumas tarp paveiktų ir kontrolinių kultūrų nekilo toliau tęsiant kultivavimą. Kontrolė - tuščios juostos, BDNF pridėjimas antrą dieną - punktyras, BDNF pridėjimas penktą dieną - ištisinė linija, BDNF pridėjimas septintą dieną - diagonalinės punktyrinės linijos.

Fig. 37. Priklausomas nuo dozės BDNF poveikis į aukšto afiniškumo GABA suvartojimą amonio rago kultūrose. Į kultūras pridėdavo dalinai išgrynintą, skirtingų skiedimų hBDNF (rotofor-išvalytą iš COS M5 supernatantų). Buvo aptikta, kad prie skiedimo 1×10^{-2} BDNF maksimaliai skatina aksonų ataugimą viščiuko E8 dorsalinės šaknelės mazguose. Aukšto afiniškumo ^3H -GABA suvartojimą matavo praėjus 8 dienoms po apdorojimo su BDNF *in vitro*.

Fig. 38. BDNF apsaugo juodosios medžiagos dopaminerginius neuronus, auginamus kultūroje, nuo neurotoksinio MPP+ poveikio. Kultūros buvo kuriamos iš E14 žiurkių embrionų kaip aprašyta prie Fig.1 Po 24 val. *in vitro* auginimo, terpę pakeisdavo į terpę, neturinčią sieros. Po 3 dienų auginimo, šios kultūros buvo suskirstomos į 4 grupes, po 6 lėkšteles (35 mm) kiekvienoje. Viena grupę laikė kaip kontrolę, o kitas veikė su: (I) 10 ng/ml pagrindinių fibroblastų augimo faktoriumi (BFGF, jaučio galvos smegenys), Boerninger-Mannheim; (II) 50 ng/ml pelių NGF ir (III) 50 ng/ml BDNF. Kultūras laikė dar 24 val., o, po to, į tris lėkšteles iš kiekvienos grupės, 48 valandoms, buvo pridedama po 1 μ M MPP+ (Research Biochemicals, Inc., Natick. MA). Šio eksperimento, trukusio viso 6 dienas, pabaigoje visos lėkštelės buvo apdorotos TH imunoreaktyvumo nustatymui ir kiekvienoje grupėje buvo nustatytas TH+ ląstelių kiekis. Pateikti duomenys atspindi TH+ neuronų kiekį po apdorojimo su MPP+, kuris buvo apskaičiuotas procentais nuo TH+ neuronų kiekio panašiose kultūrose, negavusiose MPP+. Pateikti vidurkiai $\pm$ SEM iš trijų kultūrų.

5. Detalus išradimo aprašymas

Šis išradimas susijęs su nukleino rūgščių sekomis, koduojančiomis smegenų neurotrofinį faktorių (BDNF), o taip pat su BDNF baltymu, peptidiniais fragmentais ir dariniais, gaunamais dideliais kiekiais panaudojant šias nukleino rūgščių sekas. Be to, išradimas susijęs su farmakologinėmis kompozicijomis ir terapiniais BDNF taikymais, pirmą kartą aprūpindamas priemonėmis, leidžiančiomis gaminti pakankamus kiekius pagrinde gryno BDNF klinikiniams taikymams. Išradimas taip pat apie antikūnus, nukreiptus prieš BDNF arba jo fragmentus, ir pateikia būdą pakankamo imunogeno kiekio gavimui. Toliau, suteikdamas galimybę palyginti BDNF ir NGF nukleino rūgščių sekas, šis išradimas leidžia identifikuoti BDNF ir NGF nukleino rūgščių sekų homologines sritis, tuo pačiu, apibrėždamas BDNF/NGF geninę šeimą. Išradimas pateikia papildomų šios genų šeimos narių identifikacijos ir išskyrimo būdą.

Aprašymo aiškumui, bet nenorint sumažinti išradimo apimties, toliau jis aprašomas šiuose skyriuose:

(I) BDNF valymas

- (II) BDNF bioeksperimentai
- (III) BDNF baltymo mikrosekvenavimas
- (IV) DNR, koduojančios BDNF, klonavimas
- (V) BDNF ekspresija
- (VI) BDNF genai ir baltymai
- (VII) anti-BDNF antikūnų gavimas
- (VIII) BDNF/NGF genų šeimos papildomų narių identifikacija
- (IX) išradimo nauda (pritaikymo galimybės)
- (X) farmacinės kompozicijos

5.1. Smegenų neurotrofinio faktoriaus valymas

Tam, kad identifikuoti BDNF koduojančią nukleino rūgštį, iš audinių galima išgauti mikrogramus BDNF baltymo, iš kurio galima nustatyti aminorūgščių seką, kurią, po to, galima naudoti oligonukleotidinių zondu kūrimui. Kadangi BDNF baltymas yra labai retas, tai aminorūgščių sekos dalis, kurią galima nustatyti, praktiškai labai ribota. BDNF galima išgauti iš kiaulės smegenų Barde ir kt. (1982, EMBO, I:549-553) arba Hofer ir Barde (1988, Nature 331: 261-262) aprašytais būdais.

Geriau išgauti BDNF pagal žemiau pateiktą smulkų būdo aprašymą, kuris pateiktas kaip pavyzdys, o ne tam, kad apriboti išradimo apimtį; šios srities specialistas gali panaudoti įvairias modifikacijas. Dėl BDNF retumo, išgryninimo procese geriau naudoti apie 6 kilogramus smegenų audinio. Smegenų audinys homogenizuojamas natrio fosfato buferyje, esant natrio sulfato koncentracijai 0,2 M ir apytiksliai pH 6, turinčiame 1 mM EDTA ir 1 mM šviežiai pridėto fenilmetansulfonilfluorido, taip kad santykis tarp smegenų audinio ir skysčio būtų 1 kg smegenų 2 litrams skysčio. Po to, gali būti panaudota druskos rūgštis, kad mišinio pH padaryti lygią 4, ir, po to, mišinys gali būti maišomas apytiksliai 2 valandas prie 4°C. Toliau mišinį galima centrifuguoti 25 minutes prie 20000. Po centrifugavimo gaunamas supernatantas, naudojant natrio šarmą jo pH padaromas lygus apytiksliai 6, ir po to sumaišomas su 1 litru, prieš tai išbrinkintos karboksimetilceliuliozės (šešiams kg. smegenų audinio), ir vėl pH sukoreguojamas iki 6, naudojant 0,1 M natrio fosfato tirpalą. Po kelių

praplovimų bendrai paėmus apytiksliai 20 litrų 0,1 M natrio fosfato, pH 6, košelę išpilama į koloną ir praplaunamas tuo pačiu buferiu, turinčiu 0,13 M NaCl, pageidautina iki ryto. Aktyvios frakcijos identifikuotos jautriu BDNF bioeksperimentu (žr. skyrių 5.2) NaCl ir vėliau atliekama dializė, keliomis partijomis, apytiksliai 5 litruose 5 mM kalio fosfato prie pH 6,8. Dializuotos frakcijos po to gali būti patalpintos į hidroksiapatitinę koloną, turinčią sluoksnio tūrį apytiksliai lygų 20 ml kiekvienam pradiniam smegenų audinio kilogramui; hidroksiapatitinėje kolonoje iš anksto turi būti pasiektas pH 6,8, naudojant 5 mM kalio fosfatą, dar prieš įdedant mėginius. Ši kolona po to išplaunama tiesiniame gradientu nuo 500 ml 5 mM kalio fosfato iki 500 ml 700 mM kalio fosfato, abiejuose esant PH apie 6,8. BDNF aktyvumas optimaliai išplaunamas apytiksliai prie 500 mM kalio fosfato koncentracijos. Gautos aktyvios frakcijos vėliau gali būti privestos iki galutinio moliaringumo, apie 700 mM kalio fosfato, ir perkeltos į fenilsefarozinę koloną (turinčią apie 5 ml tūrį kiekvieniems 6 kg pradinio smegenų audinio), su pH 6,8, privestu 700 mM kalio fosfato tirpalu. Po praplovimo su apytiksliai 40 ml to paties buferio, BDNF aktyvumą galima išplauti 0,1 M kalio fosfatu, pH 6,8, o po to BDNF aktyvumą galima dializuoti distiliuotame vandenyje, ir vėliau liofilizuoti. SDS gelio elektroforezės atlikimui su pavyzdžiu, liofilizuota medžiaga patalpinama į buferį, turintį 0,1% SDS, geriau, neturintį merkaptoetanolio, ir po to patalpinamas į SDS gelį su akrilamido gradientu (tiesiniu) nuo 10 iki 25 %. Po elektroforetinio atskyrimo pabaigos gelis gali būti dažomas apie 10 min. su COOMASSIE BLUE, o po to išblukinamas apie 20 min. Juostą, migruojančią citochromo-c markerio lygyje, galima išpjauti ir elektroforetiškai išplauti iš gelio. SDS didžiąja dalimi galima pašalinti pagal Veber ir Kuter (Weber ir Kuter 1971, J. Biol. Chem. 246:4504-4509). Reikia pastebėti, kad, bendru atveju, SDS pašalinamas nepilnai. Sekos nustatymui, BDNF valymo procesas buvo modifikuotas pagal Hofer ir Barde (1988, Nature 331:261-262), taip, kad nenaudojama paskutinėje valymo stadijoje gelio elektroforezės.

5.2. Smegenų neurotrofinio faktoriaus biotyrimai

Pagal šį išradimą gali būti panaudota bet kuri sistema, kokybiškai arba kiekybiškai aptinkanti BDNF aktyvumą. Tokie bioeksperimentai gali būti naudojami gamtinio arba rekombinantinio BDNF identifikacijai ir/arba aktyvumo išmatavimui.

Bet kuris žinomas biotyrimas, aptinkantis BDNF, čia gali būti panaudotas. Pvz., DRG neuronai (vištos embriono dorsalinės šaknelės mazgo) gali būti panaudoti tokiam BDNF tyrimui, kaip aprašyta Barde ir kt. (1980, Proc. Natl. Acad. Sci JAV 77:1199-1205).

Konkrečiai, gali būti surenkami 6-14 dienų vištos embrionų dorsalinės šaknelės mazgai, geriau 10-12 dienų, panaudojant žinomą šioje srityje disekciją, ir nedelsiant patalpinami į nedidelį tūrį terpės F-14 (padaryta iš GIBCO F-12, su priedais pagal Vogel ir kt. - Vogel 1972, Proc. Natl. Acad. Sci JAV, 69:3180-3184), kurią reiktų pasibaigus disekcijai pakeisti į buferizuotą fosfatinį, neturintį Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų fiziologinį tirpalą (PBS), turintį apie 0,1% tripsino. Apytiksliai po 20 min. inkubavimo prie 37° C, šiuos mazgus galima centrifuguoti ir du kartus perplauti F14 terpe, turinčia apie 10% (tūris:tūris) šiluma inaktyvuoto arklio serumo. Šiuos mazgus po to galima išskaidyti švelniu tritūravimu (apie 10-15 aspiracijų) panaudojant mažą, apie 1 mm diametro silikonizuotą Pastero pipetę. Likusius audinio gumulėlius po to geriau pašalinti praleidžiant ląstelinę suspensiją per nailoninį sieta, turintį apie 40 μm diametro poras. Ląstelių suspensiją dabar galima 210 min. patalpinti į indą iš plastikinės medžiagos, kuriame per tą laiką daugelis ne neuroninių ląstelių turi prilipti prie indo plastikinio paviršiaus, palikdamos suspensijoje praturtintą neuronais ląstelių populiaciją. Po to, ląsteles galima praskiesti iki koncentracijos apytiksliai 5×10^3 ląstelių į vieną terpės, esančios inde, milimetrą (geriau terpe F14 su pridėtu 10% tūris:tūris šiluma inaktyvuotu arklio serumu su antibiotikais), ir galima jas išskirstyti į lėkšteles, padengtas poliornitino arba poliornitino/laminino medžiaga (žr. žemiau).

Iš kitos pusės, bet neuždedant apribojimų, BDNF bioeksperimentai, kurie santykinai nejautrūs NGF, gali tam tikrose sąlygose būti geresni už sistemas,

panašias į aukščiau aprašytą DRG sistemą, galinčią, esant sąlygoms, reaguoti ir į BDNF ir į NGF. Santykinai BDNF specifinėje sistemoje turėtų būti tinklainės ganglijinių ląstelių kultūros, o taip pat neuronų, kilusių iš nervinių plakodžių, kultūros.

Perinatalines tinklainės ląsteles galima auginti pagal būdus, aprašytus Johnson ir kt. (Johnson 1986, J. Neurosci. 6: 3031-3038). Pavyzdžiui, tinklainės gali būti pašalintos iš perinatalinio gyvūno (žiurkių atveju terminas „perinatalinis“ žymi periodą nuo 17-os embriono dienos ir toliau iki postnatalinių jauniklių 48 valandų amžiaus), po to tinklainė praplaunama su PBS ir inkubuojama PBS, turinčiame apie 0,05-0,1% tripsino, apie 15 minučių prie apytiksliai 37 °C. Po proteolitinio skaidymo, tinklainė praplaunama F14 terpe, turinčia apie 10% tūris/tūris šiluma inaktyvuoto arklio serumo (F14-HS). Po to tinklainės išskaidomos švelniai išpilstant pipete nedideliame tūryje (apie 1-10 ml) tik pagaminto F14-HS. Neišsiskaidžiusiems audiniams leidžiama nusėsti ir pipetės pagalba ištraukiamos likusios ląstelės ir terpė, skirtos kultūrai.

Iš kitos pusės, BDNF bioeksperimentuose pagal išradimą galima naudoti ląsteles kilusias iš nervinių plakodžių. Embrionų galvinių nervų eksplantantai, pavyzdžiui, ventrolateralinės trišakinio mazgo dalies arba prieanginio, alkūninio, smilkininio ar mazginio mazgo, gali būti auginami kolageno gelyje, padengtame auginimo terpe, kaip aprašė Davies ir kt. (Davies, 1986, J. Neurosci 6 1897-1904), arba išskaidyti pagal Barde (Barde, Proc. Natl. Acad. Sci. 1980, 77:1199-1203).

Kadangi buvo nustatyta, jog reakcija į BDNF gali būti dešimt kartų sustiprinta pakeičiant poliornitino auginimo substratą į laminino-poliornitino substratą (Barde ir kt., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189), eksperimentus su BDNF geriau vykdyti naudojant laminino turinčius substratus. Auginimui paviršiai gali būti paruošiami, pavyzdžiui, (I) 8-10 -iai valandų padengiant juos steriliu poliornitino tirpalu; (II) praplaunant keletą kartų steriliu vandeniu; (III) apytiksliai dviem valandoms padengiant paviršių PBS tirpalu, turinčiu apytiksliai 25 µg/ml laminino (Johnson ir kt., 1986, J. Neurosci 6: 3031-3038).

Bet kurioje biotyrimų sistemoje pagal išradimą, žinomais šioje srityje metodais, galima nustatyti priklausomybės kreivę nuo BDNF dozės. Naudojant išskaidytus viščiuko sensorinius mazgus, buvo aptikta pusė nuo maksimalaus išgyvenimo prie apytiksliai 5 ng/ml valyto BDNF koncentracijos, o maksimalus išgyvenimas - tarp 10 ir 20 ng/ml valyto BDNF (Barde ir kt., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189).

5.3. Smegenų neurotrofinio faktoriaus baltymo mikrosekvenavimas

BDNF baltymo, gauto iš smegenų, seka gali būti nustatyta įprastais metodais, bet reikia pabrėžti, jog dėl jo ypatingo retumo žymi dalis BDNF baltymo sekos negali būti nustatyta patikimai. Galima nustatinėti šio baltymas seką tiesiogiai arba pradžioje suskaldyti panaudojant proteazes arba kitus žinomus šioje srityje junginius, įskaitant, bet neapsiribojant, *Staphylococcus aureus* V8, tripsiną ir cianogenbromidą. Peptidų sekas galima nustatyti panaudojant automatizuotą Edmano degradaciją, pasinaudojant mikrosekvenseriumi su dujine faze, pagal Hewick ir kt. (1981, J.Biol. Chem. 256:7990-7997) ir Hunkapillar ir kt. (1983, Methods Enzymol. 91: 227-236) būdą. Feniltiogidantionin-aminorūgščių aptikimas, po to, gali būti atliekamas pagal Lottspeich (1985, Chromatography 326: 321-327). Galima aptikti persidengiančius sekų fragmentus ir vėliau juos panaudoti ilgesnių fragmentų gretimoje sekoje išskyrimui.

5.4. DNR, koduojančių smegenų neurotrofini faktorių, klonavimas

BDNF retumas stipriai trukdo panaudoti standartinius metodus BDNF genų klonavime. Pavyzdžiui, jei turima baltymo seka panaudota generavimui komplementaraus žymėtojo oligonukleotidinio zondo, o šis zondas panaudotas kDNR, gautų iš audinių, kurie, kaip numanoma, sintetuoja BDNF, bibliotekų skryningui, tai teigiamų klonų kiekis, greičiausiai, bus neįtikėtina mažas. Šis išradimas leidžia klonuoti BDNF geną, panaudojant metodikų derinį, apjungiantį tinkamą BDNF baltymo kiekio išgryninimą, BDNF baltymo mikrosekvenavimą, oligonukleotidinio zondo gavimą, kDNR bibliotekos sukūrimą, amplifikaciją, pagrįstą gautąja BDNF aminorūgščių seka ir, pagaliau, BDNF geno selekciją. Šis būdas pagal išradimą geresniame variante, numato gautų iš audinių nukleino

rūgščių sekų amplifikaciją, panaudojant grandininę polimerazės reakciją (PCR) (Saiki ir kt., 1985, Science 230: 1350-1354), tam kad padidinti BDNF sekų, skirtų klonavimui, kiekį. Žemiau pateiktas smulkus šio būdo aprašymas.

Visų pirma, išvalyto BDNF baltymo aminorūgščių seka panaudojama dedukcijai oligonukleotidinių praimerių, vartojamų PCR reakcijose. Dėl genetinio kodo išsigimimo, keletas nukleotidinių tripletų gali žymėti vieną ir tą pačią aminorūgštį, todėl reikia sintezuoti keletą oligonukleotidų duotai aminorūgščių sekai, kad gauti visą aibę potencialių nukleotidinių sekų; gautieji oligonukleotidai minimi kaip išsigimę praimeriai.

Grandininei polimerazės reakcijai būtinas tiek praimeris su prasminiu siūlu tiek ir antiprasminis praimeris. Atitinkamai, aminorūgščių seka gali būti panaudota kaip praimeris vienam DNR siūlui, o antras praimeris, homologinis paprastai aptinkamai DNR sekai, tokiai kaip atkarpa timidininių liekanų, gaunamų revers-transkripcijos pagalba iš poliadenozininių mRNR uodegų, gali būti naudojami kaip praimeriai antro DNR siūlo. Šie praimeriai vėliau panaudojami polimerazės grandininėje reakcijoje su nukleino rūgščių matrica, kuri, kaip spėjama, turi BDNF koduojančias sekas, tokia kaip genomine DNR arba, geriau, kDNR, gauta iš mRNR, surinktų iš audinių, kurie, kaip numanoma, sintezuoja BDNF. DNR reakcijos produktai po to analizuojami elektroforeze, kad nustatyti ar DNR reakcijos produkto molekulinis dydis sutampa su laukiamu BDNF geno dydžiu ir, geriau, nukleotidų seka.

Tačiau, dėl dviejų išsigimusių praimerių panaudojimo grandininėje polimerazės reakcijoje, padidinančioje amplifikacijos tikimybę toms nukleino rūgščių sekoms, kurios nekoduoja BDNF, labiau priimtinas būdo variantas numato tik vieno išsigimusio praimerio panaudojimą, o kitas praimeris tiksliai atitinka BDNF seką. Kad identifikuoti tikslią BDNF seką, aminorūgščių seka, gauta panaudojant išvalytą BDNF baltymą, panaudojama abiejų išsigimusių praimerių, tiek prasminio tiek ir antiprasminio, konstravimui. DNR reakcijos produktas, gautas panaudojant tuos praimerius PCR reakcijoje, naudojančioje nukleino rūgštį kaip matricą, koduojančią BDNF, yra nukleino rūgšties fragmentas, koduojantis aminorūgščių fragmentą, naudojamą praimerių

sukūrimui, ir jis gali būti numatomo ilgio (t.y. kaip minimum, bazių porų, pagal ilgį, kiekis, kuris apskaičiuojamas dauginant aminorūgščių liekanų kiekį iš trijų). Nustačius DNR reakcijos produkto seką, ją galima palyginti su patvirtinta aminorūgščių seka, kad dar kartą įsitikinti jog amplifikuota nukleino rūgščių seka gali iš tikrųjų koduoti BDNF peptidinį fragmentą. Nors galima panaudoti bet kurį nukleino rūgšties sekos nustatymo būdą, žinomą šioje srityje, tinkamiausias dezoksinukleotidinės grandies nutraukimo būdas (Sanger ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 72: 3918-3921). Sekos nustatymas gali būti atliktas panaudojant išvalytą gelį arba geriau klonuotą DNR reakcijos produktą. Gautoji DNR reakcijos produkto seka gali būti panaudota oligonukleotidinio praimerio, atitinkančio tikslią seką, koduojančią BDNF, sukūrimui. Šis praimeris gali būti panaudotas su antru primeriu, kuris gali būti išsigimęs, tam kad padidinti BDNF sekų kiekį, lyginant su pradžioje patektu tikslios sekos fragmentų kiekiu. Pavyzdžiui, bet nenorint apsiriboti, prasminis praimeris gali atitikti tikslią nukleotidinę BDNF seką, o anti-prasminis praimeris gali būti išsigimusi primeriu, homologiniu sekos sričiai, kuri yra žemiau fragmento su nustatyta nukleotidų seka, pvz., mRNR poliadenozininė dalis, kaip atvirkščiai nuskaityta iš kDNR. Po to, gali reikėti panaudoti panašų būdą kad atstatyti seką aukščiau už fragmentą, su nustatyta nukleotidų seka; pvz., antiprasminis praimeris atitinka tikslią BDNF seką, o prasminis praimeris yra išsigimęs praimeris, homologinis BDNF sekos sričiai, esančiai aukščiau už fragmentą, su nustatyta nukleotidų seka, pvz., 5' poliadenozino galas gali būti prijungtas prie 5' kDNR galo, panaudojant terminalinę dezoksinukleotidtransferazę. Atitinkamai, viso BDNF geno arba mDNR seka gali būti gaunama panaudojant panašią sintezę.

DNR reakcijos produktai gali būti klonuojami, panaudojant bet kurį iš žinomų šioje srityje būdą. Galima panaudoti didelį kiekį žinomų vektorius-šeimininkas sistemų. Tarp galimų vektorių, pavyzdžiui, bet nenorint apsiriboti, yra kosmidės, plazmidės arba modifikuoti virusai, ir vektorinė sistema turi būti suderinama su ląstele-šeimininku. Tokiais vektoriais yra, pavyzdžiui, bet ne apsiribojant, bakteriofagai, tokie kaip išvesti iš liamdos, arba plazmidės, tokios kaip pBR 322, pUC arba Bluescript (Stratagenas) - plazmidiniai dariniai.

Rekombinuotos molekulės į ląstelę-šeimininką gali būti įvedamos panaudojant transformaciją, transfekciją, infekciją, elektroporaciją ir t.t.

BDNF genas įstatomas į klonuojantį vektorių, kuris panaudojamas transformuojant, transfekuojant arba infekuojant atitinkamą ląstelę-šeimininką, kad susigeneruotų daugybė geno sekų kopijų. Tai galima pasiekti atliekant DNR fragmento prijungimą prie klonuojančio vektoriaus, kuris turi komplementarius lipnius galus. Tačiau, jeigu komplementarūs restrikcijos saitai, naudojami DNR fragmentavimui, neegzistuoja klonuojančiame vektoriuje, tai DNR molekulės galai gali būti fermentiškai modifikuoti. Gali pasirodyti naudinga įstatyti endonukleazinio skaldymo restrikcijos saitus ir oligonukleotidinių praimerių, naudojamų grandininėje polimerazės reakcijoje, saitus, kad palengvinti įterpimą į vektorių. Iš kitos pusės, bet kuris norimas saitas gali būti gaunamas prijungiant nukleotidines sekas (linkerius) prie DNR galų; tarp šių prijungtų linkerių gali būti specifinių chemiškai sintezuotų oligonukleotidų, koduojančių restrikcinių endonukleazijų atpažinimo sekas. Kitame būdo įkūnijime, suskaidytas vektorius ir BDNF genas gali būti modifikuoti, panaudojant homopolimerinį priauginimą.

Konkrečiuose įkūnijimuose, ląstelės-šeimininko transformavimas rekombinuotomis DNR molekulėmis, kurios įterpia išskirtą BDNF kDNR geną, arba sintezuota RNR seka, leidžia generuoti daugybę geno kopijų. Tuo būdu, šis genas gali būti gaunamas dideliais kiekiais, auginant transformantus, išskiriant rekombinuotas DNR molekules iš transformantų ir, jei būtina, atstatant įterptą geną iš išskirtos rekombinantinės DNR.

Pagal labiau priimtina išradimo įkūnijimą, kai jau klonas, kilęs iš kDNR ir koduojantis BDNF, sugeneruotas, jis gali būti išskirtas panaudojant standartinę, žinomą technologiją. Pavyzdžiui, žymėtas nukleino rūgščių zondas gali būti gautas iš BDNF klono ir panaudotas nukleino rūgščių hibridizacijos genominių DNR bibliotekų skryningui, panaudojant, pvz., Benton ir Davies būdą (1977, Science, 196:180), kurį jie naudojo bakteriofagų bibliotekoms, ir Grunstein ir Hognes būdą (1975, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 72: 3861-3865), skirtą plazmidžių bibliotekoms. Atstatyti klonai po to gali būti analizuojami

kartografuojant restrikcinius fragmentus ir nustatant nukleotidų seką, naudojant gerai žinomus būdus.

Toliau iš kDNR bibliotekų galima identifikuoti papildomus kDNR klonus, panaudojant sekas, gautas išradime.

5.5. Smegenų neurotrofinio faktoriaus geno ekspresyvumas

Nukleotidinė seka, koduojanti BDNF baltymo ar jo dalį, gali būti įstatoma į tinkamą ekspresyvų vektorių, t.y. vektorių, turintį būtinus elementus įstatytos baltymą koduojančios sekos transkripcijai ir translacijai. Būtinai transkripcijos ir translacijos signalai gali būti gaunami iš gamtinio BDNF geno ir/arba iš jo flanginių sričių. Daugybė vektorius-šeimininkas sistemų gali būti panaudota baltymo koduojančios sekos ekspresijai. Pavyzdžiui, tame tarpe, bet neapsiribojant, sistemos su žinduolių ląstelėmis, infekuotomis virusų (pvz., karvės raupų virusu, adenovirusu ir t.t.); vabzdžių ląstelių sistemos, infekuotos virusų (pvz., bakulovirusu); mikroorganizmai, tokie kaip mielės, turinčios mielinis vektorius, arba bakterijos, transformuotos bakteriofaginės DNR, plazmidinės DNR ar kosmidinės DNR. Šių vektorių ekspresyvumo elementai skiriasi pagal savo jėgą ir specifiškumą. Priklausomai nuo vartojamos vektorius-šeimininkas sistemos, galima panaudoti bet kurį iš daugybės tinkamų transkripcinių ir translacinių elementų.

Bet kuris iš anksčiau aprašytų DNR fragmentų įterpimo į vektorių būdų, gali būti panaudotas konstravimui ekspresyvių vektorių, turinčių chimerinį geną, sudarytą iš atitinkamų signalų, valdančių transkripciją (translaciją), ir baltymą koduojančios sekos. Tarp šių būdų yra DNR *in vitro* rekombinacija ir sintezės technologija, o taip pat *in vivo* rekombinacija (genetinė rekombinacija).

Nukleino rūgščių sekos, koduojančios BDNF baltymą ar peptidinį fragmentą, ekspresija gali būti reguliuojama antra nukleino rūgščių seka, taip kad BDNF baltymas ar peptidai ekspresuojami šeimininke, transformuotame rekombinantinės DNR molekulės pagalba. Pavyzdžiui, BDNF ekspresija gali būti valdoma bet kuriuo promotoriniu/entachanseriniu elementu, žinomu šioje srityje. Tarp promotorių, galinčių valdyti BDNF ekspresiją, yra, pavyzdžiui, bet neapsiribojant tik jais, ankstyvoji promotorinė SV40 sritis (Bernast ir Chambon,

1981, Nature 290:304-310), promotorius, turintis ilgajame 5' gale Raus sarkomos viruso pakartojimą (Yamamoto ir kt., 1980, Cell 22:787-797), herpio timidinkinazės promotorius (Wagner ir kt., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 78: 1440-1445), metalotionino geno reguliuojanti seka (Brinster ir kt., 1982, Nature 296: 39-42), prokariotiniai ekspresyvumo vektoriai, tokie kaip β -laktamazės promotorius (Willa-Kamaroff ir kt., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 75: 3727-3731) arba tac-promotorius (DeBaer ir kt., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 80:21-25), žr. taip pat į Scientific American straipsnį "Useful baltymų from recombinant bacteria"(S.A. 1980, 242:74-94), augaliniai ekspresijos vektoriai, tame tarpe nopalinsintetazės promotorinė sritis (Herrera -Estrella ir kt., Nature 303:209-213) arba žiedinio kopūsto mozaikos ligos viruso RNR 35S promotorius (Gardner ir kt., 1981, Nucl. Acids. Res. 9:2871) ir fotosintetinio enzimo ribulozobifosfatkarboksilazės promotorius (Herrera - Estrella, 1984, Nature 310:115-120), promotoriniai elementai iš mielių arba kitų grybų, tokie kaip Gal4 promotorius, ADC (alkoholdehidrogenazė) promotorius, PGK (fosfoglicerinkinazė) promotorius, šarminės fosfatazės promotorius, ir žemiau išvardintos sritys, valdančios gyvūnų transkripciją, turinčios specifiškumą audiniams ir buvo naudojamos transgeniniuose gyvūnuose: elastazės -I geno valdančioji sritis, aktyvi pankreatinėse acinarinėse ląstelėse (Swift ir kt., 1984, Cell, 38: 639-646; Ornitz ir kt., 1986, Cold Spring Harfor Symp. Qant. Biol. 50:399-409; MacDonald 1987, Hepatology, 7:425-515), insulino geno kontroliuojanti sritis, aktyvi pankreatinėse beta-ląstelėse (Hanahan, 1985: Nature 315: 115-122), imunoglobulino geno kontroliuojanti sritis, aktyvi limfoidinėse ląstelėse (Grosschedl ir kt., 1984, Cell, 38:647-658; Adams ir kt., 1985, Nature 318:533-538; Alexander ir kt., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444), pelės pieno liaukos naviko viruso kontroliuojanti sritis, aktyvi sėklidėse, krūtinėje, limfoidiniuose dariniuose ir išmatose (Leder ir kt., 1986, Cell. 45:485-495), albumino geno kontroliuojanti sritis, aktyvi kepenyse (Pinkert ir kt., 1987, Genes and Devel., 1: 268-276), alfa-fetobaltyminio geno kontroliuojanti sritis, aktyvi kepenyse (Krumbauf ir kt., 1985, Mol. cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer ir kt., 1987, Science 235: 53-58), alfa-I-antitripsino geno kontroliuojanti sritis,

aktyvi kepenyse (Kelsey ir kt., 1987, *Genes and Develop* 1:161-171), beta-globino geno kontroliuojanti sritis, aktyvi mielininėse ląstelėse (Morgan ir kt., 1985, *Nature* 315: 338-340; Kallias ir kt., 1986, *Cell*. 46:89-94), pagrindinio mielino baltymo kontroliuojanti sritis, aktyvi galvos smegenų oligodendrocituose (Readhead ir kt., 1987, *Cell*, 48: 703-712), miozino lengvosios 2-grandies geno kontroliuojanti sritis, aktyvi skeletiniuose raumenyse (Sani 1985, *Nature* 314: 283-286), ir gonadotropinio, išlaisvinančio hormoną, geno kontroliuojanti sritis, aktyvi hipotalamuse (Mason ir kt., 1986, *Science* 234: 1372-1378).

Ekspresuojančius vektorius, turinčius BDNF geno intarpus, galima identifikuoti trimis pagrindiniais būdais: (a) DNR-DNR hibridizacija, (b) nustatant yra ar nėra markerinio geno funkcija ir (c) įstatytų sekų ekspresija. Pirmuoju atveju, svetimą geną, įstatytą į ekspresuojantį vektorių, galima aptikti hibridizuojant DNR su DNR, panaudojant zondus, turinčius sekas, homologines įstatytam BDNF genui. Antruoju atveju, sistema rekombinantinis vektorius/šeimininkas identifikuojama ir išskiriama remiantis buvimu ar nebuvimu tam tikros markerinio geno funkcijos (pvz., timidinkinazinis aktyvumas, atsparumas antibiotikams, transformacinis fenotipas, susidarymas okliuzinių kūnų bakulofaguose ir t.t.), apspręstų svetimo geno įstatymu į vektorių. Pavyzdžiui, jei BDNF genas įstatomas į vektoriaus markerinio geno seką, tai rekombinantai, turintys BDNF intarpą, gali būti identifikuoti nustatant jog nėra markerinio geno funkcijos. Trečiuoju atveju, rekombinantinius ekspresuojančius vektorius galima identifikuoti eksperimentiškai tiriant svetimo geno produktą, kurį ekspresuoja rekombinantai. Tokie tyrimai gali būti paremti BDNF geno produkto fizinėmis ir funkcinėmis savybėmis bioeksperimentinėje sistemoje, kaip aprašyta aukščiau 5.2. skyriuje.

Po to, kai konkreti rekombinantinė DNR molekulė identifikuota ir išskirta, jos dauginimui galima pasinaudoti keliais žinomais metodais. Kai sukurta tinkama šeimininko sistema ir augimo sąlygos, tai ekspresuojantys vektoriai gali būti padauginėti ir gauti dideliais kiekiais. Kaip anksčiau paaiškinta, galima naudoti ekspresuojančius vektorius, pavyzdžiui, bet neapsiribojant, šių tipų: žmogaus ir gyvūnų virusai, tokie kaip karvės raupų virusas arba adenovirusas,

vabzdžių virusai, tokie kaip bakulovirusai, mieliniai vektoriai, bakteriofaginiai vektoriai (pvz., liamda) ir plazmidinių bei kosmidinių DNR vektoriai, ir tai toli gražu ne viskas.

Be to galima parinkti tokį ląstelių-šeimininkų kamieną, kad jis tam tikru norimu būdu moduluotų įstatytos sekos ekspresiją arba modifikuotų ir gamintų geno produktą. Tam tikrų promotorių sukeliamą ekspresiją gali būti sustiprinama esant kai kuriems induktoriams; taip galima valdyti genų inžinerijos pagalba gauto BDNF baltymo ekspresiją. Be to, įvairūs ląsteliniai-šeimininkai turi jiems būdingus ir specifinius mechanizmus, kad atlikti transliacinį ir post-transliacinį baltymų procesingą bei modifikacijas (pavyzdžiui, glikozilinimas, skaldymas). Gali būti parenkamos tinkamos ląstelių linijos ar šeimininkų sistemos, kurios atlieka norimą ekspresuojamo svetimų baltymo modifikaciją ir procesingą. Pavyzdžiui, kad pagaminti produktą neglikolizuoto baltymo pavidalu, gali būti naudojama ekspresija bakterinėje sistemoje. Ekspresija mielėse duoda gliukolizuotą produktą. Ekspresija žinduolių ląstelėse naudojama norint gauti natyvų heterologinio BDNF baltymo glikolizavimą. Be to, įvairios ekspresuojančios vektorius/šeimininkas sistemos daro įtaką procesingo reakcijoms, tokioms kaip proteolitinis skaldymas iki įvairaus lygio.

Konkrečiam išradimo įkūnijime, DNR, koduojanti prepro-BDNF, gali būti klonuojama plazmidėje pCMY, amplifikuojama ir toliau panaudojama COS ląstelių transfekcijoje, naudojant kalcio fosfato metodą (Chen ir Okayama 1987, Mol. Cell. Biol., 7:2745-2752); BDNF aktyvumas po to gali būti surenkamas iš ląstelių auginimo terpės (žr. pavyzdį 10 skyriuje, žemiau).

5.3.1. Ekspresuoto produkto identifikacija ir valymas

Po rekombinanto, kuris ekspresuoja BDNF geną, identifikavimo, šio geno produktą reikia išanalizuoti. Tai atliekama eksperimentiškai, pasinaudojant produkto fizikinėmis ir funkcinėmis savybėmis.

Po identifikacijos BDNF baltymas gali būti išskiriamas ir valomas standartiniais būdais, tame tarpe chromatografija (jonine, afinine ir filtruojančios kolonėlės chromatografija), centrifugavimu, diferencialiniu tirpumu arba bet kuriuo kitu standartiniu baltymų valymo būdu. Funkcinės savybės gali būti

įvertintos panaudojant bet kurį iš žinomų, jautrių BDNF eksperimentų, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neapsiribojant vien tik jais, panaudojant vištos embriono dorsalinės šaknelės mazgus, perinatalinės žiurkės tinklainės ląstelės arba neuronai, kilę iš nervinių plakodžių.

Svarbu, kad būdai naudojami BDNF paruošimui iš galvos smegenų audinio, produkuoja nepilnai aktyvų BDNF, dėl esančio liekamojo SDS, kadangi šie būdai paskutinėje stadijoje naudoja gelinę elektroforezę su SDS (Barde ir Thoenen ir kt., 1985, "Hormones and Cells Regulation", t. 9, leidykla Diumon ir kt., Elsvire Science publications, 383-390). Skirtingai nuo žinomų būdų, šis išradimas leidžia išskirti BDNF, kuris gaminamas panaudojant rekombinantines nukleino rūgščių molekules ir kuriame nėra SDS, ir todėl turi pilną aktyvumą. Pavyzdžiui, bet neapsiribojant, anti-BDNF antikūnai pagal išradimą (tokie kaip antikūnai, nukreipti prieš kiaulės BDNF B5-33 aminorūgščių fragmentą, aprašyti 11 skyriuje žemiau) gali būti panaudojami rekombinantinio BDNF surinkimui imunoprecipitacijos arba afininės chromatografijos pagalba, ir, tuo būdu, gaminti neturinčias detergento ir pilno aktyvumo BDNF molekules.

Kitame išradimo įkūnijime, prepro BDNF fermentiniu būdu paverčiamas į subrendusį BDNF, panaudojant, pavyzdžiui, endoproteinazę Arg-C (žr., pavyzdžiui, 17 skyrių žemiau).

5.6. Smegenų neurotrofinio faktoriaus genai ir baltymai

Panaudojant aukščiau aprašytus būdus (o taip pat žr. 6 ir 9 skyrių pavyzdžius, žemiau) buvo nustatytos atitinkamų nukleino rūgščių sekos, o iš jų deduktyviai buvo gaunamos aminorūgščių sekos. Buvo nustatyta kiaulės BDNF kDNR seka, pavaizduota Fig.1 Buvo nustatyta žmogaus genominės DNR BDNF seka, pavaizduota Fig.5, kuriame taip pat pavaizduotos kiaulės, žiurkės ir viščiuko DNR sekos. Kiekviena iš šių sekų arba jų funkciniai ekvivalentai gali būti panaudoti pagal išradimą.

Be to, išradimas susijęs su BDNF genais ir jų baltymais, išskirtais iš kiaulės, jaučio, arklio, paukščių, kačių ar šunų, o taip pat primatų ar kitų gyvūnų rūšių, kuriose aptinkamas BDNF aktyvumas. Išradimas toliau skirtas BDNF nukleino rūgščių subsekoms, turinčiomis bent jau dešimt nukleotidų, be to šios subsekos

turi hibridizuojamas BDNF sekos dalis, kurios, pavyzdžiui, naudotos nukleino rūgščių hibridizacijos eksperimentuose, southern ir northern-blotinge ir t.t. Išradimas taip pat pateikia BDNF baltymą, ir jo fragmentus bei darinius, atitinkančius aminorūgščių sekas, pateiktas 1 ir Fig.5, arba jų funkcinius ekvivalentus. Išradimas taip pat pateikia BDNF baltymų fragmentus bei darinius, turinčius antigeninę determinantą (ar determinantus), arba kurie yra aktyvūs funkciškai. Čia naudojamas terminas „funkcinis aktyvumas“ reiškia, jog aptinkamas teigiamas aktyvumas, eksperimentuose, jautriuose žinomoms BDNF funkcijoms, pavyzdžiui. bandymuose su vištos embriono DRG.

Pavyzdžiui, nukleino rūgšties sekos, aprašytos 1 ir Fig.5, pakaitomis, papildymais arba delecijomis gali būti pakeičiamos į funkciškai ekvivalenčias molekules. Dėl nukleotidinių koduojančių sekų išsigimimo, praktiškai, pagal išradimą naudojamos kitos DNR sekos, kurios iš esmės koduoja tas pačias aminorūgščių sekas, pavaizduotas 1 ir Fig.5 Tame tarpe, bet neapsiribojant vien jomis, nukleino rūgščių sekos, turinčios visus ar dalį BDNF genų, pavaizduotų 1 ir Fig.5, ir kuriose pakeisti kai kurie kodonai, kurie koduoja funkciškai ekvivalenčias aminorūgščių liekanas šios sekos viduje, t.y. sekos su tyliomis mutacijomis. Analogiškai, BDNF baltymai arba jų fragmentai ir dariniai, pagal išradimą, tame tarpe tie iš jų, kurie, pavyzdžiui, bet neapsiribojant tik tai jais, savo pirminėje aminorūgščių sekoje turi iš esmės visą ar dalį aminorūgščių sekos, pavaizduotos 1 ir Fig.5, o taip pat pakeistas sekas, kuriose viena aminorūgšties liekana pakeista funkcionaliai ekvivalenčia aminorūgšties liekana, atitinkančia tylią mutaciją. Pavyzdžiui, viena ar daugiau aminorūgščių gali būti pakeistos kitomis aminorūgštimis panašaus poliškumo, kurios veikia kaip funkciniai ekvivalentai, iššaukdamos tylias mutacijas. Viduje sekos aminorūgšties pakaitalas gali būti išrinktas iš kitų narių tos pačios klasės, kuriai priklauso keičiamoji aminorūgštis. Pavyzdžiui, nepolines (hidrofobines) aminorūgštis sudaro alaninas, leucinas, izoleucinas, valinas, prolinas, fenilalaninas, triptofanas ir metioninas. Neutralias polines aminorūgštis sudaro glicinas, serinas, treoninas, cisteinas, tirozinas, asparaginas ir gliutaminas. Teigiamą krūvį turinčias (bazines) aminorūgštis sudaro argininas, lizinas, histidinas. Neigiamą krūvį turinčias

(rūgščias) aminorūgštis sudaro asparagino ir gliutamino rūgštys. Išradimas taip pat skirtas BDNF baltymams ar jų fragmentams ir dariniams, kurie transliacijos metu ar po jos buvo diferenciškai modifikuoti, pavyzdžiui, glikozilinimo arba proteolitinio skaldymo metu, įjungiant į antikūno molekulę arba kitą ląstelinę ligandą ir t.t.

Papildomai, galima sukelti šio BDNF *in vitro* arba *in vivo* mutacijas, transliacijos sekų susidarymui ir/arba suardymui, iniciacijai ir/arba terminacijai, arba sudarymui koduojančių sričių variacijų ir/arba suformavimui naujų saitų restrikcinėms endonukleazėms, arba egzistuojančių restrikcinių saitų suardymui, kad palengvinti tolimesnį modifikavimą *in vitro*. Gali būti panaudota bet kuri specialistui žinoma mutagenizės technologija, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neapsiribojant, nukreipta į saitą *in vitro* mutagenizė (Hutchinson ir kt., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), panaudojimas TAB® linkerių ("Farmacija") ir t.t.

5.7. Antikūnų, nukreiptų prieš smegenų neurotrofinį faktorių, generavimas

Pagal išradimą BDNF baltymas arba jo fragmentai ir dariniai gali būti panaudoti kaip mutagenai anti-BDNF antikūnų generavimui. Ankstesnieji bandymai sukelti anti-BDNF imuninį atsaką nepasisekė, gal būt, dėl to, kad buvo maži kiekiai gryno BDNF. Dabar pakankamo BDNF kiekio gavimo problema išspręsta, panaudojant BDNF baltymų gamyboje rekombinantinę baltymų sintezės technologiją (pagrįstą BDNF nukleino rūgščių sekomis pagal išradimą), leidžiančią pagaminti santykinai didelį kiekį BDNF.

Kad dar labiau padidinti imuninės reakcijos prieš BDNF tikimybę, BDNF aminorūgščių seka analizuojama, kad identifikuoti tas molekulės dalis, kurios turi padidintą sugebėjimą imunizuoti. Pavyzdžiui, aminorūgščių sekoje kompiuterio pagalba identifikuojami paviršiaus epitopai, naudojant Hopp ir Woods būdą (Hopp ir Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 78:3824-3828), kuris buvo sėkmingai panaudotas antigeninių peptidų identifikavimui paviršiniame hepatito antigene. Iš kitos pusės, galima lyginti išvestas įvairių gyvūnų rūšių BDNF aminorūgščių sekas ir identifikuoti santykinai nehomologines sritis; šios sritys greičiausiai bus ir mutageniškos skirtingų rūšių gyvūnuose.

Monokloninių antikūnų, nukreiptų prieš BDNF, gaminimui galima panaudoti bet kurią technologiją, kuri gali generuoti antikūnus, panaudojant ląstelių linijas, stabilias kultūrose. Pavyzdžiui, šis išradimas apima: hibridomos technologiją, kurią sukūrė Kohler ir Milstein (1975. Nature 256: 495-497), triomos technologiją- žmogaus B-ląstelių hibridomos (Kozbar ir kt., 1983, Immunology Today 4:72) ir EBN-hibridomos technologiją, skirtą žmogaus monokloninių antikūnų gavybai (Cole ir kt., 1985, "Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, leid. Alan P. Liss, Ink., 77-96) ir į jas panašias.

Žmogaus monokloniniai antikūnai arba chimeriniai žmogaus-pelės (arba kitų gyvūnų rūšių) monokloniniai antikūnai tinka terapiniams taikymams. Žmogaus monokloninius antikūnus galima gauti bet kuria iš daugelio specialistui žinomų technologijų (pvz., Teng ir kt., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 80:7308-7312; Kazbor ir kt., 1983, Immunology today 4:72-79; Olsson ir kt., 1982, Meth. Enzymol 92:3-16). Chimerinės antikūnų molekulės gali turėti antigeną rišantį domeną, gautą iš pelės, ir pastovias sritis gautas iš žmogaus (Morrison ir kt., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81:6851; Takeda ir kt., 1985, Nature 314:452).

Polikloninius antikūnus prieš BDNF epitopus galima gaminti panaudojant įvairius specialistui žinomus būdus. Antikūnų gamybai, įvairūs gyvūnai-šeimininkai, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, tokios rūšys kaip triušiai, pelės, žiurkės ir t.t., imunizuojami, įvedant BDNF baltymus arba jo fragmentus ar darinius. Kad sustiprinti imunologinę reakciją, priklausančią nuo šeimininko tipo, gali būti panaudoti įvairūs adjuvantai, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, pilnas arba nepilnas Freund adjuvantas, mineraliniai geliai, tokie kaip aliuminio hidroksidas; paviršiaus aktyvios medžiagos, tokios kaip izolecitinas, pliurono poliolai, polianijonai, peptidai, aliejinės emulsijos, "Keyhole Limpet" izocianinas, dinitrofenolis ir potencialiai naudingi žmogaus adjuvantai, tokie kaip BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) ir *Corynebakterium parvum*.

Antikūno molekulinis klonas prieš BDNF epitopą gali būti pagamintas naudojant žinomus būdus. Nukleino rūgščių sekos, koduojančios monokloninio

antikūno molekulę arba jos antigeno surišančią sritį, konstravimui galima pasinaudoti rekombinantinės DNR metodologija.

Antikūno molekulės gali būti gryninamos panaudojant žinomus metodus, pavyzdžiui, imunoabsorbcinę arba imunoafinę chromatografiją, taip pat tokius chromatografinius metodus, kaip HPLC (didelio efektyvumo skysčio chromatografija) arba jų derinius. Antikūnų fragmentai, turintys molekulės idiotipą, generuojami pagal žinomas technologijas. Pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, tokiais fragmentais yra $F(ab')_2$ fragmentas, kuris gaunamas antikūno molekulę virškinant pepsinu, Fab' fragmentai, kuriuos galima gauti redukuojant disulfidinius tiltelius $F(ab')_2$ fragmento, o taip pat $2Fab$ ir Fab fragmentai, gaunami apdorojant antikūno molekulę papainu ir redukuojančiu reagentu.

Vieniolikto skyriaus pavyzdys aprašo polikloninio antiserumo gaminimą, nukreiptą prieš BDNF baltymo B5-33 peptidinį fragmentą.

5.8. Papildomų genų šeimos narių identifikacija

BDNF koduojančio geno sekos analizė ir išvedimas iš jos BDNF aminorūgščių sekos leido aptikti, kad šis baltymas turi daug struktūrinių sutapimų su NGF (Fig.2). Pirminė subrendusio BDNF seka kaip ir bendra struktūra bei galimas procesingo režimas iš baltymo-pirmtako liudija, kad NGF ir BDNF genai gali būti gaunami iš bendro motininio geno iš subrendusių polipeptidų srities, jeigu į NGF seką įvesti trys trūkiai sutapimo optimizacijai. Iš viso 51 identiška aminorūgštis yra bendros anksčiau žinomiems NGF iš daugelio gyvūnų rūšių ir kiaulės bei žmogaus BDNF. Šie sutapimai apima visas šešias cisteino liekanas, kas leidžia manyti, jog NGF baltymai ir BDNF turi labai panašią antrinę struktūrą. Be to, galima aptikti keturis segmentus iš šešių ir daugiau aminorūgščių, kuriuose visų anksčiau minėtų gyvūnų rūšių NGF baltymai ir kiaulės BDNF sutampa arbaba skiriasi ne daugiau kaip vienu konservatyviu aminorūgšties pakeitimu. Tuo būdu, galima būtų manyti jog NGF ir BDNF, greičiausiai, yra vienos genų šeimos labai giminingi nariai.

Racionali šios BDNF/NGF genų šeimos papildomų narių paieška gali būti vykdoma pasinaudojant egzistavimu, netikėtų konservatyvių fragmentų, turinčių stiprią homologiją tarp BDNF ir NGF, pavyzdžiui papildomi BDNF genų šeimos

nariai identifikuojami išrenkant iš nukleino rūgščių sekų aibės tas sekas, kurios homologiškos tiek BDNF tiek ir NGF. Toliau iš jų nustatomos tos, kurios, be to, turi nukleino rūgščių sekas nehomologiškas NGF ir BDNF. Terminas "nehomologiškas" čia naudojamas pažymėti sričiai, kuri turi bent jau apie šešis gretimus nukleotidus ir kurioje bent du nukleotidai skiriasi nuo NGF ir BDNF.

Labiau priimtinas išradimo įkūnijimas numato tokį būdą. Sutinkamai su kiekvienu iš keturių konservatyvių segmentų, aprašytų aukščiau, gali būti sintezuota grupė išsigimusių oligonukleotidų, kuri apima visas galimas koduojančias sekas aminorūgštims, aptinkamoms tiek BDNF tiek NGF per šešis gretimus kodonus. Sunumeravus juos subrendusių polipeptidų amino galo atžvilgiu (taip kad His 134 prepro BDNF atitiktų His I brandžiame baltyme), šie keturi konservatyvūs segmentai ("boksai") gali būti apibūdinami šiuo būdu (numeracija žmogaus subrendusio baltymo atžvilgiu, DNR seka atvaizduota Fig.1).

III lentelė

			DNR sekos
1 boksas	NGF	Gly10-Ser19	
	BDNF	Gly8-Ser17	587-616
2 boksas	NGF	Lys50-Cys58	
	BDNF	Lys50-Cys58	715-739
3 boksas	NGF	Gly67-Asp72	
	BDNF	Gly67-Asp72	764-781
4 boksas	NGF	Trp99-Cys110	
	BDNF	Trp100-Cys111	863-898

Sintetiniai oligonukleotidai, gauti iš boksų sekų porų, parodytų 3 lentelėje, gali būti panaudoti kaip praimeriai tam, kad panaudojant PCR reakciją amplifikuoti sekas iš potencialiai dominančio šaltinio (RNR arba DRN). Tai gali būti mRNR arba kDNR arba genomine DNR iš bet kurio eukarioto, kuris gali ekspresuoti baltymą, artimą BDNF arba NGF. Atlikus tik šešias PCR reakcijas (būtent: 1 bokso praimeris su 2 bokso primeriu; 1 boksa su 3 boksu; 1 boksa su

4 boksų; 2 boksą su 3 boksų; 2 boksą su 4 boksų; 3 boksą su 4 boksų) galima aptikti geną arba geninį produktą, turintį kartu su NGF ir BDNF bet kuriuos du iš keturių nurodytų segmentų su konservatyviomis sekomis. Jeigu norima sintezuoti kiekvienam boksui kelis skirtingus išsigimusius praimerius tai vis dar galima atlikti pilną perrinkimą su palyginti nedideliu kiekiu PCR reakcijų. Taip pat galima keisti hibridizacijos sąlygų griežtumą, naudojamų praimiruojant PCR reakcijas, norint pasiekti didesnę ar mažesnę panašumo laipsnį tarp nežinomo geno ir NGF arba BDNF. Jeigu anksčiau nežinomo BDNF/NGF genų šeimos nario segmentas sėkmingai amplifikavosi, šį segmentą galima klonuoti ir nustatyti jo pirminę seką, bei panaudoti kaip zondą pilnos kDNR arba genomino klonu išskyrimui. Tai, savo ruožtu, leis nustatyti pilną nežinomo geno nukleotidinę seką, išanalizuoti jo ekspresiją ir pagaminti jo baltyminį produktą funkicinei analizei.

Aprašytas aukščiau metodas buvo panaudotas naujo geno, giminingo BDNF ir NGF, identifikavimui, aprašytam 13 skyriaus pavyzdyje, žemiau. Papildomai šis išradimas leidžia panaudoti BDNF/NGF sekų homologiją naujų rekombinantinių molekulių kūrimui, kurios yra BDNF/NGF genų šeimos narėmis, bet nesutinkamas gamtoje. Pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, pagal išradimą rekombinantinė molekulė gali būti sukonstruota jungiant tiek NGF tiek ir BDNF genų dalis. Tokia molekulė galėtų turėti tiek BDNF tiek ir NGF savybes ir rodyti naują biologinį aktyvumą, tame tarpe, tiek agonistų tiek ir antagonistų. Pirminė NGF ir BDNF seka taip pat gali būti panaudota molekulių tretinės struktūros nuspėjimui kompiuterinio modeliavimo pagalba (Hoor ir Woods 1981, Proc. Matl. Acad. Sci, JSV, 78:3824-3828); BDNF/NGF chimeriniai rekombinantiniai genai gali būti kuriami įvertinant koreliaciją tarp tretinės struktūros ir biologinės funkcijos. Analogiškai, tokiu būdu gali būti sukonstruoti chimeriniai genai, turintys bet kurio vieno ar kelių narių dalis iš BDNF/NGF genų šeimos, tame tarpe naujo nario, aprašyto 13 skyriuje.

5.9. Išradimo panaudojimas

Šis išradimas skirtas BDNF nukleino rūgščių sekai ir pagrinde švariam baltymui, peptidiniams fragmentams arba dariniams gautiems iš jo. Dabar, pirmą

kartą BDNF gali būti gaunamas kiekiais, pakankamais diagnostiniams ir terapiniams taikymams. Panašiai, pirmą kartą diagnostikoje ir terapijoje galima naudoti antikūnus prieš BDNF, gautus išradimo dėka, o taip pat nukleino rūgščių zondus. Daugumoje atvejų, diagnostiniams ir terapiniams tikslams, labiau priimtina naudoti BDNF genus arba geninius produktus iš vieno ir tų pačių rūšių, nors tam tikrose šio išradimo įkūnijimuose gali pasirodyti naudinga taikyti tarprūšinį BDNF.

5.9.1. Diagnostiniai taikymai

Šis išradimas, skirtas nukleino rūgštims, koduojančioms BDNF, ir baltymams bei peptidiniams fragmentams arba dariniams, gautiems iš jo, o taip pat antikūnams, nukreiptiems prieš BDNF baltymą, peptidus arba darnius, kurie gali būti panaudoti nervų sistemos ligų ir sutrikimų, susijusių su BDNF ekspresijos paterno pakitimais, diagnostikoje.

Įvairiuose išradimo įkūnijimuose BDNF genai ir susijusios su jais nukleino rūgščių sekos ir subsekos, tame tarpe komplementarios sekos gali būti naudojamos diagnostinės hibridizacijos tyrimuose. BDNF nukleino rūgščių sekos ir jų subsekos, turinčios apie penkiolika nukleotidų gali būti naudojamos kaip hibridinimo zondai. Hibridizacijos eksperimentai gali būti naudojami sutrikimų ir ligų, susijusių su BDNF ekspresijos pakitimais, tame tarpe, atvejais kai pažeidžiami sensoriniai neuronai ir tinklainės neuronų degeneracija, aptikimui, prognozei, diagnozei arba būsenos monitoringui. Tarp tokių ligų ir atvejų yra, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, centrinės nervų sistemos traumos, infarktai, infekcijos, degeneraciniai nerviniai susirgimai, piktybinės ligos ir pooperaciniai pakitimai, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, Alchaimerio, Parkinsono ligos, Hantinktono liga ir degeneracinės tinklainės ligos. Pavyzdžiui, paimto paciento audinio pavyzdžio bendra RNR gali būti ištirta ieškant BDNF mRNR, o BDNF mRNR kiekio sumažėjimas rodo neurono degeneraciją. Santykinai aukšti BDNF mRNR lygiai aptikti neuroblastominio naviko ląstelėse (žr. žemiau 14 skyrių); atitinkamai, konkrečiame išradimo įkūnijime, aptikimas padidintų mRNR kiekių naudojant BDNF nukleino rūgščių zondus gali būti panaudotas neuroblastominių navikų diagnostikoje. Kadangi

daugumoje audinių sintezuojami labai maži BDNF kiekiai, tai BDNF mRNA yra ypač naudingi navikų markeriai.

Alternatyviuose išradimo įkūnijimuose, antikūnai, nukreipti prieš BDNF baltymą, peptidinius fragmentus arba darinius, naudojami nervų sistemos ligų ir sutrikimų diagnostikoje, tame tarpe sensorinių sutrikimų ir tinklainės degeneracinių ligų, kaip ir sutrikimų bei ligų, išvardintų aukščiau. Antikūnai pagal išradimą gali būti naudojami, pavyzdžiui, *in situ* hibridizacijos technologijoje, panaudojant audinių pavyzdžius, gautus iš pacientų, jei toks įvertinimas reikalingas. Kitame pavyzdyje, antikūnai pagal išradimą gali būti panaudojami ELISA procedūrose, skirtose BDNF kiekiui, esančiam audinių ir skysčių pavyzdžiuose, aptikimui ir/arba išmatavimui; analogiškai antikūnai pagal išradimą gali būti naudojami western-blotingo analizėje, skirtoje BDNF kiekiui, esančiam audinių ir skysčių pavyzdžiuose, aptikimui ir/arba išmatavimui. Antikūnai pagal išradimą, kurie jungiasi su BDNF ELISA ir Western-blotingo procedūrose, aprašyti žemiau 11 skyriuje.

Kituose išradimo įkūnijimuose, BDNF baltymas, peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti naudojami nervų sistemos sutrikimų diagnostikai. Konkrečiam įkūnijime, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, žymėtas BDNF baltymas arba žymėti peptidiniai fragmentai gali būti naudojami aptikimui audinių ir ląstelių, kurios ekspresuoja BDNF receptorių, tam kad identifikuoti BDNF receptoriaus ekspresijos aberacijas ir, atitinkamai, potencialius audinių ir ląstelių reakcijų į BDNF nukrypimus nuo normos.

5.9.2. Terapiniai taikymai

Šis išradimas, kuris skirtas nukleino rūgštims, koduojančioms BDNF, ir jo baltymams bei peptidiniams fragmentams arba dariniams, o taip pat antikūnams, nukreiptiems prieš BDNF baltymą, peptidus arba darinius, gali būti panaudotas gydymui nervų sistemos ligų ir sutrikimų, susijusių su BDNF ekspresijos paterno pakitimais arba kurios kyla dėl BDNF ar antikūnų prieš jį veiklos.

Įvairiose išradimo įkūnijimuose, BDNF baltymas bei peptidiniai fragmentai ar jo dariniai įvedami pacientams, kurių nervų sistema pažeista traumos, chirurgiškai, išemijos, infekcijos, medžiagų apykaitos sutrikimų, maisto trūkumo,

piktybinėmis ligomis ir toksinėmis medžiagomis. Būtent, išradimas gali būti panaudotas pašalinimui sąlygų, kuriuose atsiranda sensorinių neuronų ir tinklainės ganglijinių ląstelių pažeidimai, įvedant terapiškai veiklų BDNF baltymo arba peptidinių fragmentų ar darinių kieki. Įvairiose konkrečiose išradimo įkūnijimuose, BDNF įvedamas vietiniu būdu netoli pažeistų sensorinių neuronų, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, greta dorsalinės šaknelės mazgo neuronų arba bet kurio iš audinių: alkūninio, smilkininio ir mazginio mazgų; galvinių aštunto nervo vestibulioakustinio komplekso, ventrolateralinis polius trišakinio mazgo viršutinio ir apatinio žando dalies; vidurinių smegenų trišakio nervo branduolio. Gali būti pageidautina, giminingus BDNF peptidus ir BDNF baltymus įvesti panaudojant absorbciją ant membranos, pavyzdžiui, sielastinės membranos, kurią galima implantuoti netoli pažeisto nervo. Šis išradimas taip pat gali būti panaudotas pacientų atstatymo pagreitinimui po diabetinės neuropatijos, pavyzdžiui, daugybinės neuropatijos. Kituose išradimo įkūnijimuose, BDNF baltymus arba jo peptidinius fragmentus ar darinius galima panaudoti gydymui įgimtų stovių ar neurodegeneracinių sutrikimų, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, Alchaimerio liga, Parkinsono liga, Parkinsono-Plius sindromas (kuriuose Parkinsono simptomai sukelti dopaminerginių neuronų degeneracijos), tokių kaip progresyvinis supranuklearinis paralyžius (Stil-Ričardsono-Olševskio sindromas), alyvos-tilto-smegenėlių atrofijos, Shy-Drager sindromas-daugybinė sisteminė atrofija ir Guamano Parkinsonizmo silpnaprotiškumo kompleksas, o taip pat Hantingtono chorėja; atsikirai paėmus išradimas gali būti panaudotas gydymui įgimtų arba neurodegeneracinių sutrikimų, surištų su sensorinių nervų disfunkcijomis ir tinklainės degeneracinėmis ligoms. Pavyzdžiui, BDNF baltymus arba jo peptidinius fragmentus ar darinius pagal išradimą galima panaudoti gydymui paveldimos elastinės paraplegijos su tinklainės degeneracija (Kjelino ir Bernardo-Šolco sindromai), tinklainės pigmentozės, Stargardto ligos, Ašero sindromui (tinklainės pigmentozė su įgimtu kurtumu) ir Refsumo sindromui (tinklainės pigmentozė su įgimtu kurtumu ir polineuropatija), ir tai tik dalis ligų.

Gali būti, kad BDNF sintezės defektas ar reakcija į jį yra sindromų, pasižyminčių tinklainės degeneracija ir kitomis sensorinėmis disfunkcijomis, priežastis.

Konkrečiuose išradimo įkūnijimuose, BDNF baltymo arba peptidinių fragmentų ir jo darinių įvedimas derinamas su chirurginiu audinio implantavimu, gydant Alchaimerio ir/arba Parkinsono ligą. Kaip aptariama 12 ir 18 skyriuose, BDNF priklausomai nuo dozės (Fig. 34.) galima panaudoti dopaminerginių juodosios medžiagos neuronų išgyvenimo pagerinimui, tuo pačiu panaudojant BDNF CNS dopaminerginių neuronų ligų, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, Parkinsono ligos (ypač po, žemiau, 21 skyriuje pateiktų duomenų, rodančių, kad BDNF galima panaudoti neurotoksiškumo, sukkelto MPP toksino, kuris sukelia parkinsonizmo sindromą, pašalinimui), gydymui. Papildomai, pastebėta, jog BDNF palaiko CNS cholinerginių neuronų išgyvenimą (žr. žemiau į 12 ir 16 skyrių), ir tame tarpe neuronų iš bazalinių galinių smegenų, kas rodo, jog BDNF gali būti naudingas gydant sutrikimus, susijusius su cholinerginiais neuronais, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, Alchaimerio ligą. Parodyta, kad apie 35% pacientų su Parkinsono liga turi Alchaimerio tipo silpnaprotyškumą; BDNF, gautas pagal išradimą, gali būti naudingas kaip vienintelė terapinė priemonė tokio tipo ligų kompleksams. Panašiai, BDNF, gautą pagal šį išradimą, galima panaudoti gydymui Alchaimerio ligos, apjungtos su Dauno sindromu. BDNF, gautą pagal šį išradimą, galima panaudoti įvairiausių silpnaprotyškių, o taip pat ir įgimtų nesugebėjimų mokytis, gydymui. Taip pat buvo aptikta, kad BDNF greičiausiai palaiko astroglijinių ląstelių proliferaciją, ir tuo pačiu BDNF gali būti taikomas CNS randų formavimosi sumažinimui (pavyzdžiui, po chirurginio įsikišimo, traumos ar infarkto), o taip pat BDNF gali būti taikomas gydant CNS navikus astrogljinės kilmės. Dar viename išradimo įkūnijime, BDNF gali būti naudojama NGF receptoriaus ekspresijai reguliuoti, ir todėl jį gali būti naudinga įvesti pacientui prieš arba kartu su NGF, jei tai būtina gydymui.

Kaip pateikta žemiau 15 skyriaus pavyzdyje, įvedant kaininę rūgštį galima sustiprinti BDNF ekspresiją (ir šiek tiek mažiau NGF ekspresiją) neuronuose, tame tarpe amonio rago ir žievės neuronuose. Pastebėta, kad (žr. žemiau 15

skyrių) inhibuojant ne NMDA receptorių galima blokuoti šią kaininės rūgšties sukeltą BDNF ekspresiją. Atitinkamai, ekspresija giminingų BDNF peptidų ir pačio BDNF pagal išradimą gali būti sukeliamą *in vitro* ir *in vivo*, įvedant kaininę rūgštį arba jai giminingus junginius, arba karbacholą, histaminą ar bradikininą, arba jiems giminingus junginius, kurie kaip nustatyta turi panašų poveikį *in vitro* arba *in vivo*, arba panaudojant ne NMDA glutamatinių receptorių agonistus, ar kitus vaistus, kurie sustiprina ar silpnina acetilcholino, histamino arba bradikininio veikimą. Įvedant kaininę rūgštį arba jai giminingas molekules arba ne NMDA receptorių agonistus taip pat galima iššaukti NGF ekspresiją.

Kituose išradimo įkūnijimuose BDNF baltymas, jo fragmentai arba dariniai, naudojami derinant su kitais citokinais, tam kad gauti norimą neurotrofinį efektą. Pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, BDNF pagal išradimą naudojamas kartu su NGF arba griaučių raumenų ekstraktu, kad gauti sensorinių neuronų sinerginę augimo stimuliaciją, čia naudojamą išsireiškiamą "sinerginis" reikia suprasti taip, kad kombinacijos iš BDNF baltymo, jo peptidinių fragmentų bei darinių su antru reagentu veikimas yra stipresnis už veikimą to pačio kiekio šių medžiagų atskirai. Numatoma, jog BDNF gali funkcionuoti sinergiškai su kitais peptidiniais faktoriais, kilusiais iš CNS, kuriuos dar reikia pilnai apibudinti, darydami įtaką į augimą, vystymąsi ir išgyvenimą įvairiausių tipų neuroninių populiacijų centrinėje nervų sistemoje.

Toliau numatoma, jog pasinaudojant pilna BDNF molekulės charakteristika, gali būti sukurti nauji peptidiniai fragmentai, dariniai arba BDNF mutantai, veikiantys kaip kai kurių ar visų BDNF biologinių funkcijų antagonistai. Tokie BDNF antagonistai naudingi selektyviam sensorinių neuronų gydymui, pavyzdžiui, gydant chroninio skausmo sindromus.

Dar kituose šio išradimo įkūnijimuose, antikūnai, nukreipti prieš BDNF baltymą arba jo fragmentus ar darinius, gali būti įvedami pacientams, sergantiems įvairiomis neurologinėmis ligomis ar sutrikimais, ir kuriems būtinas toks gydymas. Pavyzdžiui, toks gydymas reikalingas pacientams, kenčiantiems nuo BDNF perprodukcijos. Antikūnai prieš BDNF gali būti panaudoti sensorinių neurozių aberantinių regeneracijų pašalinimui (pavyzdžiui, po operacijų) arba

kaip buvo aptarta aukščiau, gydant chroniško skausmo sindromus. Kadangi neuroblastominiame audinyje yra didžiulis kiekis BDNF mRNR tai gal būt BDNF yra autokrininio naviko augimo faktorius neuroblastomų atveju; atitinkamai, terapiniais tikslais gali būti įvedami antikūnai prieš BDNF, kad sukeltų naviko regresiją, konkrečiame išradimo įkūnijime.

5.10. Farmacinės kompozicijos

Veiklios kompozicijos pagal išradimą, kurios turi savyje pilną ar dalį BDNF geninio produkto, tame tarpe baltymą, peptidinius fragmentus ar darinius, arba antikūnus (arba antikūnų fragmentus), nukreiptus prieš BDNF baltymą arba jo peptidinius fragmentus arba jo darinius, arba turi kombinaciją iš BDNF su antru reagentu, tokiu kaip NGF arba griaučių raumenų ekstraktas, gali būti įvedami kartu su bet kuriuo biologiškai suderinamu farmaciniu nešikliu, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, su fiziologiniu tirpalu, buferiniu fiziologiniu tirpalu, dekstroze ir vandeniu.

BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys gali turėti aminorūgščių seką arba jo subseką, iš esmės sutampančią su pavaizduota Fig. 1 ir 5; gali pasirodyti, kad pranašiau naudoti BDNF baltymą, turintį konkrečiai visą ar dalį aminorūgščių sekos nuo apytiksliai 134 aminorūgšties iki apytiksliai 252 aminorūgšties, kaip parodyta Fig. 1, arba funkciškai ekvivalenčią seką, jei ta seka turi savyje funkcionaliąją BDNF molekulės dalį. BDNF gali būti gautas iš sekų, atitinkančių BDNF genus, iš bet kurių tinkamų gyvūnų rūšių, tame tarpe, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, tokių kaip žmogus, kiaulė, žiurkė, viščiukas, karvė, šuo, avis, ožka, katė, triušis ir t.t.

Koks BDNF baltymo, peptidinio fragmento, darinio ar antikūno kiekis pasirodys efektyvus gydant konkretų sutrikimą ar būseną, priklausys nuo šių sutrikimų ar būsenų kilmės ir gali būti nustatomas standartiniais klinikiniais metodais. Kada tai įmanoma, pageidautina pirma nustatyti dozės-reakcijos priklausomybės kreivę ir farmacinę kompoziciją pagal išradimą *in vitro*, pavyzdžiui, BDNF bioeksperimentinėse sistemose, aprašytose aukščiau, o po to naudojant gyvūno modelį, prieš tikrinant kompozicijos poveikį žmonėms. Remiantis duomenimis, gautais *in vitro*, konkrečiame išradimo įkūnijime,

farmacinė kompozicija, efektyviai padedanti sensorinių neuronų išgyvenimui, gali sudaryti vietinę BDNF baltymo koncentraciją tarp maždaug 5 ir 25 ng/ml ir geriau tarp 10 ir 20 ng/ml. Papildomame konkrečiame išradimo įkūnijime, farmacinė kompozicija, efektyviai gerinanti dopaminerginių arba cholinerginių neuronų augimą ir išgyvenimą, gali sudaryti vietinę BDNF baltymo koncentraciją tarp maždaug 10 ir 100 ng/ml.

Tarp įvedimo būdų yra, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, injekcijos į odą, raumenis, pilvo ertmę, venas, po oda arba per burnos ir nosies ertmę. Papildomai, farmacinę kompoziciją pagal išradimą gali būti pageidaujama įvesti į centrinę nervų sistemą bet kuriuo tinkamu būdu, tame tarpe naudojant intraventrikuliarines arba intratekalines injekcijas; intraventrikuliarinė injekcija gali būti palengvinama įvedant į skrandį kateterį, pritvirtintą, pavyzdžiui, prie rezervuaro, tokio kaip Ommaya rezervuaras.

Toliau, gali reikėti įvesti farmacinę kompoziciją pagal išradimą lokaliai į sritį, kurią reikia gydyti; tai galima padaryti, pavyzdžiui, bet neturint tikslo apsiriboti, vietine infuzija chirurginės operacijos metu, injekuojant kateterio pagalba arba implantuojant, be to, minėtas implantantas gali būti poringas arba neporingas arba iš želatininės medžiagos, tame tarpe membranos, tokios kaip sialastinės membranos arba pluoštas.

Išradimo pagalba galima gauti farmacines kompozicijas su BDNF baltymu, peptidiniais fragmentais arba dariniais, kurios įvedamos liposomų, mikrodalelių ar mikrokapsulių pagalba. Įvairiuose išradimo įkūnijimuose tokios kompozicijos naudojamos tam, kad palaikyti pastovų BDNF ar jam giminingo produkto išlaisvinimo greitį.

Numatoma, jog į zonas, kuriose reikia padidinti ar sumažinti BDNF koncentraciją, įmanoma įvesti ląsteles, kurios gamina BDNF ir jam giminingas medžiagas, BDNF antagonistus arba antikūnus prieš BDNF.

6. Pavyzdys: kiaulės smegenų neurotrofinio faktoriaus molekulinis klonavimas ir apibūdinimas

Kadangi BDNF labai retas audiniuose, tai BDNF geno klonavimui negalima pritaikyti tradicinių metodų. Vietoje to, ribotą kiekį baltymo sekų išplečia naudodami amplifikuotos DNR technologiją šiuo būdu:

(I) iš kilogramų kiaulės galvos smegenų buvo išgryninti mikrogramai BDNF.

(II) Išvalytas BDNF analizuotas baltymų mikrosekvenavimo technologijos pagalba ir buvo nustatyta aminorūgščių seka fragmento iš 36 aminorūgščių liekanų.

(III) Pasinaudojant nustatyta aminorūgščių seka (II), sintezuojami oligonukleotidai, kurie panaudojami kaip praimeriai polimerazės grandininėje reakcijoje, panaudojant kaip matricą kiaulės *superior colliculus* kDNR, tam kad amplifikuoti DNR koduojančią atitinkamą aminorūgščių fragmentą.

(IV) Nustatoma DNR reakcijos produkto (III) seka, ir

(V) Sintezuojami atitinkami oligonukleotidiniai praimeriai ir panaudojami polimerazės grandininėje reakcijoje su kiaulės *superior colliculus* kDNR, tam kad sugeneruoti persiklojančius DNR fragmentus, atitinkančius BDNF mRNR aukščiau, o taip pat žemiau sekų, koduojančių pradinį fragmentą iš 36 sekų. Tuo būdu, dviejuose persiklojančiuose fragmentuose buvo klonuojama visa sritis, koduojanti kiaulės BDNF.

Smulkus kiekvieno iš etapų aprašymas, o taip pat tolimesnis BDNF geno apibūdinimas pateikti žemiau.

6.1. Medžiagos ir metodai

6.1.1. BDNF išgryninimas iš kiaulės smegenų

BDNF išgryninimas iš kiaulės galvos smegenų buvo atliekamas panaudojant procedūrą, iš esmės sutampančią su aprašyta pas Hafer ir Barde (Hafer ir Barde 1988, Nature 331: 261-262).

Šeši kilogramai kiaulės galvos smegenų buvo homogenizuojami "Ultra-Turrax" homogenizatoriuje, 0,2 M natrio fosfato buferyje prie pH 6, turinčiame 1 mM EDTR ir šviežiai įpiltą fenilmetansulfonilfluoridą (1 mM) santykiu 1 kg

smegenų dviems litrams buferio. Panaudojant 1 M HCl, supernatanto pH sukoreguojamas iki 4 ir maišoma 2 val. prie 4° C. Po 25 min. prie 20000 g centrifugavimo sujungti supernatantai (1 M NaOH pagalba sukoreguoti iki pH 6), atitinkantys 3 kilogramams smegenų, maišomi 2 val. su 1 litru iš anksto išbrinkusios karboksi-metil-celiulioze, ir 0,1 M natrio fosfato pagalba stabilizuojama iki pH 6. Po dviejų praplovimų su bendrai paėmus 20 litrų 0,1 M natrio fosfato prie pH 6, gautą košelę išpylė į koloną ir iki ryto plaudavo tame pačiame buferyje, turinčiame 0,13 M NaCl. Aktyvias frakcijas išplovė su fosfatinu buferiu, turinčiu 0,5 M NaCl, o po to dializavo 2x5 l 5 mM kalio fosfate prie pH 6,8. Dializuotos frakcijos, gautos apdorojant 2x3 kg pradinės medžiagos, patalpinamos į hidroksiapatitinės kolonos 130 ml sluoksnį, kuris iš anksto stabilizuojamas 5 mM kalio fosfatu prie pH 6,8. Po to koloną išplaudinėjo tiesiniame kalio fosfato gradientu nuo 500 ml 5 mM iki 500 ml 700 mM prie pH 6,8, be to BDNF aktyvumas buvo išplaunamas prie 500 mM kalio fosfato koncentracijos (žr., Barde ir kt., 1982, EMBO, 1:549-559). Pridedant 1 M kalio fosfato, gautos aktyvios frakcijos privedamos iki 700 mM kalio fosfato koncentracijos ir patalpinamos į 5 ml fenil-sefarozinę koloną, stabilizuotą 700 mM kalio fosfatu prie pH 6,8. Po praplovimo 40 ml to paties buferio, BDNF aktyvumas išplaunamas 0,1 M kalio fosfatu prie pH 6,8, dializuojamas distiliuotame vandenyje ir liofilizuojamas. Liofilizuota medžiaga, prieš SDS gelio elektroforezę, perkeliama į buferį, turintį 0,1% SDS, bet be merkaptioetanolio, kaip aprašė Barde ir kt. (1982, EMBO, 1: 549-553), o po to perkeliama į SDS gelį, turintį akrilamido, su tiesiniu (o ne eksponentiniu) gradientu nuo 10 iki 45 %. Po elektroforetinio atskyrimo pabaigos, gelis trumpai dažomas (10 min.) su "Koomassi blue", blukinamas 20 min., o juosta, migruojanti citochromo "c" lygyje, išpjaunama ir išplaunama iš gelio, SDS šalinamas kaip aprašė Barde ir kt. (1982, EMBO, 1:549-553). Išgryninimo procedūra, po kurios galiausiai sekdamo sekos nustatymas, buvo modifikuota pagal Hofer ir Barde (1988, Nature 331:261-262) ir jos paskutinėje stadijoje nenaudojama gelinė elektroforezė.

6.1.2. Baltymo sekos nustatymas

BDNF seka nustatinėjama tiesiogiai (55 pmol, kaip apibrėžiama aminorūgščių analizėje su pradine išeiga 40 *pmol* amininio galo histidinui), arba skaldoma šiuo būdu: 5-10 µg BDNF (iš penkių skirtingų ruošinių) skaldomi pagal šią procedūrą. V8: 1 µg *S. aureus* V8 pridedamas prie 5 µg BDNF, su 0,2 NH₄CO₃, pH 8, turinčio 10% acetonitrilo (bendras tūris 50 µl), ir inkubuojamas iki ryto kambario temperatūroje. Tripsinas: 1 µg TPOK- apdoroto tripsino (jaučio kasos liauka, Sigma, tipas XIII) pridedamas prie 8 µg BDNF, esančio Tris-HCl (0,1 M, pH 8), turinčio 10 mM CaCl₂ (bendras tūris 40 µl) ir inkubuojama iki ryto prie 37° C. Ciano bromidas (CNBr): 10 µl BDNF inkubuojami 3 val. kambario temperatūroje (bendras tūris 60 µl) su 10% (svoris/tūris) CNBr 70 % (tūris/tūris) skruzdžių rūgšties tirpale (koncentracijos galutinės). Pridėjus 500 µl H₂O reakcijos pabaigoje, mėginys koncentruojamas iki 500 µl, panaudojant greitaeigį vakuuminį garintuvą. 50 µl Tris-HCl (1,0 M su pH 8) pridedama kartu su 5 µl beta-merkaptioetanolio, ir mėginys inkubuojamas iki ryto prie 37° C. Pridėjus 5 µl jodmetano, mėginys išgarinamas iki sausumo, naudojant greitaeigį vakuuminį garintuvą. Buvo aptikta, kad po skaldymo su CNBr būtina atlikti BDNF atstatymą ir alkilinimą, kaip parodė SDS gelio elektroforezė Swank-Munkres ir HPLC (1971, Anal. Biochem 39: 462-477), be atstatymo fragmentai negaunami. Tai rodo, jog BDNF turi disulfidinius tiltelius, kurie išsidėstę tokiu būdu, kad nei vienas skėlimas neišlaisvina peptidų. Po visų skaldymų, išdžiovinti mėginiai pakartotinai suspenduojami 0,1 % 3-fluoracto rūgštyje (TFA) ir patalpinami į atvirkštinės fazės HPLC koloną ("Applied Biosystems") ir peptidai išplaunami 60 min 0,1 ml/min greičiu, tiesiniam gradientui 0-60 % acetonitrilo, esančio 0,1 % TFA tirpale. Detektavimas buvo atliekamas prie 214 nm naudojant Waters 441 UV detektorių. Šių peptidų sekos buvo nustatomos naudojant automatizuotą Edmano degradaciją dujiniu mikrosekventoriumi (modelis 47 A, "Applied Biosystems"), pagal Hewick (Hewick 1981, J. Biol. Chem. 256: 7990-7997) ir Hunkapillar (1983, Methods Enzymol 91:227-236). PTH aminorūgščių aptikimas buvo vykdomas pagal Lottspeich (Lottspeich, J. Chromatogr 326: 321-327).

6.1.3. DNR matricų paruošimas

Kiaulės genominė DNR buvo išskiriama pagal Herrmann ir Frischlauf (1987, Methods Enzymol 152: 180-183) metodą.

kDNR paruošimui iš 6 gramų *superior colliculus* kiaulės galvos smegenų išskiriama bendroji RNR. Audinio mėginius paimdavo disekcijos būdu ir užšaldydavo skystame azote vietinėje skerdykloje. RNR ekstrakcijai naudoti standartiniai metodai (Okayama ir kt., 1987, Methods Enzymol 154: 3-20). 80 µg bendrosios RNR buvo transkribuojami naudojant atvirkštinę transkriptazę iš pelės leukemijos viruso Moloney (BRL, pagal gamintojo instrukciją, išskyrus pridėjimą 1 µl RNR sin ir be aktinomicino D), panaudojant praimerio mišinį CGGATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTTT su A, C arba G kaip galiniu 3' nukleotidu (oligo 3, sukurtas suderinamumui su 3' poli-A atkarpa ir turintis Bam HI, ScaRI ir Pst I atpažinimo situs).

6.1.4. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija buvo vykdoma pagal metodą aprašytą Saiki ir kt. (Saiki 1985, Science 230: 1350-1354).

6.2. Rezultatai ir aptarimas

6.2.1. Baltymo sekos nustatymo rezultatai

Baltymo sekos nustatymo rezultatai pateikti IV lentelėje.

IV lentelė

Eksperimentiškai nustatyta BDNF peptidinė seka

N-terminalas	HSDPARRGELSV
V8	XVTAADKKTAVD
V8	KVPVSKGQLKQYFYE
CNbr	XGGTVTVLEKVP (V) (S)
CNbr	GYTKEGXRGIXRGI
Tripsinas	(T) AVDMSGGTVTVLEK
Tripsinas	ALTMDSK

Sujungta

seka:

VTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYE, pabrauktos
aminorūgštys, koduojamos oligonukleotidiniais praimeriais, naudojamais PCR
reakcijoje žr. aukščiau į 6.1.2. skyrių. Keturi gretimi aminorūgščių sekų
segmentai buvo nustatomi naudojant Edmano degradaciją, kurią buvo galima
naudoti 36 aminorūgščių išskyrimui, sudarančių apytiksliai trečdalį visos
aminorūgščių sekos.

6.2.2. Oligonukleotidų sintezė ir PCR reakcijos panaudojimas, DNR koduojančiai aminorūgščių fragmenta, gavimui

Du pilnai išsigimę 17-mačiai oligonukleotidiniai praimeriai buvo sintezuoti
cheminiu būdu pasinaudojant sekomis, kurios koduoja du segmentus iš šešių
aminorūgščių, kurie yra 36 aminorūgščių liekanų fragmento, aprašyto aukščiau
6.2.1. skyriuje, amininiame ir karboksiliniame galuose, atitinkamai. Konkrečiai,
buvo chemiškai susintezuoti du atskiri 17-mačių nukleotidų mišiniai (suderinti su
visais galimais kodonais ir sukurtais oligo 1 ir oligo 2), pasiremiant seka
AADKKT (prasminė) ir KQYFYE (antiprasminė) (pabraukti III lentelėje) ir po
130 *pmol* kiekvieno praimerio buvo pridėta prie 1 µg kiaulės genominės
matricinės DNR. Buvo atlikti 35 ciklai amplifikacijos, panaudojant PCR
reakcijas, pagal gamintojo nurodymus (Gene Amp TM, Perkin - Elmer Cetus).
Denatūracija truko vieną minutę prie 94° C, praimeris buvo renatūruojamas dvi
minutes prie 45° C ir plečiamas dvi minutes prie 72° C. DNR juostą, nuspėto
dydžio (101 bp), išpjovė iš 3 % agarų gelio (nudažyto etidium-bromidu) ir
asimetriškai amplifikavo kaip aprašyta pas Innis ir kt. (Innis, 1988, Proc. Natl.
Acad. Sci. JAV, 85: 9436-9440) su 100-kartiniu pertekliumi arba oligo I, arba
oligo 2.

6.2.3. kDNR fragmento nukleotidinė seka

Gautų prasminių ir antiprasminių DNR fragmentų nukleotidinės sekos
buvo nustatomos dezoksinukleotidinio grandininio terminavimo metodu (Sanger
ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 72:3918-3921), naudojant, kaip
praimerus, oligonukleotidus 1 ir 2, žymėtus galuose su ³²P. Gauta nukleotidinė
seka turėjo tik atvirą nuskaitymo rėmelį, nepertrauktą grandinės nutraukimo

kodonu. Išvestoji iš šio atviro nuskaitymo rėmelio aminorūgščių seka pilnai sutapo su komplementaria aminorūgščių seka, nustatyta analogiškai sričiai kiaulės BDNF.

6.2.4. Visos kiaulės BDNF kDNR klonavimas

Visą sritį, koduojančią kiaulės BDNF, molekuliškai klonavo dviejuose persidengiančiuose fragmentuose. Kad gauti BDNF kDNR 5' sritį (prasminio siūlo atžvilgiu) buvo sintezuojamas 50-matis oligonukleotidinis praimeris, turintis 21 bazę iš aukščiau aprašytos srities tikslios sekos, esančios BDNF prasminiame siūle, tam kad panaudoti jį kaip prasminį praimerį. Šio praimerio nukleotidinė seka buvo oligo 4, (5')CGGATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTXX (pabraukta seka, atitinkanti Fig.1 prasminį BDNF siūlą, nuo 643 iki 663 pozicijos, koduojantį aminorūgščių seką Thr-Ala-Val-Asp-Met-Ser-Gly (dvi pirmosios bazės Gly kodono). Šio praimerio 5' gale buvo įjungti 9 papildomi nukleotidai, kad sukurti skaldymo saitus restrikinėms endonukleazėms, dėl Spe I ir Sal I, naudojant molekuliniame klonavime. Buvo sukurtas trigubas išsigimęs 31-matis oligonukleotidinis praimeris, komplementarus atkarpai poli-A, pradedamai bet kuriuo nukleotidu (T, C arba G) kDNR prasminiame siūle, tam kad būtų atpažinimo saitai Bam HI, Eco RI ir PstI restrikinėms nukleazėms. Šio antiprasminio praimerio (oligo 3) seka buvo (5') CGGATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTXX (3'), kur x=A,C arba G. Sintetiniai oligonukleotidiniai prameriai buvo naudojami sekų iš kiaulės *superior colliculus* kDNR, kurios paruošimas aprašytas aukščiau, amplifikavimui panaudojant PCR. Konkrečiai 3' amplifikuota DNR buvo gauta naudojant 10 litrų reakcinio mišinio, skirto atvirkštinei transkripcijai, 150 *pmol* prasminio praimerio (oligo 4) ir 150 *pmol* (oligo 3) kaip antiprasminį praimerį PCR reakcijoje. Southern-blot-analizė buvo atliekama su amplifikuotais DNR produktais; ir juosta, duodanti hibridizavimo signalą su 32P-žymėtuju gale oligonukleotidu AAGGATCCTGCAGTTGGCCTTTCGAGAGGC (oligo 5, naudojamo kaip antiprasminis praimeris žemiau aprašytoje 5' reakcijoje, bei turinčio Bam HI ir Pst I atpažinimo saitus), buvo išpjaunama, ekstrahuojama "glassmilk" metodu (clean genas, suvirškintas Eco RI ir Sall, buvo klonuojamas

Bluescript SK⁺ plazmidės (Stratogen) pagalba) ir atliekama nukleotidinės sekos analizė.

Kad gauti likusią BDNF koduojančią seką (aukščiau arba 5' dalį), kRNR paruošdavo kaip aprašyta aukščiau ir prie 5' galo prijungdavo poli-A uodegas, panaudodami terminalinę dezoksinukleotidinę transferazę. Tą patį mišinį, iš 31-mačių oligonukleotidų, kiekvienas iš kurių turėjo aukščiau aprašytą atkarpą iš 12 nuosekliai einančių T liekanų, panaudojo praimerio, komplementaraus prijungtoms poli-A uodegoms, gavimui. Buvo susintezuotas vienintelis 30-matis oligonukleotidinis praimeris, turintis 17 bazių, atitinkančių komplementarų siūlą, su BDNF koduojančia seka, ir restrikcinių endonukleazių BamHI ir PstI atpažinimo situs. Praimeris turėjo tokią seką : (5') AAGGATCCTGCAGTTGGCCTTTCGAGACGG (3') (oligo 5' žr. aukščiau), pabraukta sritis, komplementari prasminio siūlo BDNF koduojančiai sekai nuo 709 iki 693 pozicijos (Fig.1). Ši seka atitinka segmentą, koduojantį aminorūgščių seką Pro (paskutinės dvi kodonų bazės) Val-Ser-Lys-Gly-Gln. Šiuos praimerus pridėdavo prie DNR, su poli-A uodegomis, ir, kaip aukščiau, PCR reakcijų pagalba amplifikuodavo. Reakcijos produktus išpjaudavo PstI pagalba ir Bluescript vektoriumi klonuodavo bei nustatydavo nukleotidinę seką, panaudodami dezoksinukleotidinio grandininio terminavimo metodą.

6.2.5. Kiaulės BDNF kDNR nukleotidinė seka

Apjungta nukleotidinė seka, nustatyta iš kiaulės BDNF kDNR fragmentų, parodyta Fig.1 kartu su išvestąja aminorūgščių seka. Ši seka turi atvirą nuskaitymo rėmelį polipeptidui iš 252 aminorūgščių. Iniciatorinis Met kodonas (ATG) identifikuojamas aptinkant du gretimus sekos terminacijos kodonais (TAG-TGA) tame pačiame nuskaitymo rėmelyje, pradedant 36 bazių poromis aukščiau. Kiaulės BDNF amino-terminalas, nustatytas gryno baltymo sekos tiesioginės analizės pagalba, atitinka polipeptido liekaną His 134. Tuo būdu, nukleotidinės sekos duomenys rodo, jog subrendęs BDNF gaunamas procesingo pagalba iš motininio polipeptido. Tiesiog prieš His 134 liekaną yra seka Arg-Val-Arg-Arg. Tokios sekos, su viena pagrindine aminorūgšties liekana, po kurios eina neutrali liekana, o po to dar dvi pagrindinės liekanos, tai saitai-taikiniai, skirti

polipeptidų pirmtakų proteolitiniam procesingui. Išvesta subrendusio BDNF aminorūgščių seka išpranašauja baltymą su 119 aminorūgščių (su molekulinio svoriu 13311 daltonų) su šarminiu krūviu ($pI = 9,99$) ir kurio savybės atitinka preliminarią BDNF charakteristiką, gautą įvertinant biologiškai aktyvų faktorių po jo išfrakcionavimo dvimatės gelio elektroforezės pagalba. BDNF dalių aminorūgščių seka, gauta panaudojant baltyminę aminorūgščių sekų analizę (iš viso 64 aminorūgščių liekanos), visiškai sutapo su aminorūgščių seka, išvesta iš kDNR klonų nukleotidinių sekų (Fig.1, pabraukta). Ši polipeptido pirmtako seka derinasi su BDNF procesingu bent jau dviejuose etapuose: pirma, signalinis peptidas, greičiausiai iš 18 liekanų, turi būti skaldomas nuo amino-terminalo ir po to, subrendusio polipeptido atpalaidavimui, skeliamas tarp Arg 133 ir His 134. Jei šis modelis teisingas, tai pirmtaką reiktų žymėti kaip BDNF.

7. Pavyzdys: BDNF genas skiriasi nuo NGF geno pas įvairių rūšių stuburinius

7.1. Medžiagos ir metodai

7.1.1. NGF ir BDNF DNR zondų paruošimas

Iš firmos "British biotechnology Ltd" buvo gauta plazmidė su sintetiniu genu, koduojančiu subrendusį žmogaus NGF ir be sekos, koduojančios normalų žmogaus NGF, turintis keletą užkonservuotų kodonų pakeitimų, patogių restrikcinių saitų, skirtų endonukleaziniam skaldymui, įvedimui. PCR pagalba buvo sintezuoti du 18-mačiai oligonukleotidiniai praimeriai, tam kad amplifikuoti šio geno 270 br segmentą, koduojantį aminorūgščių liekanas nuo 9 iki 111 pozicijos. Žymėtojo DNR zondo gavimui, buvo atlikta 10 PCR reakcijų ciklų su ^{32}P -dOTP. BDNF zondas buvo gautas panaudojant panašias procedūras, išskyrus tai, kad amplifikacija buvo atliekama kaip pradinę medžiagą naudojant kiaulės genomine DNR ir amplifikuotas segmentas atitiko sritį, koduojančią subrendusio BDNF 28 - 111 aminorūgštis. Komplementaraus siūlo (antiprasminio) praimeris, atitinkantis aminorūgščių sritį 106-111, buvo sintezuotas su seka (5') ACATACACAGGAAGTGTC (3'). Prasminio siūlo oligonukleotidinis praimeris buvo pagamintas iš aminorūgščių liekanų, iš srities 28-33: (5') GCAGTGGACATGTCGGGT (3'). Su šiais dviem zondais buvo

atliekama southern-blot-hibridizacija (Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:508-517) griežtose sąlygose 2 x SSC prie 68 °C.

7.1.2. Įvairių gyvūnų rūšių BDNF genu nukleotidinių sekų nustatymas

Tie patys du aprašyti aukščiau 18-mačiai oligonukleotidai, apimantys subrendusio kiaulės BDNF sritį, koduojančią 28-111 aminorūgštis, buvo panaudoti kaip praimeriai standartinėse PCR sąlygose, amplifikuojant 252 br segmentą iš kiaulės, žiurkės, viščiuko ir žmogaus DNR, ir gautų DNR reakcijos produktų nukleotidų seka buvo nustatoma dezoksinukleotidinio grandininio terminavimo metodu (Sanger ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 72: 3918-3921). Kai kuriais atvejais amplifikuotos DNR juosta išpjaudavo ir ekstrahuodavo po agarinio gelio elektroforezės ir prieš nukleotidinės sekos nustatymą pakartotinai amplifikuodavo. Kitais atvejais amplifikacija nebūtina.

7.2. Rezultatai ir aptarimas

Iki šio išradimo BDNF baltymas buvo išgrynintas tik iš kiaulės. Svarbiausią reikmę turėjo pademonstravimas, kad BDNF tai ne šiaip sau kiaulės nervinio augimo faktoriaus beta-subvienetas (beta-NGF ar tiesiog NGF, kaip čia minėta), kurio išgryninimas ir molekulinis klonavimas iki šiol nebuvo aprašytas. Tai buvo ypač svarbu, kadangi ankščiau buvo pranešama, kad kiaulės BDNF fizikinės savybės, faktiškai, sutampa su beta-NGF monomero savybėmis iš daugelio gyvūnų rūšių. Ankščiau buvo sunku nustatyti tikslų sąryšį tarp BDNF ir NGF, kadangi nebuvo neutralizuojančių antikūnų prieš kiaulės BDNF ir buvo nežinoma kiaulės BDNF aminorūgščių arba nukleotidų sekos. Galima buvo skaityti, kad biologinio aktyvumo skirtumai stebimi tarp BDNF ir NGF, galėjo, pavyzdžiui, tiesiog atspindėti NGF skirtumus tarp kiaulės ir kitų gyvūnų rūšių (pavyzdžiui, pelės), arba galėjo kilti dėka NGF baltymo molekulės diferencinės modifikacijos įvairiuose audiniuose (pavyzdžiui, kiaulės smegenyse ir pelės seilių liaukoje), arba dėka baltymo modifikacijų, atsitiktinai padarytų vienoje iš stadijų (ar stadijose) valant kiaulės smegenis.

Jei būtų buvę nustatyta, kad BDNF tiksliai skiriasi nuo NGF, tai būtų svarbu nustatyti ar BDNF genas yra pas kitus gyvūnus, ypač pas žmogų. Iki šio išradimo šia tema nebuvo informacijos, kadangi BDNF buvo išvalytas tik iš

vienos rūšies. Tai, kad daugelyje neapdorotų ekstraktų ir kondicionuotų terpių, aptiktas neurotrofinis aktyvumas, kuris, greičiausiai, skiriasi nuo NGF, dar nereiškia jog egzistuoja medžiaga, kuri būtų identiška ar iš esmės ekvivalenti kiaulės BDNF.

Palyginimas išvestos kiaulės BDNF aminorūgščių sekos su kelių gyvūnų rūšių (žmogaus, karvės, jūros kiaulytės, pelės, viščiuko ir gyvatės) žinomomis NGF sekomis parodė, kad BDNF daug mažiau susieta su bet kurio stuburinio NGF, nei įvairių rūšių NGF tarpusavyje (Fig.2). Netikėta brandaus BDNF pirminės struktūros ypatybė yra panašumas į NGF struktūrą, tik su trimis trūkiais, kurie įvesti suderinamumo optimizavimui, yra 51 sutapimas bendras skirtingoms NGF (nuo gyvatės iki žmogaus) ir BDNF (Fig.2). Svarbu, kad tarp šių sutapimų yra šešios cisteininės liekanos. Nors dar nežinomas tikslus BDNF disulfidinių išsidėstymas, aišku, kad tokie tilteliai yra (3 lentelė, paaiškinimas). 3 triptofaninės ir 2 fenilalanininės liekanos, aptiktos BDNF molekulėse, yra tose pačiose pozicijose NGF molekulėje. Reikia pažymėti, kad 6 asparagino rūgšties liekanos (iš 7, esančių BDNF) ir 7 valino (iš 9) yra tose pačiose pozicijose tiek pas žinduolių NGF tiek ir BDNF. Šios penkios aminorūgštys sudaro apie pusę sutampančių aminorūgščių tarp abiejų baltymų. Priešingai, yra keletas ryškių skirtumų tarp BDNF ir visų NGF. Papildomai, prie jau minėtų trijų trūkių, yra 21 pozicija, kur aminorūgštys sutampa visuose NGF, bet skiriasi BDNF molekulėje.

Didžioji dalis pirmtako sekos nėra gimininga NGF sekai su dviem išimtimis: numanoma sekretinė BDNF signalinė seka turi 5 sutampančias aminorūgštis (iš 13 aminorūgščių) ir aplamai nuostabiai panaši į pelės NGF signalinę seką, kurioje, kaip buvo parodyta, skilimas vyksta po alanininės liekanos, esančios 18 pozicijoje metionino, indukuojančio transliaciją (Edvads ir kt., 1983, Mol. Cell. Biol.8:2456-2464). Atrodo įmanoma, kad alaninas, kuris taip pat BDNF molekulėje yra 18 pozicijoje, yra potencialus skaldymo saitas, skirtas BDNF signalinės sekos pašalinimui. Kitas panašumas su NGF prasideda prie vienintelės konsensuso N-glikozilavimo sekos (du kartus pabraukta Fig.1), atitinkantis asparaginui 126. Šis asparaginas yra už aštuonių aminorūgščių prieš skėlimo saitą, duodantį pradžią brandžiam BDNF. Tokia pat struktūra aptikta

keliuose NGF; kaip ir seka Arg-X-Basic-Arg, sudaranti keturias paskutines aminorūgštis pirmtake (Schvarts ir kt., 1989, J. Neurochem. 52:1203-1209).

Įrodymas, kad NGF ir BDNF koduojami skirtingais genais skirtinguose gyvūnuose, buvo gautas paruošiant DNR zondus iš molekulinio būdu klonuotų žmogaus NGF ir kiaulės BDNF ir atliekant southern-blot-hibridizaciją su genomine DNR, kuri suvirškinta restrikcine endonukleaze EcoRI. Genominė DNR buvo analizuojama šiose rūšyse: žmogus, beždžionė, žiurkė, pelė, šuo, karvė, triušis, viščiukas ir mielės. DNR buvo skaldoma su EcoRI ir analizuojama southern-blotingu dvigubuose filtruose su žmogaus NGF ir kiaulės BDNF 32P-žymėtuojų zondų. Kiekvieno zondo atveju visuose organizmuose, išskyrus mieles, aptikta vienintelė juosta. Dauguma atvejų, juostos, hibridinančios NGF ir BDNF zondus bet kuriame organizme, turėjo skirtingus judrumus elektroforezės metu, nors kai kuriuose atvejuose (pav., pelės DNR) EcoRI fragmentai hibridizuoti NGF ir BDNF zondais, buvo apytiksliai vienodo dydžio ir negalėjo būti išskirti elektroforezės būdu naudotose sąlygose (Fig.3).

Dalis sekos, koduojančios brandų BDNF, buvo amplifikuota PCR pagalba iš genominės DNR kiaulės, viščiuko, žiurkės ir žmogaus, ir buvo nustatyta nukleotidinė seka. Kiaulės genominės DNR amplifikuotos srities sekos analizė tiksliai patvirtino seką, gautą kiaulės smegenų kDNR molekulinio klonavimu. Taip pat buvo nustatytos žiurkės, žmogaus ir viščiuko BDNF genominės sekos šiame 252 br segmente (5 pav.). Reikia pažymėti, kad gauta žiurkės ir žmogaus šios srities aminorūgščių seka bent jau aminorūgštys 28-111, identiška kiaulės BDNF sekai, nors skirtinguose rūšyse aptikta keletą skirtingų nukleotidų (pvz., konservatyvūs pakitimai trečioje kodono pozicijoje). Pas viščiuką šioje zonoje buvo vienintelė aminorūgščių pakaita, 61 subrendusio baltymo liekana pas viščiuką yra lizinas lyginant su metioninu, esančiu žinduolių BDNF. Sekų analizės duomenys kartu su eksperimentiniais duomenimis iš southern-blot-hibridizacijos, vienareikšmiškai įrodo, kad BDNF koduojamas labai konservuotu genu, kuris skiriasi nuo geno koduojančio NGF.

8. Pavyzdys: BDNF RNR ekspresija nerviniame ir kituose audiniuose

8.1. Medžiagos ir metodai

8.1.1. RNR paruošimas

Bendroji RNR buvo ekstrahuota iš suaugusių pelių patelių pagal Okajama ir kt. (1987, Methods Enzymol 154:3-20). Trumpai, užšaldytus audinius homogenizavo 5,5 M guanidintiocianate, centrifugavo šiukšlių pašalinimui ir supernatantą, perneštą ant cezio trifluoracetato pagrindo, privedė iki 1,51 µg/ml tankio. Po 24 val. centrifugavimo prie 125000 g baret-rotoriuje SW-27 (Bekman), RNR pakartotinai suspendavo ir nusodino etanoliu ir 8 M amonio acetatu, bei saugojo prie -70° C. Elektroforezė buvo atliekama pagal Lehrach ir kt. (Lehrach 1977, Biochemistry 16: 4745-4751) 1,3 % agar-formaldehido geliuose. RNR perkėlė ant nailoninių membranų (Hybond-N Amersham) ir hibridino iki ryto 1 ml 2 x SSC tirpale, turinčiame 50% formamido su pelės BDNF ³²P-kRNR zondų (10⁷ cpm žr. žemiau), prie 62°C. Praplovimas truko 60 min. prie 65°C 0,1 x SSC tirpale. Po praplovimo inkubavo 60 min. kambario temperatūroje su 0,1 µg/ml RNR'azės A (Farmacia) ir plėvelę eksponavo 48 val. prie -70°C (su intensifikuojančiu ekranu).

8.1.2. DNR zondo paruošimas

Pelės smegenų hDNR buvo sijojama dviem nepriklausomais BDNF oligonukleotidais. Dvigubi teigiami klonai buvo išskiriami ir subklonuojami į Bluescript SK⁺ plazmidžių (Stratagen) EcoRI saitą. Buvo nustatoma nukleotidinė seka, atitinkanti kiaulės sekos 350-828 nukleotidams (žr. Fig.1). Šitoje sekoje buvo aptikti tik keturių aminorūgščių skirtumai tarp pelės ir kiaulės BDNF, kas rodo, kad šis kiaulės ir pelės BDNF domenai stipriai užsikonservavę. Vienintelis siūlinės RNR zondas buvo paruoštas panaudojant šią matricą ir T3 polimerazę (Promega). Šio zondo specifinis aktyvumas buvo 10⁸ cpm/µg.

8.2. Rezultatai ir aptarimas

BDNF mRNR ekspresijos iš nervinio audinio palyginimui su kitais audiniais buvo naudojama northern-blot analizė. Northern-blot analizė buvo atliekama

naudojant pelės audinius, leidžiančius greičiau atlikti RNR ekstrakciją, nei su kiaulės audiniais. 32P-kDNR zondas aptiko signalą apytiksliai 1,45 kb smegenyse (4 pav.) ir nugaros smegenyse (duomenys neparodyti). Svarbu kad nebuvo aptiktas signalas nei vienam kitam audinyje, tame tarpe, inkstuose, žarnyne, plaučiuose, kepenyse, tulžyje, širdyje ir raumenyse (4 pav.). Laikant, kad kiaulės mRNR dydis yra panašus su pelės mRNR, kDNR seka parodyta Fig.2 sudaro daugiau nei 80% pilnos mRNR sekos.

Svarbus pastebėjimas BDNF fiziologijos transdiferenciacijai yra tai, kad mRNR, koduojanti šį baltymą, aptinkama tik centrinėje nervų sistemoje, ir neaptinkama nei viename iš septynių ne nervinių audinių, BDNF mRNR buvo aptikta ne tik galvos smegenyse, bet ir nugaros smegenyse ir *superior colliculus* (seka parodyta Fig.1, gauta iš *superior colliculus* kDNR matricos). Tai patvirtina mintį, kad BDNF yra neurotrofinis faktorius taikininės kilmės, ir kad reaguojantys į BDNF neuronai arba priklauso CNS arba susiję su CNS struktūromis. Iš tikrųjų, visi neuronai, kurie, kaip žinome, reaguoja į BDNF arba patenka į CNS, kaip dorsalinės šaknelės ar sensorinių galvinių mazgų neuronai (Lindsay, 1985, Chem. Biol. 112: 310-328; Davies, 1986, J. Neuroscience, 6: 1897-1904) arba yra CNS neuronai, kaip tinklainės ganglijinės ląstelės (Jonson, 1986, J. Neuros., 6:3031-3038). Būtina dar nuodugniau atlikti tyrimus, kad tiksliau nustatyti BDNF sintezės vietų pasiskirstymą centrinėje nervų sistemoje, bet jau dabar aišku, kad BDNF mRNR pasiskirstymas labai skiriasi nuo NGF mRNR, aptinkamos daugelyje ne CNS audinių (Choiman, 1984, EMPO 3:3183-3189; Schelton 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81: 7951-7955).

9. Pavyzdys: Žmogaus ir žiurkės BDNF genų molekulinis klonavimas ir apibūdinimas

9.1. Medžiagos ir metodai

9.1.1. Geninės DNR ir kDNR bibliotekos

Suaugusio žmogaus tinklainės kDNR ir liambda- ZAPII biblioteka buvo gauta iš Stratageno. Žmogaus placentos genomines DNR biblioteka, esanti EMBL3/SP6/T7, buvo gauta iš Klontex. Žmogaus vaisiaus smegenų kDNR

biblioteka, esanti λ gtII, buvo gauta iš Klontex. Žiurkės genominės DNR biblioteka, esanti EMBL3/SP6/T7, buvo gauta iš Klontex. Abi genominės bibliotekos buvo paruoštos dalinai suskaidant genomines DNR restrikcine nukleaze Sau3A ir įstatant į vektoriaus BamHI saitą. Žiurkės smegenų kDNR biblioteka, esanti liambda-ZAPII buvo gauta iš Stratageno.

9.1.2. BDNF DNR zondų paruošimas

Žymėti su 32P BDNF DNR zondai buvo gaminami panaudojant tuos pačius oligonukleotidinius praimerius, aprašytus aukščiau 7.1.1. skyriuje, panaudojant PCR reakciją su žmogaus genome DNR, kad amplifikuotųsi sritis, koduojanti 28-111 žmogaus BDNF aminorūgščių liekanas. Paraleliai buvo gautas specifinis žiurkės BDNF zondas žymėtas 32P, panaudojant žiurkės genominę DNR kaip matricą PCR reakcijoje.

9.1.3. Bibliotekų skryningas

Liambda-faginių bibliotekų skryningas buvo atliktas standartiniais metodais (Benton ir Davies, 1977, Sci. 156: 180-182; Maniatis ir kt., 1978 Cell. 15:687-701), hibridinant 50% formaldehyde su dekstransulfatu ir Denharto tirpalu prie 42°C. Filtrai iš anksto buvo hibridizuoti 50% formamide prie 42°C su 5xSSCPE 10% Denhardt, 0,5 mg/ml lašišos spermos DNR, 0,1% SDS ir 10% dekstransulfato. Hibridizacija buvo atliekama tame pačiame buferyje tik Denhardto tirpalo buvo 2%, lašišos spermos DNR buvo 0,1 mg/ml, o SDS ir dekstrino sulfato nebuvo. Po hibridizacijos filtrai buvo praplaunami prie 68°C. Žmogaus BDNF zondą naudojo žmogaus genominės bibliotekos ir tinklainės kDNR bibliotekos skryningui. Žiurkės BDNF zondą naudojo žiurkės genominės bibliotekos ir kDNR bibliotekos skryningui. Bibliotekų skryningui buvo naudojami žmogaus ir žiurkės NGF zondai, paruošti kaip aprašyta aukščiau 7.1.1. skyriuje.

9.2. Rezultatai ir aptarimas

Buvo perrinkta bent jau 670000 dėmių iš kiekvienos bibliotekos. Teigiamais žmogaus klonais skaitėsi tie iš jų, kurie kryžminosi su žmogaus BDNF zondų, bet nesikryžmino su aprašytu aukščiau žmogaus NGF zondų. BDNF genominiai

klonai buvo gauti iš žmogaus ir iš žiurkių bibliotekų su dažniu, viena BDNF geno kopija kiekvienam haploidiniam genui. Žmogaus ir žiurkės bibliotekose buvo perrinkta apytiksliai milijonas dėmių. Trys teigiamos buvo gautos iš žiurkės genomines bibliotekos ir viena iš žmogaus. Teigiami klonai iš žmogaus tinklainės kDNR ir žiurkės smegenų bibliotekų buvo gauti su dažniu, kuris derinosi su labai žemu genų ekspresyvumo lygiu; iš 670000 žiurkės smegenų kDNR klonų buvo identifikuoti tik du teigiami klonai; iš 670000 žmogaus tinklainės kDNR klonų buvo identifikuotas tik vienas teigiamas klonas. Nebuvo rasta nei vieno teigiamo klono iš 670000, esančių DNR bibliotekoje, paruoštoje iš žmogaus vaisiaus smegenų. Žmogaus BDNF kDNR ir genominių klonų nukleotidinių sekų nustatymas buvo vykdomas, panaudojant sintetinius oligonukleotidinius praimerius, kurie buvo tikslios kopijos sekų, koduojančių žmogaus ir žiurkės BDNF, kaip aprašyta aukščiau 7.2.1. skyriuje. Ilgiausias, gautas žmogaus BDNF klonas, turėjo intarpą apytiksliai nuo 1,6 iki 1,8 kbr, ir, kaip tikėtasi, turėjo tikslią seką dalies žmogaus BDNF, nustatyto po tiesioginio amplifikavimo iš žmogaus genomines kDNR, kaip aprašyta aukščiau 7.2. skyriuje. Išsami šio kDNR klono sekos analizė (5 pav.) parodė, kad joje yra atviras nuskaitymo rėmelis, koduojantis polipeptidą iš 247 aminorūgščių, panašus, bet ne identiškas kiaulės BDNF pilno ilgio pirmtakui. Viduje srities, atitinkančios subrendusį BDNF polipeptidą (pvz., nuo His 134 kodono iki grandinės galo kodono) nebuvo aptikta skirtumo išvestoje aminorūgščių sekoje. Visi nukleotidų pakeitimai tarp žmogaus ir kiaulės buvo konservatyvūs koduojamos sekos atžvilgiu. Polipeptido, spėjamo BDNF pirmtako, liekana turėjo tam tikrus skirtumus žmogaus ir kiaulės aminorūgščių sekose, o labiausiai ryškus skirtumas tai, kad žmogaus BDNF gene trūksta penkių iš šešių vienas paskui kitą einančių Ser kodonų, esančių pas kiaulę, dėl ko sutrumpėja polipeptidas (247 vietoj 252 a. r.).

Bibliotekos, paruoštos EMBL3 vektoriuje, turi svetimus 10-25 kbr dydžio intarpus. Tikslus dydis intarpo, esančio smulkiai ištirtame žmogaus genomio BDNF klone, nebuvo nustatytas. Tačiau, šis klonas, turintis vienintelį restrikcinės endonukleazės Eco RI fragmentą, apytiksliai 4 kbr dydžio, kuris buvo kryžminamas su žymėtu BDNF zonu, buvo naudojamas bibliotekos skyrinui.

Šis fragmentas turi laukiamą ilgį, gautą remiantis žmogaus genomines DNR su kiaulės BDNF zondų Southern-blot-hibridizacijos rezultatais, kaip aprašyta aukščiau. Nukleotidinės sekos analizė buvo atlikta su žmogaus klonu, panaudojant sintetinius oligonukleotidus, kurie yra kDNR sekos, veikiančios kaip praimeriai DNR sintezės nuo bakteriofaginės matricinės DNR metu. Buvo aptikta, jog nukleotidų seka, koduojanti spėjamą žmogaus BDNF pirmtaką, identiška sekai žmogaus kDNR klonui, išskyrus vienintelį nukleotido 785 pakeitimą prepro-srityje, atitinkantį aminorūgšties metionino (ATG) pakeitimą valinu (GTG), žr. Fig.5 Šis pakeitimas gali atspindėti polimorfizmą žmogaus genome. Kaip ir žmogaus NGF atveju, nebuvo aptiktas nei vienas nitronas viduje sekos, koduojančios spėjamą žmogaus BDNF. Žiurkės kDNR sekos duomenys taip pat pateikti Fig.5

10. Pavyzdys: rekombinuoto BDNF ekspresija

10.1 Medžiagos ir metodai

10.1.1. Vektoriaus paruošimas BDNF ekspresijai

Seka, atitinkanti kiaulės prepro BDNF buvo paruošta panaudojant oligonukleotidinius praimerus (po 150 *pmol* kiekvienas):

ATAATCTAGATGACCATCCTTTTCCTT (prasminis siūlas)

ATAATCTAGACTATCTTCCCCTCTTAAT (antiprasminis siūlas)

PCR reakcijoje ir panaudojant 1 μ g kiaulės genomines matricos (kiekvienas praimerus turi papildomą saitą). Amplifikacijos reakcija atlikta kaip aprašyta, išskyrus tai, kad renatūracijos temperatūra buvo 50°C. Po suskaldymo su Xba1, amplifikuota DNR įstatoma į Xba1 saitą pCMV plazmidėje, kad pasigamintų pCMV'-pBDNF⁻¹ (-1 reiškia prasminę orientaciją Fig.6 ir atitinka COS+ V lentelėje), ir plazmidę įvesdavo į bakteriją XL-1 elektroporacijos būdu.

10.1.2. BDNF ekspresija COS ląstelėse

pCMVI-pBDNF DNR iš teigiamų klonų (patikrintus kryžminimu su oligo 5, Fig.2) buvo išpjauta iš Xba1 ir Pst I. Gautų produktų dydis leido nustatyti intarpų orientaciją, ir abi plazmidės buvo naudojamos COS ląstelių transfekcijai pagal kalcio fosfato būdą (Chen ir kt., 1987 Mol. Biol., 7:2745-2752), ir auginimo

terpę surinkdavo po 24 valandų. BDNF aktyvumas buvo tiriamas bioeksperimentais su vištos embriono dorsalinės šaknelės mazgais, smulkiai aprašytais aukščiau.

10.2. Rezultatai ir aptarimas

E8 viščiuko nugaros smegenų sensoriniai neuronai buvo patalpinami į indą, palaikant tankį 6000 į duobutę, inkubuojami 24 valandas ir po to suskaičiuojami (Lindsay ir kt., 1985, Develop. Biol. 112:319-328). Buvo vertinamas vidurkis iš trijų skaičiavimų $\pm$ standartinis nukrypimas. Vartojant, BDNF ir NGF koncentracijos buvo 1ng/ml, prie kurių buvo stebimas maksimalus išgyvenimas, veikiant kiekvienam iš faktorių. COS+ tai ląstelės, transfekuotos plazmidėmis, turinčiomis BDNF intarpus prasminėje orientacijoje, o COS tai ląstelės, transfekuotos plazmidėmis, turinčiomis BDNF intarpą atvirkščios orientacijos. COS priklauso netransfekuotoms ląstelėms. Praskiedžiant daugiau nei 1:20 nebuvo pastebėtas išgyvenimo padidėjimas, lyginant su kontrole COS ir kondicionuotose COS terpėse. Visuose eksperimentuose be NGF, monokloniniai antikūnai prieš NGF (Korsching ir kt., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 80:3513-3516) buvo naudojami 1 ng/ml koncentracijos. Kaip parodyta V lentelėje, tik terpėje, gautoje iš COS ląstelių kultūrų, nešančių pOMVI-pBDNF plazmidės su prasmine orientacija, buvo pastebėtas viščiuko sensorinio neurono išgyvenimo padidėjimas, lyginant su kontrolinėmis reikšmėmis. Iš to daroma išvada, kad rekombinantinis BDNF yra biologiškai aktyvus. Toliau, BDNF, išskirto iš kiaulės smegenų, pridėjimas žymiai nepakėlė sensorinio neurono išgyvenimo lygio, pasiekto vien tik rekombinantiniu BDNF, tuo pačiu rodydamas, kad rekombinantinė BDNF sugeba įsotinti BDNF receptorių. Taip pat buvo aptikta, kad rekombinantinis BDNF, kai vartojamas kartu su NGF, gali veikti papildomai ir sinergetiškai, pagerindamas viščiuko sensorinių neuronų išgyvenimą.

V lentelė

Kultivuojamų viščiuko sensorinių neuronų išgyvenimas			
COS terpė (galutinis skiedimas)	I:20	I:50	I:200
COS+		2,510 $\pm$ 263	2,833 $\pm$ 171

COS-	211±16
COS	250±87
BDNF + COS+	2,516±209
NGF + COS+	5,770±72
tik BDNF	2,718±424

11. Pavyzdys: Antikūnų prieš BDNF generavimas

11.1. Medžiagos ir metodai

Polikloninį antiserumą, specifinį BDNF molekulėms, žymimą sera4, generavo balto triušio NZ, imunizuodami sintetiniu peptidu

11.1.1. Peptidų sintezė ir jų sujungimas su nešikliu

Peptidas, sudarytas iš 34 aminorūgščių liekanų, žymimas kaip B5, buvo sintezuotas įprastiniais metodais. Šis peptidas turi žemiau parašytą aminorūgščių seką, kuri atitinka 33 liekanas iš subrendusios BDNF (153-185 liekana iš pilnos kiaulės prepro BDNF sekos, parodytos 1 pav) su papildoma cisteino liekana amino gale (parodyta rašytiniu šriftu), skirta prisijungti prie baltymo nešiklio, panaudojant m-maleimidobenzoinės rūgšties -N-hidroksisukcinimidą (MBS): pagal norą: Cys-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Lys-Lys-Thr-Ala-Val-Asp-Met-Ser-Gly-Gly-Thr-Val-Thr-Val-Leu-Glu-Lys-Val-Pro-Val-Ser-Lys-Gly-Gln-Leu-Lys-Gln-Tyr. B5 peptidas buvo sujungtas su albuminu iš jaučio serumo, panaudojant bis-diazo-benzidina (BDB). Šviežias BDB buvo paruoštas ištirpinant 46 mg benzidin-HCl. 35 mg NaNO₂ ištirpinami 1 ml vandens ir pridedama jo prie benzidino tirpalo, maišant 1 valandą prie 4°C. 21 mg BSA buvo ištirpinamas 3 ml 0,16 M borate, 0,13 M NaCl, pH 9. Apie 15 mg B5 peptido ištirpindavo 1,5 ml borat-NaCl buferyje, pH 6. Peptido tirpalą pridėdavo prie BSA tirpalo ir padėdavo ant ledo, 1 ml BDB pridėdavo prie BSA peptidinio tirpalo, ir reakcijos mišinį inkubuodavo maišydami 2 valandas prie 4°C; tuo metu pH buvo stebimas ir palaikomas 9 lygyje pridedant, jei reikia, nedidelius kiekius 0,5 M NaOH. Reakciją nutraukdavo pridėdami 0,2 ml 1% buferizuoto fenolo tirpalo. Reagentų perteklių pašalindavo dializės pagalba buferizuotame fosfatu fiziologiniame tirpale (PBS).

11.1.2. Imunizacija

Iš viso šeši triušiai buvo imunizuoti pagal šias procedūras:

Triušiai 1 ir 4 - B5 peptidu, prijungtu savo O galu prie BSA, panaudojant BDB;

Triušiai 2 ir 3 - B5 peptidu, sujungtu savo N galu su BSA, panaudojant MBS;

Triušiai 5 ir 6 - B5 peptidu, sumaišytu su miltelių pavidalo nitroceliulioze.

Visais atvejais pirmam imunizavimui naudodavo 1 ml imunogeno (100µg B5/500µg nitroceliuliozės 5 ir 6 triušiams), esančio 0,5 ml PBS + 0,5 ml pilno Freindo adjuvanto. Šį mišinį injekcijos pagalba įvedavo po oda keliose nugaros vietose. Antrąją imunizaciją atlikdavo po 3 savaitių, ir ji būdavo identiška pirmajai, išskyrus tai, kad vietoj pilno Freido adjuvanto buvo naudojamas nepilnas adjuvantas. Sekančias injekcijas atlikdavo kas keturios - šešios savaitės. Praėjus 1 savaitei po imunizacijos iš triušių imdavo kraują ir paprastai tikrindavo antiserumo sugebėjimą surišti gryną B5 peptidą eksperimentuose su imunosorbentu, surištu su fermentu (ELISA).

11.1.3. Antikūnų susirišimo su BDNF aptikimas

100 µg antigeno (B5 peptido), esančio vandenyje, įpildavo į indo, skirto mikrotitravimui, duobutes ir palikdavo iki ryto kad išdžiūtų, po to trumpai praplaudavo vandeniu ir blokuodavo 100 µg 1% želatina 30 min., kambario temperatūroje. Duobutes praplaudavo 3 kartus distiliuotu vandeniu, o po to pridėdavo 100 µg antiserumo ir palikdavo iki ryto prie 4°C. Po to duobutes praplaudavo tris kartus su PBS/0,5% tritono λ-10, o po to į duobutes pridėdavo 100µg peroksidazinio žymėto antitriušinio imunomėginio (skiedimas 1:1000) ir inkubuodavo kambario temperatūroje 3 valandas. Duobutes praplaudavo 2 kartus ir pridėdavo 100 µg ABTS (10 mg ABTS "Sigma" ištirpindavo 10 ml 0,1 M natrio citrato, pH 4, + 10 µg H₂O₂) ir inkubuodavo apytiksliai 5 min. kol pasirodė spalva. Reakciją nutraukdavo pridėdami 10 µg 1% NaN₃. Pavyzdžius skiedavo 1:5 vandeniu ir matavo optinį tankį prie 415 nm.

11.2. Rezultatai ir aptarimas

Antiserumas iš 4 triušio (Lega 4) parodė aukščiausią titrą (Fig.7c) ir buvo panaudotas tolimesniuose eksperimentuose. Antikūnai iš 4 serumo dalinai buvo išskirti nusodinant amonio sulfatu; ir prie dalies antiserumo maišant lėtai pridedamas lygus tūris sotaus amonio sulfato, ir tirpalas buvo maišomas dar 15 min, o po to dar centrifuguojamas prie 2000 g. Nuosėdos praplaunamos du kartus 50% sočiame amonio sulfate, o po to vėl ištirpinamos PBS tūryje, atitinkančiame pradinį serumo tūrį. Amonio sulfatą pašalindavo dializės būdu kelis kartus keičiant PBS. Dializuotą tirpalą išpilstė į 1 ml tūrius ir liofilizavo panaudojant greitaeigį vaakuminį garintuvą. Antikūnų pavyzdys iš 4 serumo pakartotinai suspendavo 0,5 ml vandens ir tikrino reaktyvumą į B5 peptidą, panaudojant ELISA. Reakcija buvo aptikta esant praskiedimui 1:4000.

Polikloninius antikūnus prieš sintetinį peptidą (B5), atitinkantį kiaulės BDNF fragmentą iš 33 aminorūgščių, generavo imunizuodami triušius, kaip aprašyta aukščiau. Serumas 4, parodęs didžiausią titrą prieš sintetinį peptidą, pademonstravo reaktyvumą prieš valytą BDNF iš kiaulės smegenų, panaudojant ELISA (7b pav.). Silpnas reaktyvumas taip pat buvo aptiktas atliekant imunoblotingą (duomenys neparodyti). Tačiau antiserumas nesugebėjo blokuoti BDNF aktyvumą bioeksperimentuose su vištos embriono dorsalinės šaknelės sensoriniais neuronais.

12. Pavyzdys: nauji BDNF biologiniai poveikiai

Šie rezultatai rodo, kad BDNF gali:

- (I) palaikyti išgyvenimą ir iššaukti pilnai diferencijuotą būseną dopaminerginiuose CNS neuronuose;
- (II) palaikyti cholinerginių CNS neuronų išgyvenimą;
- (III) slopinti astroglijinių ląstelių proliferaciją. Šie biologiniai BDNF poveikiai anksčiau nebuvo aprašyti. Kadangi dopaminerginiai neuronai, cholinerginiai neuronai, ir astrogljinės ląstelės gali būti susietos nervinėmis ligomis arba sutrikimais, BDNF gali būti naudingas gydant neuropatologijas, apimančias šias ląstelių populiacijas.

12.1. Medžiagos ir metodai

12.1.1. Substantia nigra dopaminerginių neuronų kultivavimo metodai

Ventralinės vidurinės smegenis disekcijos pagalba išimdavo iš įvairaus amžiaus žiurkių embriono smegenų, nuo 13 dienos embrioninio vystymosi (E13) iki 15 embrioninės dienos. Paprastai, kiekviename eksperimente naudodavo pavyzdžius iš dviejų kartų. Disekcijos tirpalas turėjo šią sudėtį: NaCl, 138,8 mM; KCl, 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7H₂O, 80 mM; KH₂PO₄, 1,5 mM gliukozė, 6 mg/ml; BSA 0,1 mg/ml, pH 7,4. Šis tirpalas po paruošimo buvo sterilizuojamas per filtrą su 0,2 µm poromis. Disekciją atlikdavo nesteriliose sąlygose. Kada audinius ištraukdavo iš visų smegenų, likusias procedūras atlikdavo steriliose sąlygose. Audinio fragmentus patalpindavo į 35 mm kultivavimo indą ir smulkindavo mažomis žirkklėmis. Po to prie audinio pridėdavo 2 ml mitybinės terpės F-12, turinčios 0,125% tripsino, ir inkubuodavo prie 37°C. Gale šio inkubacijos periodo, prie suspensijos pridedama DNR H I taip, kad galutinė koncentracija būtų 80 ng/ml. Buvo atliekama kita identiška inkubacija ir po to audinio suspensiją pridėdavo prie 8 ml auginimo terpės, sudarytos iš minimaliai būtinos terpės (MEM) su pridėtais 2 mM gliutamino, 6 mg/ml gliukozės, 5 vienetais/ml streptomicino ir 7,5% fetalinio veršiuko serumo (FCS). Pavyzdys centrifuguojamas ant centrifugavimo staliuko kambario temperatūroje prie 300 aps/min 5 minutes. Terpę paimdavo išurbdami ir 2 ml augimo terpės pridedami prie ląstelių nuosėdų. Su pipete, turinčia 1 mm angą, ląstelės buvo tritruojamos aštuonis kartus. Likusiems ląstelių fragmentams leisdavo nusėsti, veikiant žemės traukos jėgai, ir, ląstelių kiekio nustatymui, buvo paimtas didesnis supernatanto mėginys, skaičiuojant su hemocitometru. Po ląstelių tankio nustatymo, šias ląsteles perkeldavo į kultivavimo lėkšteles, išlaikydami tankį 50000 ląstelių į kvadratinį centimetrą.

Kultivavimo indai paruošiami dieną prieš disekciją. Audinių indai (24 duobutės, 2 cm² kiekvienai duobutei) iš anksto padengiami poliornitinu (molekulinė masė 30000-70000 g/M) naudojant 0,5 mg/ml kiekį kambario temperatūroje 3 valandas. Lėkšteles gausiai perplovę vandeniu ir po to apdorojo pelių lamininu, 5 mg/ml prie kambario temperatūros 3 valandas. Po to indus

perplovė vandeniu kaip ir aukščiau ir inkubavo auginimo terpėje iki ryto prie 37°C drėgnesnėje atmosferoje, sudarytoje iš 5% CO₂, 95% oro. Terpę iš indų pašalino sekančią dieną ir pakeitė šviežia auginimo terpe. Kada ląstelės buvo patalpintos į auginimo indus, juos perkėlė į inkubatorių prie 37°C ir 5% CO₂ (95% oro) 24 valandoms. Auginimo terpę keitė į mišinį neturintį sieros (SFM) I:I (tūris/tūris) mišinys (BEM) "Basal eagle Medium" terpės ir mitybinės terpės F-12 su gliukoze (33 mM), glutamino (2 mM), NaHCO₃ (15 mM), HEPES (10 mM), pridedant insulino (25 µg/ml), transferino (100 µg/ml), putresino (60 µg/ml), progesterono (20 nM), natrio selenito (30 nM), penicilino (5 vnt/ml), streptomicino (5 mg/ml), ir T₃ (30 nM). Kai kuriuose eksperimentuose išvalytus NGF ir BDNF pridėdavo į kultūras po terpės keitimo, praėjus dviem kultivavimo dienoms.

Tirpalai, naudoti dopaminerginių neuronų auginimui, buvo ruošiami naudojant vandenį iš reagento Milli-Q vandens sistemos. Audinių auginimo terpės mišinys buvo gautas iš Gibco laboratorijos, Santa Clara, California, kaip ir veršiuko fetalinis serumas (partijos numeris 43N1086) ir pelių lamininas. Visi kiti terpės komponentai buvo pirkti pas Sigma Chemical (St. Louis, MO) ir buvo testuotų ląstelių kultūrų reagentų tipo. Poliornitas ir DNAH I taip pat buvo gauti iš Sigma. Tripsinas buvo gautas iš Worthington (Freehold, N.J.), partijos numeris 3667. Komerciniai chemikalai buvo analitinio švarumo ir nupirkti iš Baker Chemical (Philipsburg, N.J.). Eksperimentuose naudotą BDNF iš kiaulės smegenų išskyrė dr. Barde, pagal savo metodiką (Y.A. Barde, 1982, žr. aukščiau).

12.1.2. Kultūrų iš ventralinių vidurinių smegenų imunocitochrominio dažymo būdai

Kiekvienam eksperimentui buvo gaminami švieži fiksuojantys tirpalai. Dažant tirozin-hidroksilaze (TH), fiksatoriumi buvo 4% paraformaldehidas fosfatiniame Sorensono buferyje. Sorensono buferis buvo ruošiamas pridedant 0,2 M KH₂PO₄ tirpalo prie 0,2 M Na₃PO₄ kol pH pasiekia 7,3. Vėliau į tirpalą pridėdavo paraformaldehidą ir trumpai pakaitindavo, kad jis ištirptų, ir atšaldydavo iki kambario temperatūros prieš vartojimą.

Procedūros pradžiai, kultivavimo terpę pašalindavo iš kultivavimo indų atsargiai išsiurbiami ir į indą atsargiai pridėdavo atitinkamo fiksuojančio tirpalo. 20 minučių inkubuodavo kambario temperatūroje. Po to sekdamo 3 praplovimai fosfatiname Sorensono buferyje, po 5 min. kiekvienas, lengvai sukant. Ląsteles po to inkubuodavo 30 min gesinančiame tirpale prie kambario temperatūros, lengvai maišant. Gesinantis tirpalas, skirtas kultūroms dažomoms su TH, sudarytas iš fosfatinio Sorensono buferio, turinčio 2% normalaus arklio serumo. Po to, kultūros inkubuojamos pralaidumą didinančiame buferyje 30 min. kambario temperatūroje, lengvai maišant. Kultūroms, kurios dažomos su TH, tirpalas buvo sudarytas iš Sorensono buferio su 0,2 % saponino ir 1,5% normalaus arklio serumo. Po pralaidumo pakėlimo stadijos, kultūros buvo inkubuojamos su pirminiais antikūnais iki ryto prie 4°C. Antikūnai prieš žiurkės TH, tai pelių monokloniniai antikūnai IgG2a izotipo. Jų koncentracija buvo 40µg/ml 10 mM Na₃PO₄, 50 mM NaCl, 0,2% saponino tirpale prie pH 7,5. Po inkubacijos su pirminiais antikūnais kultūras tris kartus praplaudavo po 15 min. kiekvieną kart atitinkamame didinančiame pralaidumą buferyje. Po to, kultūras inkubuodavo su antriniais antikūnais, konjuguotais su biotipu, būtent, su biotipuotais arklio antipeliniais IgG. Šis inkubavimas truko 2 val. lengvai maišant kambario temperatūroje. Toliau, sekė praplovimai, sutampantys su aukščiau aprašytais, po to kultūros inkubavimas su iš anksto suformuotu krienų peroksidazės x-biotipuotu kompleksu (reagentas ABC, laboratorija Vektor, Burlingance, CA), paruošta pagal gamintojo instrukcijas. Po 30 min. inkubacijos prie kambario temperatūros, lengvai maišant, šios kultūros buvo praplaunamos kaip aprašyta anksčiau. Po to kultūras inkubuodavo su 55 mM Tris-HCl, turinčio 0,5 mg/ml diaminobenzidino ir 0,01% vandenilio peroksido, su pH 7,5. Reakcijos produktui buvo leidžiama vystytis 2-5 minutes ir po to tirpalą pašalindavo ir kultūras kelis kartus praplaudavo lediniu PBS. Tada nustatydavo teigiamų ląstelių kiekį kvadratiname centimetre.

Paraformaldehidas ir gliutaraldehidas buvo gauti iš FLUKA Chemical. Rinkiniai Vectastain, turintys normalų antiserumą (naudojamą kaip blokuojantį reagentą), biotipuotas afiniškai išvalytas antiimunohemoglobulinas, avidinas DH,

ir biotipuotas HRP-H buvo nupirkti iš Vektor. Diaminobenzidinas buvo gautas iš BRL (Gaithersberg, MD).

12.1.3. Būdai, naudojami ^3H -dopamino suvartojimo ventralinėse vidurinėse smegenyse, nustatymui.

^3H -dopamino (^3H -DA) suvartojimo tyrimai buvo atliekami pagal Dal Togo ir kt. (1989, J. Neurosci 8:733-745) su nežymiais pakeitimais. Tam skirtas buferis buvo sudarytas iš: NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8mM, KH_2PO_4 1,5 mM, gliukozės 5,0 mM, CaCl_2 1,0 mM, MgSO_4 1,0 mM, askorbino rūgšties 0,1 mM, pargilino 0,1 mM, su pH 7,4. Kai būtina, prie šio buferio pridedama 5,0 μM BZT (benzotropino mezilotas).

Ląsteles praplaudavo vieną kartą su iš anksto pašildytu buferiu (37°C) ir išpilstydavo į 2 cm^2 duobutes po 0,4 ml šio buferio. Po to kultūras palikdavo parengtiniam inkubavimui 5 min., prie 37°C . Gale šio parengtinio inkubavimo į buferį (230 nm, 40°C (mM)) pridėdavo 0,1 ml ^3H -DA taip, kad galutinė H-DA koncentracija buferyje būtų 50 nM. Kultūrą inkubuodavo 15 min. prie 37°C , o po to 4 kartus praplaudavo su 0,5 ml aprašyto buferio prie 4°C . Du papildomus perplovimus atlikdavo su lediniu PBS (10 mM Na_3PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,6). Po to, kai baigiamas paskutinis perplovimas, prie ląstelių, esančių 2 cm^2 duobutėse, pridėdavo po 0,2 ml 0,2 M NaOH ir palikdavo stovėti kambario temperatūroje 2 val. Po to, surinkdavo NaOH ekstraktą ir suskaičiuodavo scintiliaciniame skaitiklyje (Pakkard, LS 500 TD) su 10 ml scintiliacinio skysčio Ultimagold. Specifinį vartojimo apskaičiavimą atlikdavo nutraukdami suvartojimą su 5 μM BZT. Paprastai, tai sudarydavo 70-90 % suvartojimo.

^3H -DA buvo gautas iš NEN (Boston, MA). Askorbatas, pargilinas, BZT ir gliukozė buvo gauti iš Sigmos (St. Luis, MO). Scintiliacinis skystis Ultragold buvo pirktas iš Pakkard (Seterling, VA).

12.1.4. Bazalinių galinių smegenų cholinerginių neuronų kultūrų gavimo būdai

Bazalinių galinių smegenų cholinerginių neuronų pirminės kultūros buvo gautos iš 17 dienų amžiaus žiurkių embrionų. Konkrečiai, cholinerginiai neuronai, naudoti šiame tyrime, buvo gauti iš medialinio pertvarinio branduolio

ir diagonalinės Broko juostos branduolio. Ši neuroninė populiacija pirmiausia įsiskverbia į amonio ragą. Disocijavusiais mišrias kultūras (neuronų ir glijos) gaudavo šiuo būdu.

Pertvarinę sritį išlaisvindavo disekcijos būdu iš aplinkinių audinių ir pašalindavo iš vaisiaus smegenų. Po to audinio gabalėlius surinkdavo, smulkindavo žirkklėmis ir apdorodavo 12,5 % tripsinu 20 min. prie 37°C. Tripsiną inaktyvuodavo praskiesdami induose esančia terpe, (Dulbekko modifikuota MEM terpė (DMEM), kuri turi 1% penicilino ir streptomicino, 5% arklio serumo ir 1% N5-hormoninio priedo). Ląstelių suspensiją (vienintelę) gaudavo trituruodami suskaldytus audinių fragmentus su Pastero pipete. Disocijavusias ląsteles skaičiuodavo hemocitometro pagalba ir paskirstydavo į indus su tinkamu tankiu indų terpei. Praėjus 3-6 val. po išsėjimo, į kultūras pridedami testiniai ligandai, o po to ląsteles augino *in vitro* 10 dienų keisdami tepę kas 3 dienas.

12.1.5. Bandymai su cholinacetiltransferaze

Po apdorojimo ląsteles naudodavo arba eksperimentuose su fermentu CAT (cholinacetiltransferazė) arba imunologiškai dažydavo su CAT, pagal šią metodiką. Monokloniniai antikūnai prieš CAT buvo nupirkti iš Beringer Manngem Biochemical Co. Eksperimento pabaigoje ląstelės du kartus praplaunamos su DMEM. Kultūrą fiksuodavo dviem stadijomis. 50 µl 4% paraformaldehidą pridėdavo prie 50 µl DMEM ir inkubuodavo 10 min. Šį tirpalą pašalindavo ir pakeisdavo 100 µl 4% formaldehidu, ir inkubuodavo 30 min. kambario temperatūroje. Po fiksavimo, ląsteles praplaudavo 3 kartus fiziologiniu tirpalu (PBS), buferizuotu fosfato pagalba, ir padarydavo juos pralaidžiais inkubuodami 30 minučių su 0,5 mg/ml saponinu. Detergentą pašalindavo trimis praplovimais su PBS ir 30 minučių pridėdavo blokuojantį 5% triušio normalaus serumo tirpalą. Po blokuojančio tirpalo pašalinimo, pridėdavo pirminių antikūnų, praskiestų 1:3 1% triušio normaliu serumu, ir kultūrą inkubuodavo iki ryto prie 4°C. Šį tirpalą, turintį pirminį antikūną, pašalindavo praplaudami su PBS. Surištą imunoglobuliną aptikdavo Vectastain "ABC" metodu. Diaminobenzidino tetrahydrochloridą (DAB) naudodavo kaip peroksidazės reakcijos substratą, kurią paprastai vykdavo 1-5 min. Reakciją nutraukdavo

skalaudami kultūras 2 kartus 0,1 M Tris-HCl pH 7,2. Kultūrą saugojo 30 mM Tris, turinčiame 0,15 M NaCl, 42% glicerino ir 0,15% Zephiran (Pierce Chemical Co., Rockvills, I L) prie 4°C, pH 7,6.

12.1.6. Grynu kultūrų iš astroglijinių ląstelių generavimo metodas

Grynas glijos ląstelių kultūras paprastai ruošdavo pagal McCarthy, K.D. ir DeVellis (McCarthy, K.D. ir DeVelles, J. 1980, J. Cell. Biol 85:890-902) metodą iš pirmos ar antros postnatalinės dienos amžiaus žiurkės amonio rago. Amonio ragus pašalindavo 5 jaunikliams ir susmulkindavo žirkklėmis. Audinio gabaliukai po to paveikiami 2 ml 0,125% tripsino 20 min, prie 37°C. Proteazę inaktyvuodavo praskiesdami terpe (10% veršiuko fetalinio serumo (Gibco), DME, 0,5% penicilino (3000 mkg/ml) ir 0,5% gliutamino). Vienintelė ląstelių suspensija buvo gauta praleidžiant suvirškintus audinių fragmentus per Pastero pipetę su persmauka. Ląsteles atskirdavo centrifuguodami 5 min. prie 900 aps/min, pakartotinai suspenduodavo lėkštelių terpėje ir po to suskaičiuodavo hemocitometru. Vienintelė ląstelių suspensija buvo padalinta į tris dalis, kiekvieną į audinių auginimo indą, turintį 75 cm² ploto ir ląsteles augino apytiksliai iki 80%-nio susilieimo. Po to ląsteles pakartotinai augino, panaudodami tripsinizacijos metodą, panašų į ką tik aprašytąjį. Glijos ląsteles suskaičiuodavo ir patalpindavo į indus, išlaikydami tankį 10000 ląstelių į 0,9 cm².

12.2. Rezultatai

12.2.1. BDNF poveikis tirozinhidroksilazei, esančiai ventralinių vidurinių smegenų kultūrose

Imunocitocheminį dažymą, koks aprašytas aukščiau 12.1.2. skyriuje, naudojo įvertinimui BDNF poveikio į ląsteles, turinčias teigiamą atsaką į tirozinhidroksilazę (TH) (8 pav.). Maksimalus padidėjimas, daugiau kaip 200% lyginant su kontrole, buvo aptiktas 8 dieną ventralinių vidurinių smegenų ląstelių kultūrose, stimuliuotose su BDNF. Anksčiau 3-čią dieną buvo stebimas tik labai silpnas padidėjimas kultūrose, stimuliuotose su BDNF.

12.2.2. BDNF poveikis i ventralinių vidurinių smegenų kultūrų dopamino suvartojimą

^3H -dopamino (^3H -DA) sunaudojimas buvo matuojamas Dal Taco ir kt. metodu (1983, J. Neurosci 8:733-745) su nedideliais pakitimais, kaip aprašyta aukščiau 12.1.3. skyriuje. Nedidelis dopamino išsavinimo padidėjimas buvo aptiktas 8-tą auginimo dieną ventralinių vidurinių smegenų kultūrose, stimuliuotose su BDNF (9 pav.).

12.2.3. BDNF poveikis i galinių smegenų cholinerginių neuronų cholinacetiltransferazės ekspresiją

Fig. 10 a pateiktas BDNF poveikis CAT-teigiamų ląstelių kiekiui po 12 dienų auginimo *in vitro*. CAT-ląstelių padidėjimas 5,9 karto buvo aptiktas pridėjus 100 ng/ml BDNF, o apskaičiuota EC_{50} reikšmė buvo 10 ng/ml. Kaip teigiama kontrolė buvo naudojamos kultūros, turinčios tankį 26000 (juoda juosta) arba 150000 (punktyrinė juosta) ląstelių vienoje duobutėje, kurias apdorodavo tuo pačiu būdu, bet tik su NGF (Fig.10 b). Tankis, 260000 ląstelių i duobutę, atitiko tankį, naudotą tiriant BDNF. Šis CAT-imunoteigiamų ląstelių kiekio padidėjimas yra panašus i padidėjimą, apie kurį buvo pranešta anksčiau. Potencialus BDNF sugebėjimas veikti cholinerginius neuronus taip pat buvo patikrintas, matuojant CAT-fermentinį aktyvumą (F. Fonnum; I. Neurochemistry, 1975, 24:407-409). Fig.11 pavaizduoti CAT pakitimai, gauti apdorojant su BDNF. Šiuo atveju buvo gautas 1,8 karto padidėjimas, veikiant su 100 ng/ml BDNF, ir apskaičiuotas EC_{50} buvo 61 ng/ml.

12.2.4. BDNF ir EGF poveikis i astroglijos ląstelių kultūras

Buvo parodyta, kad II tipo astroцитai turi didelį afiniškumą receptoriams iš neurotransmiterių ir neuropeptidų aibės. Taip, astroцитai gali reaguoti i neuroninės kilmės signalus. Dėl šios priežasties, o taip pat todėl, kad II tipo astroцитai yra pirminių kultūrų ląstelinis komponentas, buvo tiriamas galimas tiesioginis BDNF poveikis i glijos ląsteles. Prieš pridėdami augimo faktorių šias ląsteles laikė 4 dienas *in vitro*, kad jų susiliejiimo procentas pasiektų 60%, o po to apdorodavo 42 val. su NGF ir BDNF. Po 18 val. inkubavimo i terpę pridedamas [^3H] metiltimidinas. EGF poveikis pateiktas Fig. 12 a. Kaip buvo skelbta

aukščiau, aptikta, kad EGF yra astrocitų mitogeninis faktorius. Maksimali reakcija buvo aptikta veikiant su 10 ng/ml EGF, kuris duodavo 5:2 karto didesnę [^3H] metiltimidino įsisavinimą. Fig. 12 b. parodytas BDNF poveikis į [^3H] metiltimidino įsisavinimą. Reakcija į BDNF buvo dvifazė: labai mažos dozės (0,1 ng/ml) davė silpną timidino įsisavinimo padidėjimą, o dozės didesnės už 1 ng/ml BDNF sulaikydavo [^3H] metiltimidino įsisavinimą. 5 ng/ml BDNF dozė davė 24% inhibavimą, tuo pačiu padidindama glijos ląstelių proliferacijos laipsnį apdorojimo periodo metu.

12.3. Aptarimas

Šie eksperimentai *in vitro* aiškiai rodo, kad BDNF palaiko išgyvenimą arba sukelia pilną diferencijavimąsi dopaminerginiuose neuronuose iš besivystančios pelės juodosios medžiagos, kaip parodyta dažant tirozinhidroksilaze ir dopamino suvartojimo kitimu šių neuronų kultūrose, paimtose iš žiurkės embriono vidurinių smegenų. Kadangi būtent šie neuronai degeneruoja Parkinsono ligos metu, tai didelė tikimybė, kad BDNF gali turėti terapinį potencialą gydant Parkinsono ligą arba sumažindamas neuronų praradimą, arba padidindamas tirozinhidroksilazės kiekį (fermentą, apribojantį dopamino sintezės lygį), arba, gal būt, abiem keliais.

Be to, kaip ir nervinio augimo faktorius NGF, BDNF veikia į žiurkių bazalinių galinių smegenų cholinerginių neuronų išgyvenimą, kaip parodyta CAT dažymo padidėjimu, CAT aktyvumo padidėjimu ir sustiprėjusiu acetilcholinesteraziniu dažymu žiurkės embriono medialinio pertvarinio branduolio ir diagonalinės Broko juostos branduolio kultūrose. Atitinkamai, pats BDNF arba kartu su NGF gali būti naudingas gydant ligas ir sutrikimus, kurie susiję su bazalinių galinių smegenų cholinerginiais neuronais, tame tarpe, pavyzdžiui, Alchaimerio ligą.

13. Pavyzdys: Naujo BDNF/NGF genetinės šeimos nario identifikavimas

Naujų BDNF/NGF genetinės šeimos narių identifikavimo būdas panaudojant PCR su išsigimusiais oligonukleotidais, pagrįstais aminorūgščių užkonservuotais tarp NGF ir BDNF segmentais (1-4 boksai, žr. 5.8 poskyrį), iš pradžių buvo bandomas nustatant ar gali abi poros tokių praimerių būti

panaudotos amplifikavimui tiek NGF geno tiek ir BDNF geno iš kelių rūšių gyvūnų genominės DNR. Šis būdas vėliau buvo panaudotas naujo geno, kuris turi homologiją su NGF ir BDNF visuose minėtuose keturiuose boksuose, identifikavimui.

13.1. Medžiagos ir metodai

13.1.1. Polimerazės grandininė reakcija

PCR reakcija buvo vykdoma iš esmės taip kaip aprašyta aukščiau 6 skyriuje.

13.2. Rezultatai

13.2.1. NGF ir BDNF sekų iš genominės DNR amplifikacija

Išsigimę sintetiniai oligonukleotidiniai praimeriai buvo sintezuoti pagal segmentus boksas 1 ir boksas 2 iš užkonservuotų tarp NGF ir BDNF aminorūgščių sekų (žr. aukščiau 5.8. sk.) ir buvo naudojami PCR reakcijoje su žiurkės genomine DNR kaip matrica. Tikslios praimerių sekos buvo tokios (išsigimimo pozicijos su mišiniu iš dviejų ar daugiau bazių, įjungtų oligonukleotidų sintezės stadijoje, parodyti skliausteliuose; pabrauktos uodegos su restrikcinių endonukleazų skėlimo daugybiniais saitais, kurie lengvina įjungimą į vektorių sekančiame klonavimo etape; A = adeninas, G = guanidinas, C = citozinas, T = timinas ir N = mišinys iš A, C, G, T):

boksas 1 (prasminis), praimeris 1B:

5'-GACTCGAGTCGACTCGGTGTG(C,T)GACAG(C,T)(AG)
T(C,T,A)AG-3'

boksas 2 (antiprasminis), praimeris 2C:

5'-CCAAGCTTCTAGAATTCA(C,T)TT(N)GT(C,T)
TC(A,G)(A,T)A(A,G)AA(A,G)TA

300 ng mišinio su kiekvienu išsigimusi praimeriu pridedama prie 300 ng žiurkės genominės DNR 10 µl standartiniame PCR reakciniame mišinyje. Buvo atlikti 35 ciklai, kurių kiekvienas susidėjo iš 1 min. inkubavimo prie 94°C, 2 min.- prie 43°C ir 2 min.- prie 72°C. BDNF ir NGF genų amplifikacijos, vykdomos PCR pagalba naudojant šiuos praimerus, laukiamas produkto dydis buvo 175 bazių poros, tame tarpe dvi 17-matės uodegos (pabrauktos), įjungtos patogumo

dėlei tolimesnėms klonavimo stadijoms. Reakcinio mišinio elektroforezė ant 8% poliakrilamido (5% glicerino) davė pagrindinę juostą amplifikuotos DNR su lauktu dydžiu, 175 poros bazių.

13.2.2. Sekų, komplementarių BDNF/NGF zondui iš įvairių gyvūnų rūšių genominių DNR, aptikimas

175 bp juostą pašalino iš gelio elektroeliucijos būdu ir amplifikavo toliau, antroje PCR reakcijoje, septynių ciklų reakcijos sąlygose, identiškos su pirmos PCR sąlygomis, išskyrus tai, kad koncentracijos dGTP, dATP ir TTP buvo sumažintos iki 50 μ M, ir vietoje numatyto dCTP naudojo žymę alfa 32 P-dCTP. DNR produktą su radioaktyvia žyme išskirdavo iš reakcinio mišinio chromatografiniu būdu tolygioje kolonoje. Šią zondą, pažymėtą RIB/2C (žiurkės DNR, amplifikuotai iš praimerių IB ir 2C), po to panaudojo įvairių gyvūnų genominių DNR komplementarių sekų aptikimui (rezultatai, gauti su žiurke, pele ir viščiuku parodyti Fig.13), po perskaldymo su Eco RI restriktine endonukleaze ir blotingo su nitroceliulioze, pagal Southern hibridizacijos būdą, su genomine DNR, suvirškintos su EcoRI, kaip parodyta Fig. 13.

EcoRI fragmentų iš genominės DNR, turinčios NGF ir BDNF sekas, dydžiai buvo nustatyti kontrolėse paraleliuose blotuose, panaudojant žmogaus NGF ir BDNF zondus su radioaktyviomis žymėmis, gautus PCR reakcijos pagalba iš klonuotų genų. NGF ir BDNF genominių EcoRI fragmentų padėtys parodytos Fig.13, kaip N ir B, atitinkamai. Rezultatai panašios analizės parodyti Fig.3 ir ekvivalentūs rezultatai buvo gauti su žmogaus zonu, kaip su kiaulės BDNF zonu Fig.3 Kaip parodyta aukščiau, NGF ir BDNF zondai kryžminosi su vieninteliu įvairių stuburinių genominės DNR EcoRI fragmentu. Pavyzdžiui, žiurkės DNR BDNF bandymas metu aptikta juostą apytiksliai 8.8 kb, tuo tarpu NGF bandymo metu aptikta juosta apie 10,4 kb.

Kaip parodyta Fig.13 visoms tirtoms rūšims (pateikti viščiuko, pelės ir žiurkės duomenys), zondas RIB/2C kryžminosi su DNR juosta neatskiriama nuo juostos, identifikuotos NGF zonu, taip pat kaip su DNR juosta, neatskiriama nuo DNR, identifikuotos BDNF zonu (pelės NGF ir BDNF genominiai EcoRI fragmentai turi tą patį elektroforetinį judrumą apytiksliai 11,3-12,0 kb). Tai rodo,

jog išsigimę oligonukleotidiniai praimeriai IB ir 2C gali būti panaudoti amplifikacijai sekų tiek iš NGF, tiek ir iš BDNF genų. Reikia pažymėti, kad kai kuriais atvejais buvo pastebėtos papildomos juostos genominiame Southern-blotinge, hibridizuotame zonu IB/2C. Pavyzdžiui, pelės genomine DNR, suskaldytoje su EcoRI, aptiktos bent jau dvi papildomos juostos (žymėtos XI ir X2, turinčios dydį apytiksliai 10,0 kb ir 1,5 kb, atitinkamai), kurios neatitiko nei NGF nei BDNF. Panašiai bent jau dvi papildomos juostos buvo aptiktos hibridizuojant su žiurkės DNR (XI, X2 apytiksliai 7,3 ir 1,2 kb atitinkamai), ir bent jau viena buvo viščiuko DNR (X, apytiksliai 2,6 kb). Kai kuriais atvejais taip pat buvo aptinkamos papildomos juostos, nepažymėtos šiame paveikslėlyje. Tokių juostų, nepriklausančių nei prie NGF nei prie BDNF, aptikimas nurodo galimą egzistavimą papildomo genetinės šeimos nario (narių). Analogiškai, naudojant kitus komplektus praimerių porų ir genominių DNR matricų (duomenys neparodyti) aptikdavo juostas, aiškiai besiskiriančias nuo žinomų juostų, priklausančių BDNF ir NGF genų sekoms.

13.2.3. Naujo geno, giminingo BDNF ir NGF identifikavimas

Konkretus hipotezės patikrinimas, apie tai kad naujas genas, susietas su NGF ir BDNF, gali būti identifikuojamas PCR reakcijos pagalba, panaudojant išsigimusius oligonukleotidinius praimerus, buvo atliekamas panaudojant boksas 3 ir boksas 4 praimerus (žr. aukščiau 5.8. skyrių) ir pelės genominę DNR, kaip matricą. Sintezuoti išsigimę praimeriai turėjo šias sekas:

3 boksas (prasminis):

5'-GGGGATCCGCGGITG(T,C)(C,A)GIGGIAT(T,C,A)GA-3

4 boksas (antiprasminis)

5'-TCGAATTCTAGAIIC(T,G)IAT(AG)AAIC(T,G)ICCA-3' kur G-guanidinas, A-adeninas, C-citozinas, T-timinas ir I-inozinas; mišiniai iš daugiau nei vienos bazės vienoje pozicijoje parodyti skliausteliuose. Reikia pažymėti kad inozinas naudojamas kai kuriose pozicijose, atitinkančiose trečią (nepastovią) bazę kodone, kad įgalintų genetinio kodo išsigimimą. Taip pat galima naudoti mišinį iš keturių įprastinių DNR bazių vietoje inozino, ir su tokiais praimeriais buvo gauti iš esmės sutampantys rezultatai.

Naudojant išsigimusių boksas 3/boksas 4 praimerių porą, PCR su genominėmis NGF ir BDNF sekomis iš pelės DNR, kaip tikėtasi, turėjo amplifikuoti segmentus apytiksliai 30 bp dydžio. Naudodami praimerius parodytus aukščiau, PCR reakciją vykdė 4 ciklais su renatūracijos temperatūra 45 °C, o po to dar 31 ciklą su renatūracijos temperatūra 49°C. Produktai buvo analizuojami gelio elektroforeze, ir buvo stebima pagrindinė juosta, laukiamo dydžio. Pelės NGF genas turi restrikcinės endonukleazės Hind II skėlimo saitą srityje tarp boksas 3 ir boksas 4, tuo metu kai BDNF šioje srityje turi skėlimo saitą ApaI fermentui. Todėl buvo laukta, kad skaldant PCR amplifikacijos produktą su HindII ir ApaI, galima pašalinti NGF ir BDNF sekas iš pagrindinės produkto juostos. Tačiau, kada PCR produktas buvo pilnai suskaldytas šiomis restriktazėmis liko amplifikuotoje DNR. Tai leidžia manyti be NGF ir BDNF genų buvo amplifikuotas bent jau vienas naujas genas.

13.2.4. Naujo geninės šeimos nario apibūdinimas

Atsparus skaldymui PCR reakcijos produktas buvo išplautas iš gelio ir panaudotas kaip matrica asimetrinėse PCR reakcijose, kuriose vienas iš pradinių išsigimusių praimerių buvo 10-100 kartų didesnės molinės koncentracijos, lyginant su kitais praimeriais. Šis asimetrinis amplifikavimas leido pagaminti viensiūles DNR matricas, tinkančias nukleotidinių sekų nustatymui grandininio terminavimo būdu. Naujo geno (žymimo čia No 3/4, bet taip pat minimo kaip neurotrofinas-3) sekos analizė buvo toliau išplėsta PCR pagalba, amplifikuojant tarp tikslaus praimerio, esančio tarp boksas 3 ir 4, ir poli-A sekos 3' geno transkripto gale, naudojant strategiją "greita kDNR galų amplifikacija" (RACE), aprašytą M.A. Frahman, M. K. Dush ir G.R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 85: 8998-9002 (1988). DNR nukleotidų sekos nustatymas parodė, kad buvo amplifikuotas naujas genas, turintis atvirą nuskaitymo rėmelį, galintį koduoti polipeptidą, skirtingą nuo NGF ir BDNF, bet labai giminingą savo aminorūgščių seka su abiem (14 pav.).

Pradinis patvirtinimas, kad šis naujas genas koduoja neurotrofinų faktorių, buvo gautas nustatant jo ekspresyvumo paterną žiurkės audiniuose, northern-

blot-hibridizacijos būdu. Ši analizė parodė, kad šis naujas genas ekspresuojasi daug stipriau smegenų audinyje, nei kuriame kitame tirtame audinyje.

13.3. Aptarimas

Kaip parodyta aukščiau (žr. Fig.13), DNR zondas, gautas PCR amplifikacija, naudojant praimerius boksui 1 ir 2, su žiurkės genomine DNR kaip matrica (RIB/2C), susikryžmino su naujomis juostomis papildomai prie juostų, kurios, kaip žinoma, turi NGF ir BDNF genų sekas, iš kiekvienos tirtos gyvūnų rūšies DNR, suskaldytų su Eco RI. Panaši analizė buvo atlikta panaudojant radioaktyviai žymėtą naujo geno zoną, amplifikuotą panaudojant praimerius boksas 3 ir 4 su pelių genomine DNR (M5/4). Kiekvienu atveju, M5/4 zondas hibridizavosi su vienintele pagrindine juosta iš genominės DNR, suskaldytos EcoRI pagalba, ir skirtinga nuo juostos, turinčios NGF ir BDNF sekas. Reikia pažymėti, kad EcoRI fragmentai, gauti iš pelės, žiurkės ir viščiuko genominės DNR, kurių hibridizacija su zonu M3/4 buvo stebima, visais atvejais sutapo su viena iš naujų juostų, gautų kryžminant su RIB/2C. Tai buvo fragmentai: 19,0 kb EcoRI fragmentas iš žiurkių DNR (X1 iš Fig.14), 7,3 kb fragmentas iš žiurkių DNR (X1 iš Fig.14), 2,6 kb juosta iš viščiuko DNR (X iš Fig.14). Tai leidžia manyti, kad buvo amplifikuotos vieno ir to pačio geno dalys iš žiurkės DNR, panaudojant praimerių porą IB/2C, ir iš pelės DNR su praimeriais 3 ir 4. Taigi bent vienas naujas genas turi homologijos su NGF ir BDNF visuose keturiuose homologijų boksuose, aprašytuose aukščiau.

Homologinių boksų tarp NGF, BDNF ir papildomo genetinės šeimos nario (pavyzdžiui, M3/4, žinomo taip pat kaip NT-3) idėja čia buvo išreikšta pirminių aminorūgščių sekų pagalba ir naujų šeimos genetinės identifikacijos būdais. Tačiau, svarbu turėti omenyje, kad, greičiausiai, papildomai galima įtraukti šių neuroninių faktorių antrinę ir tretinę struktūrą, jų sąveiką su specifiniais faktoriais, tam, kad racionaliai konstruoti naujas molekules, turinčias potencialią terapinę vertę.

Pavyzdžiui, NGF turi 6 cisteininės liekanas, ir visos jos, kaip parodyta, įtrauktos į disulfidinių tiltelių sudarymą. Sunumeravus juos nuo N galo iki C galo, kaip cis1-cis6, gauname disulfidinius tiltelius cis 1-cis-4, cis 5 ir cis 3- cis 6. Visu

šešių cisteino liekanų pozicijos užsikonservavo tarp NGF ir BDNF, ir trys cisteino liekanos segmente M3/4 išsidėsčiusios tiksliai kaip NGF ir BDNF cis 4, cis 5 ir cis 6. Iš to galima daryti prielaidą apie glaudų ryšį tarp visų geitinės šeimos narių antrinės struktūros, kuri pagrinde yra apsprendžiama užkonservuotomis cisteino liekanomis. Reikia pažymėti, kad minėtieji NGF ir BDNF homologijos boksai apima 5 iš 6 cisteino liekanų (cis 1 bokse 1, cis 2 bokse 2 cis 3 bokse 3 ir cis 5 ir cis 6 bokse 4). Tai palaiko mintį, kad cis liekanos ir jų artimiausi kaimynai vaidina svarbų vaidmenį neurotrofinio faktoriaus bendros struktūros suformavime. Šie struktūriniai determinantai, apsprendžiantys aukštą afiniškumą specifinėje sąveikoje su receptoriais, kaip manoma, kiekviename neurotrofiniame faktoriuje, yra išsidėstę unikaliose molekulės vietose.

Atitinkamai, nauji chimeriniai genai gali būti gaunami rekombinuojant tarp šeimos narių (pvz., *in vitro* rekombinacijos arba tiesioginės genų sintezės pagalba) bet kuriame iš jau aprašytų keturių homologijos boksų arba dar kur nors molekulėje. Atrodo, kad tokie chimeriniai baltymai turi panašią antrinę struktūrą dėl užsikonservavusių cis liekanų ir kitų aminorūgščių liekanų, bet gali turėti naujas biologines savybes. Pavyzdžiui, BDNF/NGF chimeriniai baltymai gali būti bifunkcionalūs sąveikos su BDNF ir NGF receptoriais požiūriu. Chimeriniai baltymai taip pat gali skirtis nuo motininės molekulės (ar molekulių) savo dvimate struktūra ir kitomis fiziko-cheminėmis savybėmis. Chimeriniai baltymai taip pat gali funkcionuoti kaip bet kurio savo motininės molekulės antagonistai.

Aktyvūs BDNF/NGF fragmentai gali būti panaudoti kitų šeimos narių kūrimui, remiantis žiniomis apie kritines "šerdines" sritis atitinkamam susilankstymui, plius informacija apie tai, kokios sritys būtinos specifinei sąveikai su receptoriais. Palyginimas naujų šeimos narių su jau žinomais, gali būti panaudotas naujų homologijos boksų aptikimui, kurie gali padėti vykdant paieškas papildomų BDNF/NHF genetinės šeimos narių. Pavyzdžiui, sulyginimas "M3/4" su BDNF leido aptikti kai kuriuos naudingus homologijos boksus. Vienas iš jų, ypač įdomus, turi ketvirtą užsikonservavusią cis liekaną, vienintelę, kurios nebuvo aukščiau aprašytose 1-4 boksuose. Segmentas, turintis tą cis liekaną, tai

iš tikrųjų pakankamai ilgas tapatumo segmentas arba segmentas su užkonservuota aminorūgščių seka, kurią turi BDNF ir "M3/4", būtent: His Trp Asn Ser Gln Cys /Arg arba Lys/ - Thr/Thr arba Ser/ -Gln/ Ser arba Thr-Tyr-Val-Arg-Ala-Leu-Thr. Šio segmento viduje galima parinkti bent jau du homologijos boksus, naudingų išsigimusių oligonukleotidų sintezei (pvz., His-Trp-Asp-Ser-Gln-Cys reikalauja 36-kartės degeneracijos 18-mačiui praimeriui arba 48-kartės 17-mačiui, naudingų boksų būtų taip pat ir Tyr-Val-Arg-Ala-Leu-Thr).

14. Pavyzdys: Padidinta BDNF ekspresija neuroblastomų ląstelėse

14.1. Medžiagos ir metodai

14.1.1. Ląstelių linijos

CHP100, CHP126, CHP134, CHP234, LANI, LAN5, NB9, SV5V, V79, FO1, BU2, HO1, HL60 ir COL 320 tai ląstelių linijos, palaikomos laboratorijoje dr. Fred Alt, kuris davė DNR northern-blotingo tyrimams (Fig. 15). Visos ląstelių linijos yra iš žmogaus navikų. CHP100 ląstelių linija iš neuroepiteliomos, CHP126, CHP134, CHP234, LANI, LAN5, NB9 ir SV5V - neuroblastomos ląstelių linijos, V79 - retinoblastomos ląstelių linija, FO1, BU2, HO1 - melanomos ląstelių linijos, HL60 - promielocitinės leukemijos ląstelių linija, COL 320 - storosios žarnos neuroendokrininės karcinomos ląstelių linija.

14.1.2. RNR paruošimas

RNR paruošimas ir northern-blotingo vykdymas, iš esmės buvo toks pats kaip ir 8.1.1. skyriuje, žr. aukščiau, panaudojant žmogaus kDNR pilno ilgio zondą. Kiekviename gelio takelyje northern-blotingo vykdymui buvo panaudota 10 µg bendrosios RNR (Fig. 15), išskyrus tai, kad RNR LANI takelyje buvo mažiau apkrautas, o SV5V atveju panaudotas 1 µg poli (A)⁺ RNR.

14.2. Rezultatai

Fig.15 pateikti BDNF zondo, sukryžmintu su RNR pavyzdžių panele, gauta iš daugelio žmogaus ląstelių linijų, northern-blot analizės rezultatai. Didelis kiekis RNR, susikryžminusios su BDNF zonu, buvo aptiktas CHP234 ir LAN5 ląstelių linijose, ir mažesni kiekiai buvo aptikti CHP126 ir CHP134. Visos teigiamos linijos buvo kilusios iš žmogaus neuroblastominių navikų.

15. Pavyzdys: žiurkės amonio rago BDNF ir NGF RNR reguliavimas, kuris yra priklausymas nuo aktyvumo, vykdomas dalyvaujant ne NMDA glutamatiniams receptoriams

15.1. Medžiagos ir metodai

15.1.1. Žiurkių apdorojimas kainine rūgštimi

Praėjus 90 min., judesių aktyvumo nuslopinimui, žiurkėms paprastai buvo duodamas diacepamas (valium), po to kai kaininė rūgštis (12 mg/kg gyvos masės) buvo įvesta į pilvo ertmę. Kaip parodyta Fig.19 valium, duotas po kaininės rūgšties, neturėjo įtakos tolimesniam BDNF ir NGF mRNR lygio padidėjimui. Žiurkės amonio rago, praėjus 3 val. po kaininės rūgšties įvedimo, ir negavusios Valium, turėjo panašius BDNF ir NGF mRNR lygio padidėjimus, lyginant su gyvūnais, gavusiais kaininę rūgštį, o po to valium.

15.1.2. Amonio rago ląstelių kultūrų paruošimas

Amonio rago smegenys iš žiurkių E17 embrionų buvo išimami disekcijos būdu ir inkubuojami 20 min. prie 37°C fiziologinio tirpalo PBS fosfatiniame buferyje, be kalcio ir magnio jonų, turinčiame 10 mM gliukozės, 1 mg/ml albumino, 6µg/ml DNR'azės ir 1 mg/ml papaino. Po praplovimo tirpalu be papaino, amonio rago ląsteles atsargiai disocijavu nusausta Pastero pipete. Ląsteles surinkdavo centrifuguodami mažu greičiu, pakartotinai suspenduodavo DMEM tirpale, pridėdavo 10% veršiuko fetalinio serumo ir pasėdavo plastikinėse auginimo lėkštelėse tankiu $0,5 \times 10^6$ ląstelių 35 ml, prieš tai padengtose poli-DL-ornitinu (0,5 mg/ml) ir lamininu (5 g/ml). Praėjus 3 val. po sėjos, terpę pakeisdavo į neturinčią sieros terpę, kuri turėjo priedus, kaip aprašyta Brewer ir Cotman (Brain Res. 497:65, 1989), bet be glutamato. Neuronai išlikdavo gyvybingi kultūroje iki 3 savaičių ir paprastai buvo naudojami eksperimentuose praėjus 7 dienoms po sėjos.

15.1.3. RNR amplifikavimas

Bendrąją ląstelės RNR ekstrahuodavo kaip aprašyta pas Chomcynsky ir Sacci (Anal. Biochem 1987, 162: 156-159) iš $0,5 \times 10^6$ ląstelių, po to kai buvo pridedama sutrumpintos RNR atstatomojo standarto (fig.30). NGF mRNR ir

kRNR buvo amplifikuojamos kartu atvirkštinės transkripcijos reakcijos / polimerazės grandininės reakcijos (RT/PCR) bendrame inde, turinčiame 1/5 ekstrahuotos RNR, 1xRT/PCR buferį (10mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml želatinos 0,1 % tritono X- 100), 0,25 mM dNTP, 0,1 µg kiekvieno iš 5' ir 3' praimerių, 5 vnt. RNRazės (Promed), 3,2 vnt. AMU-atvirkštinė transkriptazės (Life Science) ir 2 vnt. Taq polimerazės (Genefit) bendrame 25 ml tūryje. Šį mišinį padengė mineraliniu tepalu ir inkubavo 30 min prie 41 °C, pakaitino iki 92°C 60 sekundžių, renatūravo praimerus prie 35°C 60 sek. ir plėtė praimerus prie 72 °C 60 sek. Amplifikacijos produktai (203 bp iš NGF mRNR ir 153 bp iš atstatomojo standarto) atskirdavo ant 3% Nusieve/Agarose 3:1 gelio (FMC Bioproducts), atliko šarminį blotinę su membrana Hybond N plus (Amersham) ir kryžmino kaip aprašyta (Haumann ir Thoenen 1986, J. Biol. Chem. 261:9246; Lindhold ir kt., 1988, J. Biol. Chem. 263:16348). Absoliučiam kiekybiniam paskaičiavimui, žinomas kiekis transkribuotos *in vitro* mRNR ir atstatomasis standartas kartu buvo amplifikuojami paraleliose reakcijose, pagal neseniai aprašytą Wang ir kt. metodą (PNAS 86:9717-9721, 1989).

15.2. Rezultatai ir aptarimas

BDNF ir NGF yra genominės šeimos nariai, turintys apytiksliai 50% identiškos aminorūgščių sekos (Leibrock ir kt., 1989, Nature 341:149). Šios molekulės turi griežtai konservuotus domenų. Šių domenų viduje esančios 6 cisteino liekanos greičiausiai įtrauktos į šių molekulių trimatės struktūros stabilizaciją, kuri būtina jų biologiniam aktyvumui. Tačiau NGF ir BDNF taip pat turi skirtingų domenų, kurie nulemia jų skirtingą neuroninį specifiškumą (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol. 112:319; Jonson 1986, J. Neurosci 6:3031; Hafer ir Barde 1988, Nature 331:261; Rodriguez - Tebar ir kt., 1989, Dev. Biol. 136:296). Be to, skirtumas tarp šių neurotrofinių molekulių patvirtinamas jų sintezavimo vietomis, NGF ekspresuojasi tiek periferijoje (Korsching, S ir Thoenen, H. 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 80:3513; Ebendal ir kt., 1983, Exp. Cell. Res. 148:311; Heimann ir kt., 1984, EMBO, 3:3183; Dhelton ir Richardt, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81:7951), tiek ir centrinėje nervų

sistemoje (Korsching ir kt., 1985, EMBO, 4:1389; Shelton ir Reichardt, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 83:2714; Whittemore, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 83:817; Large ir kt. 1986, Science, 234:352). Inervacijos tankis neuronais, reaguojančiais į NGF, atspindi NGF kiekį, esantį atitinkamuose audiniuose-taikiniuose (Korsching ir Thoenen 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 80:3513; Ebendal, 1983, Exp. Cell. Res. 148:311; Heimann ir kt., 1984, EMBO, 3:3183; Dhelton ir Richardt, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 81:7951; Korsching ir kt., 1985, EMBO 4:1389, Schelton ir Reichardt, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 83:2714, Whittemore ir kt., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 83:817; Larg ir kt., 1986, Science, 234:352). Skirtingai nuo NGF, BDNF pagrinde ekspresuojasi tik CNS neuronuose ir juose esantys BDNF mRNR kiekiai daug didesni už NGF mRNR kiekius, pavyzdžiui, apytiksliai 50 kartų amonio rage. Periferinėje nervų sistemoje NGF sintetuojamas įvairių tipų nenervinėmis ląstelėmis (Bandtlow ir kt., 1987, EMBO, 6:891), tuo tarpu galvos smegenyse NGF pagrinde lokalizuojasi neuronuose, kaip pademonstruota *in situ* kryžminimo pagalba (Rennert ir Heinrich 1986, Biochem. Biophys. Res. Commun 138: 813; Ayer-Lezievre ir kt., 1988, Science 240:1339; Whittmore ir kt. 1988, J. Neurosci. Res. 20:403). Tačiau, išauginti astrocitai 1 tipo, kaip parodyta, taip pat gamina žymius NGF kiekius (Lindsay 1979, Nature 282:80; Furukava ir kt., 1987, Biochem. Biophys. Res. Com. 142:395). Neuronų ir astrocitų santykinis įnašas į sintetuojamą galvos smegenyse NGF pakol kas neišaiškintas. Įvertinant tai, kad pagrindinė BDNF ir NGF mRNR ekspresija vyksta centrinėje nervų sistemoje, buvo tiriami šie klausimai: ar gali neuroninis aktyvumas daryti įtaką šių dviejų RNR kiekiui, ir jei taip, tai koks transiteris (-iai) gali dalyvauti reguliacijoje. Pirmoje eksperimentų serijoje neuroninės kultūros buvo paruoštos iš žiurkės E17 embrionų amonio rago. Kaip parodyta Fig. 16a. amonio rago neuronų depolarizacija, sukelta didele (50 mM) kalio koncentracija, padidindavo BDNF mRNR kiekį. Maksimalūs lygiai buvo pasiekti tarp 3 ir 6 valandų po kalio koncentracijos pakėlimo. Kalio sukeltą BDNF mRNR padidėjimą galima buvo nuslopinti, pašalinant iš terpės kalio jonus, ir sumažinti inhibuojant kalcio patekimą nifodipinu, blokuojančiu transportavimo kelius (Fig.16b).

Kadangi, naudojamos žmonių Amonio rago kultūros buvo sudarytos iš mišrios neuronų populiacijos, turinčios skirtingus transiterinės ir receptorinės ekspresijos paternus, čia buvo tiriamas skirtingų fiziologinių ir sintetinių receptorinių agonistų veikimas į BDNF ir NGF ekspresiją. Rezultatai, pateikti VI lentelėje, rodo, kad iš visų tirtų medžiagų - kaininė rūgštis, glutamatinio receptoriaus agonistas (Managhan ir kt. 1989, *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 29:365), iki šiol davė didžiausią BDNF mRNR padidėjimą amonio rago neuronuose. Priešingai, kitos medžiagos, tokios kaip karbaksolo (muskarino receptorinis agonistas) ir, šiek tiek mažiau, histaminas ir bradikininas tik šiek tiek, nors ir pastebimai, didindavo BDNF mRNR (VI lentelė). Kadangi NGF mRNR lygis amonio rago neuronuose labai žemas, čia buvo sukurtas kiekybinis polimerazės grandininės reakcijos būdas, tinkantis NGF mRNR pakitimų nustatymui. Panaudojant šį metodą, nustatyta, kad amonio rago neuronuose BDNF mRNR lygiai, kaip ir NGF mRNR lygiai, buvo pakeliami kalio ir kaininės rūgšties pagalba (Fig.17).

Kaip parodyta Fig.18, maksimalus BDNF mRNR padidėjimas amonio rago neuronuose buvo gautas su kainine rūgštimi prie koncentracijos 25 μ M. Tolimesnis jos koncentracijos kėlimas mažindavo BDNF mRNR lygį, kas, greičiausiai, atspindi toksinį didelių kaininės rūgšties koncentracijų poveikį amonio rago neuronams (Fig.18). Anksčiau buvo skelbta apie neurotoksiškumą, perduodamą glutamatinio receptorių (Chai ir kt., 1978, *J. Neurosci.* 7:357; Rothman, ir Olney, 1987, *Trends Neurosci.* 10:299, Chai 1988, *Neurosci.* 1:623) įvairiems CNS neuronams, po to kai panaudojami analogai, žadinančio aminorūgštinio glutamato. Tačiau, kaininės rūgšties koncentracijos, būtinos amonio rago neuronų BDNF ir NGF mRNR ekspresijos sustiprinimui, gali būti tiksliai atskirtos nuo koncentracijų sukeliančių neurotoksiškumą.

Tam, kad kaininės rūgšties veikimą ištirti detaliau, čia buvo tiriama, ar galima užblokuoti BDNF mRNR lygio padidėjimą kuriuo nors iš žinomų glutamat-receptorių antagonistų (Managhan ir kt., 1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 29:565). Kinureno rūgštis, glutamat-receptorinis plataus spektro antagonistas, taip pat kaip ir CNQX, konkurentinis ne NDA receptorių

inhibitorius (Managhan ir kt., 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.29:365), pilnai blokavo kaininės rūgšties sukiamą BDNF mRNR padidėjimą amonio rago neuronuose (VII lentelė). Iš kitos pusės, MK-801, kuris specifiškai blokuoja NMDA receptorių, negalėjo užblokuoti BDNF mRNR padidėjimo šiuose neuronuose. Be to, pats NMDA nekeitė BDNF mRNR lygio (VI lentelė). Tai reiškia, kad kaininė rūgštis veikia tiesiogiai per savo receptorių ir kad šis poveikis daromas ne dėl išskyrimo endogeninio glutamato (kuris taip pat veikia į NMDA receptorių). Tuo būdu, galima teigti, kad kaininė rūgštis *in vitro* pakelia BDNF mRNR lygį, panaudodama ne NMDA receptorių.

VI lentelė

Įvairių receptorinių agonistų poveikis į BDNF mRNR ekspresiją neuroninėse kultūrose

Priedai	% nuo kontrolės
nieko	100±5
karbaksolas (50μM)	220±25
karbaksolas (50μM)+ atropinas (10μM)	85±15
nikotinas (100μM)	110±7
histaminas (50μM)	150±12
serotoninas (100μM)	95±6
dopaminas (100μM)	115±7
norepinefrinas (25 μM)	75±10
substancija "M" (1 μM)	85±9
somatostatinas (1 μM)	110±8
bradikininas (1 μM)	155±15
kaininė rūgštis (25 μM)	1365±70
NMDA (25 μM)	105±70

VII lentelė

Įvairių glutamatinųjų receptorių antagonistų poveikis į kaininės rūgšties sukeltą BDNF mRNR ekspresiją

Priedai	% nuo kontrolės
nieko	100±60
kaininė rūgštis (25 μM)	1250±60
kinureno rūgštis (1 μM)	70±6
kinureno rūgštis (1 μM)+ kaininė rūgštis (25 μM)	84±7
CNQX (10 μM)	109±6
CNQX (10 μM) +kaininė rūgštis (25 μM)	103±7
MK-801 (5 μM)	96±5
MK-801 (5 μM) + kaininė rūgštis (25 μM)	1130±80

Įvertinimui šių *in vitro* tyrimų fiziologinę reikšmę, buvo tiriama ar veikia panašūs mechanizmai *in vivo*. Abiejų lyčių suaugusias žiurkes Wistar, 180-200 g svorio, apdorodavo 12 mg/kg kainine rūgštimi. Po įvairių laiko periodų, buvo nustatomi BDNF ir NGF mRNR lygių pakitimai amonio rage ir žievėje, panaudojant northern-blot-analizę. Fig.19 rodo, kad kaininė rūgštis sukelia BDNF ir NGF mRNR lygio padidėjimą abiejuose galvos smegenų srityse. BDNF mRNR padidėjimas buvo žymiai didesnis už NGF mRNR padidėjimą. Be to, dar po 24 valandų po kaininės rūgšties įvedimo mRNR lygiai išliko padidinti. BDNF ir NGF mRNR kitimas laike parodė, kad maksimalus padidėjimas amonio rage pasiekiamas praėjus 3 valandoms po kaininės rūgšties įvedimo (Fig.19). Įdomu pažymėti, kad prieš BDNF ir NGF mRNR lygio padidėjimą, pakildavo S-fos mRNR lygis: šie du reiškiniai gali sutapti atsitiktinai, kaip neseniai buvo parodyta sėdimąjo nervo pažeidimo atveju (Hengerer ir kt., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 87:385). Be to, egzistuoja užlaikymas tiek BDNF, tiek ir NGF mRNR

padidėjimo žievėje, lyginant su padidėjimu amonio rage, rodantis kad signalai, sukeliantys BDNF ir NGF ekspresijos sustiprėjimą, plinta nuo amonio rago į kitas smegenų sritis. Šie duomenys sutampa su anksčiau paskelbtais duomenimis (Morgan ir kt., 1987, Science 237: 192), rodydami, kad c-fos padidėjimas, sukeliamas konvulsantinio metrazolio, pradžioje įvyksta amonio rage, o po to žievėje.

Ankstesni tyrimai įrodė, kad NMDA receptoriai, tokie kaip NGFI-A (Cole ir kt., 1989, Hattge, 340: 474) įtraukti į amonio rago mRNR reguliavimą, todėl čia buvo tiriama ar gali NMDA receptorių antagonistai MK-801 ir ketaminas blokuoti BDNF ir NGF mRNR padidėjimą *in vivo*. Tačiau, patvirtindamas rezultatą, gautą *in vitro*, MK-801 neinhibuodavo kaininės rūgšties sukkelto BDNF mRNR padidėjimo amonio rage, nors jis efektyviai slopindavo traukulius, kilusius dėl NMDA receptorių aktyvacijos (Fig.20.). Greičiausiai ši receptorių NMDA aktyvacija kyla dėl endogeninio glutamato, išlaisvinamo kaininės rūgšties pagalba (Bizer ir Koil, Neuroscience, 1988, Lett 8: 303; ir kt., 1973, Brain Res. 139:381). Analogiškai, NGF mRNR padidėjimas amonio rage po jo apdorojimo kainine rūgštimi nebuvo nutraukiamas nei MK-801 nei ketamino pagalba. Ankstesniame tyrime Gall ir Isachson (1989, Science 243:758) buvo parodyta, kad elektrolitiniai pažeidimai, sukeliantys limbinius traukulius, pakelia NGF mRNR kiekį žiurkės amonio rage. Tačiau, šie rezultatai, gauti su MK-801 ir kainine rūgštimi, parodė, kad reikia aiškiai atriboti traukulių padidėjimą ir BDNF ir NGF ekspresijos padidėjimą. Žiurkių apdorojimas diacepamu (Valium) prieš kaininės rūgšties injekciją pilnai blokuodavo BDNF ir NGF mRNR padidėjimą žiurkių amonio rage (Fig.20.). Blokuojantis diacepamo efektas BDNF ir NGF mRNR padidėjimui, greičiausiai, kyla dėl neuronų aktyvumo slopinimo, inhibitorinės GABA-erginės sistemos pagalba. Tačiau, praėjus 30 min. po kaininės rūgšties įvedimo (t.y. maždaug po 30 min. nuo konvulsijų pradžios), BDNF ir NGF mRNR padidėjimas negalėjo būti daugiau blokuotas diacepamu, kas rodo, kad, santykinai, trumpo aktyvumo padidėjimo periodo gali užtekti, kad inicijuoti įvykių kaskadą, vedantį prie dviejų neurotrofinių faktorių mRNR ekspresijos padidėjimo.

Šis tyrimas parodė, kad ne NMDA receptoriai gali būti įtraukti į BDNF ir NGF mRNR reguliaciją amonio rage, tuo būdu atskiriant šį reguliavimo mechanizmą nuo anksčiau aprašyto Cole ir kt. (1989, Nature 340:474), kuris skaitė, kad amonio rago mRNR koduojantys genai, greičiausiai reguliuojami glutamatinų receptorių NMDA- subtipais. Buvo paskelbta, kad kai kurie iš kaininės rūgšties poveikių į neuronus taip pat gali būti perduodami glutamatinų receptorių quisqualate - tipo pagalba (Monaghan ir kt., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 365).

Galiausiai, šis išradimas parodė, kad neuroninis aktyvumas reguliuoja lygį mRNR, koduojančios neurotrofinius faktorius BDNF ir NGF, žiurkės amonio rage ir žievėje. Iš visų tirtų medžiagų tik kaininė rūgštis, veikdama per ne NMDA glutamatinus receptorių, sukeldavo BDNF ir NGF mRNR padidėjimą tiek *in vivo*, tiek ir amonio rago neuronų kultūrose. Priešingai, nebuvo duomenų, kad periferijoje NGF sintezę ne neuroninėse ląstelėse reguliuotų įprastinės transiterinės medžiagos ar neuropeptidai, išlaisvinami inervuojančių neuronų (reaguojančių į NGF) (Barde ir kt., 1984, J. Cell. Biol. 99: 839; Hellweg ir kt., 1988, Exp. Cell. Res. 17:18). BDNF pagrinde ekspresuojasi centrinėje nervų sistemoje ir egzistuoja bent jau dalinis persiklojimas tarp centrinių kelių, naudojančių glutamatą kaip neurotransmiterį, ir sričių, kurios, kaip parodyta, turtingos BDNF ir NGF mRNR (Hafer ir kt., EMBO) - spaudoje-/; Monaghan ir kt., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365). Konkrečiai, egzistuoja stebinantys panašumai tarp NGF mRNR pasiskirstymo, kaip parodyta kryžminimu *in situ* (Haf EMBO, spaudoje) ir kaininės rūgšties receptorių, išryškintų autoradiografijos pagalba amonio rage, galinių smegenų žievėje ir smegenėlėse (Monaghan ir kt., 1989, Annu. Rev. Pharm. Toxicol. 29:365). Šie duomenys derinasi su hipoteze, kad glutamatas yra fiziologinis transiteris, reguliuojantis BDNF ir NGF mRNR centrinėje nervų sistemoje.

16. Pavyzdys: Smegenu neurotrofinis faktorius padidina išgyvenimą ir funkcijų diferencijavimąsi žiurkės pertvaros cholinerginių neuronų kultūrose.

16.1. Medžiagos ir metodai

16.1.1. Disocijuotu ląstelių gavimas ir ląstelių auginimo salygos

Pertvaros sritis iš žiurkių (Sprague - Dawley) po 17 dienų nėštumo (E17 - 17-ta embriono diena) išlaisvinama disekcijos pagalba iš aplinkinių audinių. Audinio fragmentai buvo surenkami, 3 kartus praplaunami su Ham F-10 ir po to pernešami į 35 mm lėkštelę, skirtą audinių kultivavimui, ir susmulkinami. Suspensiją iš atskirų ląstelių darė inkubuodami audinį su 0,25 % tripsino 20 min., prie 37°C. Po tripsino inaktyvacijos 5 min. inkubavo kambario temperatūroje auginimo terpėje (žr. žemiau), turinčioje 50 µg/ml DNR-azės pirmo tipo (Sigma), ir gabalėliai buvo disocijuoti periodiškai praleidžiant fragmentus per susiaurintą Pastero pipetės galiuką. Disocijavusias ląsteles po to centrifugavo prie 300 g 45 sek., nupildavo supernatantą ir pakartotinai centrifugavo. Laisvų ląstelių nuosėdas pakartotinai suspendavo ir sujungė augimo terpėje, o ląstelių išėigą nustatydamo panaudodami hemocitometrą. Pagaliau šias ląsteles pasėdavo į 6 mm duobutes, padengtas poliornitinu (10 µg/ml) ir lamininu (10 µg/ml). Ląstelių gyvybingumą tikrindavo po 24 val. augimo kultūroje, nustatydami ląstelių sugebėjimą nepraleisti į save mėlynąjį tripaną.

Normali augimo terpė 5HS/N3 kultūroms, sudarytoms iš neuronų ir glijos, turėjo: 5% (tūris/tūris) arklio serumo (Gibco), 1% priedų No3 (tūris/tūris) (Romijin ir kt., 1982, DW. Brain Res. 2:583-589), 0,5% (tūris/tūris) gliutamino (200 mM, Gibco) ir 0,25% (tūris/tūris) penicilino-streptomicino (10000 vnt./ml ir 10000 µg/ml, atitinkamai) (Gibco), modifikuotoje Dulbekko terpėje (DMEM).

Praturtintos neuronais kultūros buvo ruošiamos pakeičiant augimo terpę po 5-6 valandos po pasėjimo ant DMEM, turinčią: 1% priedų No3, 0,5% gliutamino ir 0,25% penicilino ir streptomicino. Abiejose sąlygose naudojo apdorojimą su citozin-arabinoze (1 µM per 24 valandas) kad apribotų glijos ląstelių proliferaciją.

16.1.2. Cholin-acetiltransferazės (CAT) aktyvumo tyrimas

Augimo terpę pašalindavo iš kultūros praplaudami ląsteles du kartus su 100 μ l PBS. Ląstelės lizuodavo per vieną ciklą užšaldymo-atleidimo ir 15 minučių inkubuodami 50 mM KH_2PO_4 prie pH 6,7, turinčio 200 mM NaCl ir 0,15% (tūris/tūris) Tritono - 100. Paimdavo du mikrolitrus ląstelių lizato ir tikrindavo CAT aktyvumą pagal procedūrą mikro-fonum (micro-Fonnum) (Fonnum 1975, J. Neurochem, 24: 407-409). Galutinis medžiagų mišinys buvo: 0,2 mM [^{14}C] Acetil-CoA/NEN 54,4 μCi /molis/, 300 mM NaCl, 8 mM cholinbromido, 20 mM etilen-diamin-tetraacto rūgšties ir 0,1 mM neostigmino 50-yje mM NaH_2PO_4 (prie pH 7,4) buferio. Prie šių fermento ir substrato koncentracijų, fermentinė reakcija išliko tiesine 90-120 minučių. Cholin-acetiltransferazės indukavimo specifiškumas buvo tikrinamas pridėdant specifinį CAT aktyvumo inhibitorių, N-hidroksietil-4-(1-naftilvinil)piridiniumą (HNP), eksperimento metu (White, H.L. ir Cavallito, C. Y., 1970, J. Neurochem 17:1579-1589).

16.1.3. Acetilcholinesterazės (AChE) aktyvumo tyrimai

Lizatuose esančios AChE lygis buvo matuojamas Potter (Potter. 1967, J. Pharmacology ir Experimental Therapeutics 156:500-506) bei Johnson ir Russel (Johnson ir Russel 1975, Anal. Biochem. 64: 229-238) būdais su nedidelėmis modifikacijomis.

Lizatus ruošdavo 50 mM KH_2PO_4 buferyje su pH 6,7, turinčiame 200 mM NaCl ir 0,25 (tūris/tūris) Tritono X-100, sujungdavo juos [^3H]acetilcholino jodidu (NEN, NEN-113, 73,3 m Ci /mmolis/, etopropavinu (0,1 mM) %) 50-yje mM prie pH 7,0. Po 15 min. inkubavimo prie 37 $^{\circ}\text{C}$, reakciją nutraukdavo pridėdami 100 μ l stop-buferio, turinčio: 1 M chloracto rūgšties, 0,5 M NaOH ir 2,0 M NaCl. Specifinį AChE aktyvumą nustatydavo pridėdami 1,0 (10^{-6}) M neostigmino.

16.1.4. Cholino aukšto afiniškumo įsisavinimo matavimas

Cholino įsisavinimas per aukštą afiniškumą, Na^+ - priklausomas mechanizmas buvo tyrinėjamas Vaca ir Pilar metodu (Vaca ir Pilar 1979, J. Gen. Physiol. 73:605-628). Ląstelės buvo praplaunamos 1 kartą 100 μ l F10 (Ham), po to, praplaunant 100 μ l Tyrodes tirpalu. Praėjus 10 min. po depoliarizacijos, sukeltos Tyrodes tirpalo, turinčio 25 mM kalio, ląsteles inkubavo 20 min.

kambario temperatūroje su [^3H] cholinu (NEN, NEN109, 0,11 μM , 86,7 Ci (mmolis) normaliaame Na^+ , arba turinčiame Li^+ jonų, Tyrodes tirpale. Įsisavinimo reakcija buvo nutraukiama ląstelių dvigubu praplovimu su PBS. Akumuluotą choliną ekstrahuodavo inkubuodami kultūras mažiausiai 20 min. 100 μl šalto acetono, turinčio 1 M skruzdžių rūgšties. Po to tirpią frakciją pašalindavo ir suskaičiuodavo. Specifinis cholino įsisavinimas yra skirtumas tarp bendro ir Na^+ priklausomo cholino įsisavinimo.

16.1.5. Histocheminis dažymas su acetilcholinesteraze

Cholinerginės ląstelės buvo identifikuojamos, jas histochemiškai dažant su acetilcholinesteraze, naudojant modifikuotą Geneser-Jensen ir Blackstadt būdą (1971, Z. Zellfordt 114:460-481). Po kultūrų fiksavimo 4% paraformaldehide, šios ląstelės buvo inkubuojamos 5-6 dienas prie 4 $^{\circ}\text{C}$, esant AChE substratiniam tirpalui, turinčiam tokį mišinį: 4 mM acetil-ličio-cholino jodo, 2 mM vario sulfato, 10 mM glicino ir 10 $\mu\text{g/ml}$ želatinos 50 mM acetatiniame buferyje su pH 5,0. Reakcijos produkto išryškinimą (vizualizaciją) atlikdavo pagal ankstesnį aprašą (Hartikka, Hefti 1988, J. Neurosci 8:2967-2985).

16.1.6. Imunohistocheminis dažymas NGF-receptorių pagrindu

Kultūras praplaudavo du kartus su DMEM ir po to fiksudavo 4% paraformaldehidu. Po to, ląsteles apdorodavo 3-4 valandas natrio fosfato buferyje su pH 7,4, turinčiame 5% jaučio serumo albumino, 0,02% Tritono X-100 ir 5% sacharozės (Hartikka 1988, J. Neurosci 8: 2567-2585). NGF-R aptikdavo panaudodami monokloninį antikūną 192-IgG (Taniuchi ir Johnson 1985, J. Cell. Biol. 101: 1100-1106; Chandler ir kt., 1984, J. Biol. Chem 259:6882-6889) ir praskiesdami 1:1000 buferyje, turinčiame 5% arklio serumo. Kultūras inkubuodavo su praskiestu antikūnu 15-18 valandų prie 4 $^{\circ}\text{C}$. Surištą pelių imunoglobuliną aptikdavo su biotinuotu arklio antipeliniu IgG (1:200 Vector). Imunoreaktyvias ląsteles identifikuodavo panaudodami 3', 3'-diaminobenzidină, kaip substratą surištai peroksidazei.

16.1.7. BDNF ir NGF išvalymas

BDNF išvalymą iš kiaulės galvos smegenų ir NGF iš pelės patino pažandės liaukos atlikdavo pagal anksčiau paskelbtas procedūras (Barde ir kt., 1982, EMBO, 1:549-553; Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol. 112: 313-328). Rekombinantinis BDNF, naudotas dalyje šių tyrimų, buvo apibūdintas anksčiau (Maisonpierre ir kt., 1990, Science 247: 1446-1451).

16.2. Rezultatai

Pertvaros ląstelių kultūrose, esančiose duobutėse, padengtose poliornitinu-lamininu, per 24 val. išauga aksonai, be to daugelis ląstelių turi charakteringą fazo-ryškią somą (Fig. 21 a ir b). Dėl nenutrūkstančio aksonų augimo *in vitro*, 2-4 dieną padidėjo ląstelių kontaktų kiekis (palyginti Fig. 21 c ir d su 21 e ir f). Net po 4 dienų kultūroje buvo labai mažai ne neuroninių ląstelių, kadangi, neatrasta suplotų fazo-tamsių ląstelių. BDNF poveikio į pertvaros cholinerginių neuronų išgyvenimo kultūrose įvertinimui buvo naudojamas histocheminis dažymas AChE pagrindu ir imunohistocheminis dažymas AChE receptorių pagrindu. Tipiška AChE -teigiamų ląstelių morfologija parodyta Fig.21 g, h. Keletas NGF receptoriams teigiamų neuronų parodyta 21 i pav. BDNF davė 2,4 karto AChE teigiamų ląstelių kiekio padidėjimą mažo tankio (apibrėžiamame kaip ląstelių tankis tarp 66700-133300 ląstelių į cm^2) žiurkių embriono pertvaros ląstelių kultūrose, kaip parodyta Fig.22 a. Prie to pačio ląstelių tankio NGF poveikis buvo šiek tiek mažesnis (1,9 karto). Tai, kad aptikome jog BDNF kaip ir NGF gali duoti AChE teigiamų neuronų kiekio padidėjimą pertvaros kultūrose, paskatino mus tirti ar šie du faktoriai veikia į panašias ar skirtingas neuronų populiacijas. Kaip rodo trečia panelė Fig. 22 a., pridėjus kartu BDNF ir NGF iki prisotinto lygio, nebuvo gautas didesnis AChE teigiamų neuronų kiekio padidėjimas, nei gautas su kiekvienu iš faktorių atskirai. Neuronų išgyvenimo atžvilgiu, šie rezultatai nurodo, kad cholinerginiai neuronai žiurkės pertvaros kultūrose, reaguojančiose į BDNF ir NGF, turi būti glaudžiai persidengiančiose populiacijose.

BDNF poveikis į AChE teigiamų neuronų išgyvenimą priklausė nuo tankio, prie kurio augo ląstelės (Fig.22 a.). Esant dideliems pasėlio tankiams (nuo

200000 iki 266000 ląstelių į cm^2), nei pats BDNF, nei kartu su NGF, nedavė AChE ekspresuojančių neuronų kiekio padidėjimo. Tai gali įvykti dėl padidėjusio endogeninio neurotrofinio aktyvumo lygio arba, iš kitos pusės, dėl skatinančio išgyvenimą padidėjusio tarpląstelinio (ląstelė-ląstelė) kontakto, atsirandančio dėl didelių ląstelių tankio.

Prie žemų ląstelių tankių AChE teigiamų ląstelių kiekis didėjo priklausomai nuo BDNF koncentracijos, maksimali reakcija buvo stebimas prie dozės 10 ng/ml, prie kurios AChE teigiamų ląstelių kiekis duobutėje padidėjo nuo kontrolinių reikšmių $163,2 \pm 12,9$ iki $388 \pm 26,2$ apdorotose kultūrose (padidėjimas 2,5 karto). Palyginimui maksimali reakcija į NGF buvo pastebėta prie 30 ng/ml ir davė AChE teigiamų ląstelių kiekio padidėjimą duobutėje nuo $121,0 \pm 7,6$ iki $231,7 \pm 12,9$ (padidėjimas 1,9 karto). Horizontali sritis (plato) kreivėje, grafiškai atvaizduojanti ląstelių reakciją, atrodo stabili BDNF ir NGF atveju, ta prasme, kad nemažėja AChE teigiamų neuronų kiekis esant dozėms 100 ng/ml.

Aišku, kad kultūrose su mažu ląstelių tankiu, ir BDNF ir NGF sugeba padidinti ląstelių, aptinkamų AChE histochemija, skaičių. Galbūt šis padidėjimas kilęs dėl išsigelbėjimo cholinerginių ląstelių, kurios žūsta kultūroje dėl augimo faktoriaus trūkumo, prieš tai buvusių ląstelių papildymui, arba dėl cholinerginio markerio, AChE, indukcijos. Bandant diferencijuoti šias galimybes, vėliau buvo atlikti papildomi eksperimentai (Fig. 23) su kultūrų serijomis, palaikomomis iš viso 12 dienų. Vieną kultūrų grupę, apdorotą praėjus 5-6 val. po pasėjimo, išlaikė su BDNF ir NGF visas 12 dienų. Antrą kultūrų grupę laikė be augimo faktorių 5 dienas, o po to apdorodavo su BDNF arba NGF likusias 7 dienas (-5/+7). Palyginus šias dvi kultūrų grupes, matosi, kad reakcija į BDNF ir NGF, pridėtus po 5 dienų, iš esmės tokia pat, kokia matėsi kai ląstelės pastoviai augo šių faktorių aplinkoje (palygink ištisines ir punktyrines juostas Fig.23). Tačiau, trečioje grupėje kultūrų, kurioje BDNF ir NGF buvo tik paskutines 5 dienas (-7/+5) rezultatai buvo stebėtinai skirtingi. Šiose sąlygose nei NGF nei BDNF nesugebėjo padidinti AChE teigiamų ląstelių kiekio. Kituose eksperimentuose buvo nustatyta, kad pertvarinių neuronų eksponavimas 3-4 dienas su NGF arba

BDNF yra nepakankamas, kad žymiai padidėtų AChE enziminis aktyvumas, ir, tuo pačiu, kad ląstelės būtų aptiktos AChE dažymu. "-7/+5" kultūrose nebuvo aptikta AChE teigiamų neuronų kiekio padidėjimo todėl, kad augimo faktoriui neužteko eksponavimo laiko AChE teigiamų ląstelių indukavimui. *In vivo* buvo parodyta (Montero ir Hefti 1988, J. Neurosci 8:2986-2999; Higgins ir kt., 1989, Neurosci. 3:247-256), taip pat kaip ir *in vitro*, kad NGF sugeba reguliuoti savo paties receptorių, matuojant tiek mRNR tiek ir baltymo lygyje. Kadangi buvo aptikta, jog BDNF rodo panašius efektus kaip ir NGF pertvarinių kultūrų cholinerginio fenotipo indukavime ir ląstelių išgyvenime, buvo tikrinama potenciali galimybė su BDNF reguliuoti NGF receptorių lygius, apibrėžtus IgG-192 imunoteigiamų ląstelių kiekiu. Prie 10 ng/ml, BDNF 3 kartus padidino NGF receptorinių imunoteigiamų ląstelių skaičių, kaip parodyta Fig. 24. Įdomu, kad prie didesnių koncentracijų (25-100 ng/ml) BDNF poveikis progresyviai mažėjo. Tuo būdu, atsakas į dozę, šiuo atveju, žymiai skyrėsi nuo stebėto BDNF poveikio šioms kultūroms prie kitų parametrų, pvz., vertinant AChE teigiamas ląsteles. Teigiamos kontrolės atlikimui, šios ląstelės buvo apdorojamos su 50 ng/ml koncentracijos NGF, kas taip pat sukeldavo trigubą teigiamų ląstelių kiekio padidėjimą. Todėl, remiantis IgG dažymu, BDNF daro apytiksliai vienodą efektą, lyginant su NGF, reguliuojant NGF receptorių ekspresijos padidėjimą.

Papildomai prie poveikio į ląstelių išgyvenimą, buvo tiriamos BDNF galimybės skatinti ląstelių cholinerginio fenotipo bruožus. Tiesinis CAT aktyvumo padidėjimas buvo aptiktas pertvarinėse kultūrose, išaugintose su didėjančiais kiekiais BDNF iki 50 ng/ml, kai reakcija įsisotindavo 1,8 karto padidėjimo lygyje, lyginant su kontrolinėmis reikšmėmis, kaip parodyta Fig. 25. CAT aktyvumo indukavimas paraleliose kultūrose, apdorotose su NGF, pasiekė plato prie 25 ng/ml, padidėjimas 3,4 karto lyginant su kontrolinėmis reikšmėmis. Reakcija į BDNF arba NGF neparodė žymaus sumažėjimo į tris kartus didesnę koncentraciją, pakankamą gauti įsisotinimo efektui. CAT aktyvumo indukavimas BDNF arba NGF pagalba neturėjo įtakos į HNP - nepriklausomo transferazinio aktyvumo lygį (HNP=N-hidroksietil-4-(1-naftilvinil/piridiumas).

Atradus, kad BDNF kaip ir NGF didina CAT aktyvumą pertvarinėse kultūrose, buvo tiriamas ląstelių atsakas į bendrą poveikį abiem faktoriams (VIII lentelė). Šiuose eksperimentuose buvo naudojamos dvi BDNF koncentracijos, 5 ir 25 ng/ml, kurios padidino CAT aktyvumą 1,4 ir 2,6 karto, atitinkamai. Kada prie BDNF prijungė NGF (50 ng/ml), kuris pats didino CAT aktyvumą 2,8 karto, CAT aktyvumo lygis atspindėjo bent jau papildomą efektą (VIII lentelė). Naudotų NGF koncentracijų atveju, grynai papildomas efektas dėl NGF davė padidėjimą atitinkamai 4,2 ir 5,4 karto virš kontrolinių reikšmių. Iš tikrųjų, stebėtos reikšmės buvo šiek tiek aukštesnės už paprastą papildomą efektą.

VIII lentelė

Poveikis CAT aktyvumui, vienu metu pridėjus BDNF ir NGF

Koncentracija (ng/ml)	CAT-aktyvumas (pmol (HR) duobutė)	Kontrolė (%)
Kontrolė	561,3±34,8	
(50)	1546,3±89,7	280
BDNF (5)	768,0±25,4	240
BDNF (25)	1470,1±66,2	260
NGF (50) +BDNF (5)	2767,6±177,2	490
NGF (50) +BDNF (50)	3742,0±669,3	670

Pertvarinės ląstelės buvo auginamos 12 dienų ant 5HS/N3, esant nurodytoms trofinių faktorių koncentracijoms, CAT aktyvumas buvo nustatomas kaip aprašyta. Reikšmės tai vidurkis ± SEM iš 3-5 pakartojimų.

Buvo patikrinta galimybė įvykti biologinei reakcijai, stebimai apdorojant su BDNF, įvykti dėka BDNF priklausomo išskyrimo endogeninio NGF. Ištirti šį klausimą, buvo panaudoti monokloniniai antikūnai prieš NGF (antikūnas 27/21, Korsching ir Thoenen 1983), blokuojantys bet kokią su NGF susijusią reakciją. Kaip parodyta IX lentelėje NGF poveikis į CAT aktyvumą buvo žymiai sumažintas anti-NGF antikūnais, tuo tarpu BDNF indukuota reakcija iš esmės

liko nepakitusi. Reikia pažymėti, kad pagrindinis CAT aktyvumo lygis sumažėjo apytiksliai 20% kultūrose, apdorotose prieš NGF, lyginant su neapdorotomis kultūromis (kontrolė). Vis dėlto, pastebėtas CAT aktyvumo padidėjimas pertvarinėse kultūrose, sukeltas BDNF, atrodo yra tiesioginis efektas, nereikalaujantis tarpininko, endogeninio NGF padidėjimo pavidale.

IX lentelė

Anti-NGF poveikis į NGF ir BDNF sugebėjimą indukuoti fermentinį CAT aktyvumą

CAT-aktyvumo koncentracija	pmol (HR) duobutė	% nuo kontrolės
Kontrolė	517.53±3,2	-
BDNF (25)	1021.6±106,1	197
NGF (50)	1139.0±0,99,1	220
Kontrolė+Anti-NGF	418.7±27,0	81
BDNF+Anti-NGF	819,2±68,8	158
NGF+Anti-NGF	551,0±27,0	107

Po 12 dienų auginimo 5HS/N3 terpėje, esant nurodytoms trofinio faktoriaus koncentracijoms, pertvarinės ląstelės (pasėtos 2,3 (10³) ląstelių į cm² tankiu) buvo surinktos. CAT aktyvumas buvo nustatomas kaip aprašyta eksperimentinių metodų skyriuje, pateikti duomenys, tai vidurkis ± SEM iš šešių pakartojimų.

Taip pat buvo tiriama galimybė, kad AChE aktyvumas panašiai reguliuojamas, kaip ir CAT aktyvumas, su BDNF arba NGF pagalba (Fig. 26.). Skirtingai nuo CAT aktyvumo, AChE priklausomybė nuo BDNF arba NGF dozės, panašu, yra tiesiškai didėjanti iki 50 ng/ml. Prie šios koncentracijos NGF ir BDNF padidindavo AChE aktyvumą 274% ir 237%, atitinkamai, lyginant su neapdorotais kontroliniais pavyzdžiais. Buvo tiriamas BDNF ir NGF sukulto CAT aktyvumo padidėjimo priklausomybė nuo laiko (Fig. 27.). Kultūrose,

apdorotose su 50 ng/ml BDNF, CAT aktyvumas padidėjo iki 170% kontrolinių reikšmių per tris dienas. Šis augimas tęsėsi iki šeštos dienos, kada buvo pasiektas plato 2,5 karto padidėjimas lyginant su kontrolinėmis reikšmėmis per visas likusias tyrimo dienas. Priešingai, CAT reakcija į NGF (50 ng/ml) buvo greitesnė, ir pasiekė jau trečią dieną 2,5 karto viršijimą kontrolinių reikšmių. Toliau CAT aktyvumas augo tiesiškai pasiekdamas 3,2 karto viršijimą kontrolinių reikšmių po 12 dienų.

Buvo parodyta, kad astrocitai, auginami kurį laiką kultūroje, be NGF dar sintezuoja įvairius neurotrofinius aktyvumus (Lindsay 1979, Nature 282: 80-82; Lindsay ir kt., 1982, Brain Res. 243:329-343; Aldsay ir kt., 1989, Dev. Brain Res. 48:225-241). Nors mes užtikrinome, kad šiame tyrime BDNF poveikis negali įvykti NGF lygio padidėjimo pagalba, aišku, kad BDNF gali veikti netiesiogiai per kitų neurotrofinių faktorių ekspresijos reguliavimą, ypač glijos ląstelėse. Kad įvertintų ne neuroninių ląstelių įtakos galimybę į BDNF poveikį CAT aktyvumui pertvarinėse kultūrose buvo lyginama cholinerginių neuronų reakcijos į BDNF mišrioje glijos-neuronų kultūrose ir praturtintose neuronais kultūrose (Fig. 28). Kultūrose, praturtintose neuronais, CAT aktyvumo reakcija į BDNF aprašoma varpo formos kreive; maksimalus padidėjimas buvo gautas prie dozės 5 ng/ml, o prie koncentracijos 25 ng/ml buvo aptiktas žymus fermentinio aktyvumo sumažėjimas ($p > 0,001$, lyginant su 15-25 ng/ml BDNF). Panašiai kaip ir parodytame Fig. 25. rezultate, CAT reakcija į BDNF, esant susiliejusiam glijos ląstelių sluoksniui, buvo tiesinė iki didžiausios tirtos dozės 25 ng/ml BDNF.

Esant ne neuroninėms ląstelėms reikdavo didesnių BDNF lygių ekvivalenčiam CAT aktyvumo padidėjimui lyginant su aktyvumu, aptinkamu analogiškai apdorotose kultūrose, praturtintose neuronais. Vis dėlto, BDNF sugebėjimas maksimaliai stimuliuoti CAT aktyvumą pertvariniuose cholinerginiuose neuronuose, iš esmės buvo vienodas tiek su, tiek ir be glijos ląstelių.

Remianti CAT ir AChE aktyvumu, dabar akivaizdu, kad BDNF gali veikti panašiai kaip NGF stiprindamas cholinerginius fenotipinius markerius. Kad tai ištirti toliau, BDNF poveikis į Na^+ -priklausomą, aukšto afiniškumo cholino

įsisavinimą buvo lyginamas su NGF poveikiu (Fig. 29.). Ląstelės buvo auginamos 12 dienų su 30 ng/ml BDNF ir jos akumuliuodavo choliną iki 3,0 karto didesnio lygio nei kontrolė. Paraleliose kultūrose NGF (25 ng/ml) sukeldavo 2,3 karto akumuliuojamo cholino padidėjimą.

16.3. Aptarimas

Lyginant su nustatytais efektais periferiniuose neuronuose (Barde ir kt., 1982, EMBO J., 1:549-553; Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112:319-328; Davies ir kt., 1986; J. Neurosci 6:1897-1904; Hofer ir Barde, 1988, Nature, 331: 262-263) BDNF neuroninis specifiškumas centrinėje nervų sistemoje apibudintas prasčiau. Iki šiol, vieninteliai žinomi, reaguojantys neuronai priklauso nedideliai subpopuliacijai, Thr-1 teigiamos tinklainės ganglijinės ląstelės, pirmiausia identifikuotos žiurkės E17 embriono tinklainės kultūrose (Johnson ir kt., 1986, J. Neurosci 6:3031-3038). Tolimesni tyrimai taip pat nustatė, kad BDNF taip pat veikia suaugusias tinklainės ganglijines ląsteles eksplantantinėse kultūrose (Thanos ir kt., 1989, Eur. J. Neuro 1. 19-26).

Šiame tyrime parodyta, kad BDNF pagerina išgyvenimą cholinerginių neuronų kultūrose iš žiurkės embriono pertvaros, kaip parodyta AChE histocheminiu dažymu, padidina įvairių cholinerginių fenotipinių markerių ekspresiją, t.y. AChE ir CAT aktyvumą, ir didelio afiniškumo cholino įsisavinimą. Papildomai buvo aptikta, kad BDNF padidina NGF receptoriaus ekspresiją pertvarinėse kultūrose.

Pradiniuose eksperimentuose buvo aptikta, kad BDNF padidina AChE-teigiamų neuronų kiekį E17 pertvarinėse kultūrose apytiksliai dvigubai. NGF atveju (Hartikka ir Hefti, 1988, J. Neurosci 8: 2967-2985), šis efektas labiausiai išryškėja esant žemiems ląstelių tankiams. Įdomu, kad vienu metu pridėjus BDNF ir NGF nebuvo gautas tolimesnis AChE teigiamų ląstelių kiekio padidėjimas virš lygio, gauto veikiant kiekvienam iš augimo faktorių atskirai. Šie duomenys patvirtina, kad BDNF ir NGF iš esmės veikia tą pačią pertvarinių cholinerginių neuronų populiaciją.

Kaip anksčiau skelbta apie NGF (Hefti ir kt., 1985, Neuroscience 1:55-58), BDNF nepakeldavo cholinerginių neuronų išgyvenimo kultūrose, sukurtose su

palyginti dideliais ląstelių tankiais. Buvo aptikta, kad cholinerginių neuronų išgyvenimas, išreikštas kaip santykis su pasėtomis ląstelėmis, geresnis prie didesnių ląstelių tankių, nei prie mažų ląstelių tankių, net nepridėjus jokio neurotrofinio faktoriaus. Egzistuoja keletas galimų šito paaiškinimų, tame tarpe padidintas kontaktas tarp ląstelių, palankus padidinto ne neuronų ląstelių kiekio poveikis arba statesnis už tiesinį endogeninio neurotrofinio aktyvumo didėjimas. Kas dėl paskutinės galimybės, tai nebuvo aptiktas žymus padidėjimas endogeninio NGF lygio, kadangi anti-NGF pertekliaus pridėjimas į neapdorotas kultūras su dideliu tankiu pagrindinį CAT aktyvumą sumažino tik 20%. Tokiose kultūrose endogeninis NGF galėdavo 3,4 karto pakelti CAT aktyvumą.

Kaip aptikta baltymų lygyje ir mRNR lygyje, daugelyje pranešimų nurodoma, kad NGF gali reguliuoti savo pačio receptoriaus ekspresiją į didėjimo pusę tiek neuronuose, auginamuose kultūrose, tiek ir *in vivo*. Šiame išradime NGF receptorių aptikimui buvo panaudotas monokloninis antikūnas IgG - 192. Šis monokloninis antikūnas buvo apibūdintas tiek sensoriniuose žiurkės neuronuose tiek ir žiurkės galvos smegenyse (Taninchi ir Johnson 1985, J. Cell. Biol. 101:1100-1106). Patvirtinę Hartikka ir Hefti aptiktą reiškinį, kad NGF gali padidinti savo paties receptorių lygį pertvarinėse kultūrose, kas pastebima pagal IgG-192 imunoteigiamų ląstelių kiekio padidėjimą, mes papildomai aptikome, kad BDNF padidina IgG-192 imunoteigiamų ląstelių kiekį iki 3 kartų. Reakcija į BDNF buvo dvifazė, pasireiškianti tuo, kad prie didelių koncentracijų 25-100 ng/ml ribose, BDNF nedavė tokio žymaus teigiamų ląstelių kiekio padidėjimo, kaip prie 10 ng/ml. Įdomu, kad šis reakcijos tipas visiškai skirtingas nuo to, kaip BDNF sukeldavo AChE teigimų neuronų kiekio padidėjimą. Paskutiniu atveju, prie aukštų BDNF koncentracijų nebuvo pastebėtas maksimalaus efekto dėl BDNF sumažėjimas. Reikia pažymėti, kad nesenai buvo parodyta, jog žemo afiniškumo NGF receptoriai taip pat siejamas su panašiu afiniškumu, kas leidžia laikyti, kad NGF ir BDNF receptoriai žemo afiniškumo gali sutapti (Rodriguez-Tebar ir kt., 1990, Binding of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Nerve Growth Factor Receptor, Neuron, 4, 487-492).

Galimas BDNF ir NGF veikimų panašumas buvo įtariamas, atradus, kad BDNF kaip ir NGF iššaukdavo AChE aktyvumą. Nors taip pat buvo aptikta, kad BDNF gerina cholinerginių neuronų išgyvenimą panašiu laipsniu kaip ir NGF, BDNF poveikis į CAT aktyvumą nebuvo toks didelis kaip NGF poveikis. Keliuose eksperimentuose maksimali CAT indukcija BDNF pagalba buvo 1,8-2,6 karto padidėjimo ribose, tuo tarpu, NGF atveju paprastai buvo stebimas padidėjimas daugiau kaip 3 kartus. Tuo būdu, nors, gal būt, yra tam tikras panašumas tarp BDNF ir NGF veikimo mechanizmų, pilnai įmanoma, kad egzistuoja subtilūs skirtumai jų atitinkamų receptorių ekspresyvume ir reguliavime, šių receptorių susijungime su antriniu tarpininku (tarpininkais), būtinais CAT aktyvumo indukavimui.

Kitimų laike tyrimai patvirtino prielaidą, kad skirtumai tarp BDNF ir NGF CAT aktyvumo indukuoto lygio, gali rodyti skirtingus reguliavimo kelius. Neuronai pertvarinėse kultūrose reaguodavo į BDNF CAT aktyvumo padidėjimu iki 6 dienų, kada reakcija išeidavo į plato. Priešingai, NGF sukeltas CAT aktyvumas nuožulniai tiesiškai kilo nuo 3 iki 12 dienos. Indukuoto CAT aktyvumo kilimo nutrūkimas 6-tą dieną kultūrose, apdorotose su BDNF, gali rodyti pakitimus ekspresijos vystymesi arba BDNF receptorių, arba būtino reakcijai komponento. Įvertinant tai, kad cholinerginių neuronų (AChE teigiamų neuronų) kiekis, aptinkamas didelio tankio kultūrose 12-tą dieną, nepriklauso nuo egzogeninio BDNF ar NGF, atrodo, kad mažai įtikėtina, kad diferencialinis nervinių ląstelių žuvimas vyksta dėl kitimo laike skirtumų, kurie buvo aptikti indukuojant CAT aktyvumą su šiais dviem augimo faktoriais.

Pradiniuose eksperimentuose, kuriuose buvo cholinerginiai ląstelės iš bazalinių galinių smegenų veikiami su BDNF, nebuvo daromos prielaidos apie pirminius ląstelių tipus, neuronų ar glijos, atsakančių į šiuos faktorius. Nors matavimai atlikti labai praturtintose periferinių neuronų kultūrose, įrodo, kad BDNF daro savo įtaką tiesiogiai neuronams (Lindsay ir kt., Dev. Biol. 112:319-328; Lindsay, 1988, J. Neurosci 7:2354-2405), galima numatyti, kad BDNF sukelti neuroniniai efektai aptikti šiame tyrime, galėjo būti iššaukti BDNF pirminio poveikio į astrogliją arba kitas neuronines ląsteles. Tačiau, buvo aptikta, kad

BDNF vienodai efektyvus indukuojant CAT aktyvumą kai egzistuoja susiliejęs monosluoksnis, pagrinde iš astroglijinių ląstelių, arba kai iš kultūrų, žymia dalimi pašalinamos glijos ląstelės, apdorojant mitozės inhibitoriumi, citozin-arabinoze. Šiuose eksperimentuose atliktas įdomus pastebėjimas - priklausomybės nuo BDNF dozės kreivių forma šiuose dviejuose atvejuose aiškiai skyrėsi. Esant glijos monosluoksniui, reakcija į BDNF buvo tiesinis augimas didinant BDNF koncentraciją. Kultūrose, praturtintose neuronais, reakcija į BDNF priklausomai nuo jo dozės pasistūmė į kairę. Vienas iš galimų šių rezultatų paaiškinimų būtų toks, kad glija pati gali ekspresuoti BDNF receptorių, tuo pačiu sumažindama efektyvią koncentraciją ligando, skirto neuronuose lokalizuotiems receptoriams. Iš kitos pusės, slopinantis astrocitų poveikis galėjo būti tiesioginis, nepriklausantis nuo įtakos į ligando koncentraciją ar receptoriaus ekspresiją, ir persiduoti, pavyzdžiui, žymiai sustiprintos BDNF degradacijos pagalba. Apie panašius rezultatus pranešė Hartikka ir Hofti (1988, J. Neurosci 8:2567-2985), o taip pat Honeger ir Lenua (1982, Dev. Brain Res. 3,225-238). Buvo pademonstruota, kad glijos ląstelės iš įvairių smegenų sričių gali daryti žymią įtaką surištų su jomis neuronų morfologijai (Prochiantz ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 76:5387-5391; Prochiantz ir kt., 1981, Nature 293:570-572). Tuo būdu pertvarinė glija gali turėti arba membraninės arba sekretorinės kilmės savybes, kurios gali veikti slopindamos cholinerginio fenotipo ekspresiją. Panašiose eksperimento sąlygose dabar buvo ištirtos amonio rago astrocitų reguliatorinės savybės.

Iš pateiktų duomenų, aišku, kad ir BDNF ir NGF sugeba stiprinti pertvarinių cholinerginių neuronų funkciją. Įdomu įvertinti tikimybę, kad du labai giminingi neurotrofiniai faktoriai veikia vienintelę neuroninę populiaciją. Buvo tam tikrų prielaidų, kad BDNF ir NGF veikla ankstyvoje periferinių neuronų vystymosi stadijoje persidengia, ypač dorsalinės šaknelės mazgo neuronų subpopuliacijoje ir jų pirmtaku, o po to, vėliau išsiskiria ir veikia nepriklausomai skirtingose populiacijose (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol. 112:319-328; Esberger ir Rohrer, 1988, Dev. Biol., 126: 420-432; Barde 1989, Neuron 2:1525-1534).

Tačiau tai nebuvo tiksliai nustatyta, panaudojant atitinkamus markerius sensorinių neuronų subpopuliacijų aptikimui. Kadangi šis tyrimas sukoncentruotas embrioninėse pertvarinėse kultūrose, vieninteliame vystymosi laiko momente, E17, tai, galbūt, toks atsiskyrimas įvyks vėlesnėse pertvaros vystymosi stadijose. Tuo būdu, gali būti įdomu tirti pertvarinių cholinerginių neuronų reakciją į BDNF ir NGF laikinius ir erdvinis skirtumus. Dabar, būtų įdomu ištirti BDNF poveikį cholinerginiams bazalinių galinių smegenų neuronams *in vivo*, nes šiuo metu turima duomenų, kad NGF iš amonio rago įtrauktas į galinių smegenų cholinerginių neuronų normalų vystymąsi ir palaikymą *in vivo*. Bus įdomu nustatyti, vaidina ar ne BDNF panašią rolę *in vivo*. Nesenas atradimas, kad BDNF mRNR ypač gausi amonio rage, patvirtina tokį BDNF vaidmenį.

17. Pavyzdys: fermentinis BDNF virtimas aktyviu ir subrendusiu BDNF

17.1. Medžiagos ir metodai

Komercinė endoproteinazė Arg-C (išgryninta iš pelių pažandės liaukos) buvo naudojama fermentiniam pavertimui didelės, pirminės formos hBDNF (prepro BDNF) į biologiškai aktyvų subrendusį baltymą. Šis fermentinis skaldymas buvo atliekamas *in vitro* reakcija. Šios fermentinės reakcijos substratu buvo prepro BDNF, sintezuotos su CHO-DG iš 44 ląstelių, kurios buvo išskirtos į ląstelių auginimo terpę ir surinktos. Auginimo terpė buvo sudaryta iš F-12 (Ham) terpės, neturinčios nukleotidų, ir papildytos 1% veršiuko fetalinio serumu (FBS) ir po 1% penicilinu ir streptomycinu. Reakciją vykdė prie 37°C 3 min. naudodami 5 vienetus fermento ir 50 µl ląstelių CHO-GD44 ląstelinio supernatanto, turinčio prepro BDNF. Šiose sąlygose buvo atliktas prepro BDNF skaldymas iki subrendusio hBDNF.

17.2. Rezultatai ir aptarimas

Prepro-forma rekombinantinio hBDNF (apytiksliai 31000 daltonų) pilnai paversdavo į subrendusią bioaktyvią hBDNF formą (apytiksliai 12000 daltonų) *in vitro*, panaudojant endoproteinazę Arg-C. Rekombinantinis žmogaus smegenų neurotrofinis faktorius buvo sėkmingai pagamintas žinduolio ląstelėse (CHO-

DG44). hBDNF genas buvo stabiliai integruotas į CHO ląstelės genomą ir amplifikuotas panaudojant metotreksatinę amplifikavimo strategiją. Rekombinantinis hBDNF buvo sekretuojamas į terpę ir rodė biologinį aktyvumą. Metabolinis žymėjimas su vėliau sekančia elektroforeze ant SDS poliakrilamidinio gelio (15%) pademonstravo, kad didžioji dalis sintezuoto [³⁵S]- žymėtojo hBDNF produkto, sekretuoto į terpę, migravo prepro-formos pavidale su molekuline mase 31000 (Fig. 30. 2 takas). [³⁵S]- žymėtasis baltymas, sekretuotas iš CHO-DG44 laukinio tipo ląstelių, parodyti Fig. 30., 1 takas. Kad pagamintų labiausiai subrendusią hBDNF formą (molekulinės masės 12000), sukūrė specialią *in vitro* strategiją fermentiniam prepro-formos hBDNF skaldymui.

Tripsininio skaldymo produktai parodyti Fig. 30., 3-6 takai. Jaučio kasos tripsinas (pirktas iš Vortington), neturintis chemotripsino, buvo ištirpinamas fiziologinio tirpalo fosfatiniame buferyje ir į tirpalą pridėdavo 50 μl [³⁵S]- žymėtojo CHO ląstelinio hBDNF mėginio. Buvo naudojamos 25, 50, 75 ir 100 μg/ml tripsino koncentracijos. [³⁵S]- žymėtieji reakcijos produktai parodyti Fig. 30. 3-6 takai, atitinkamai. Fermentinio skaldymo reakciją vykdė prie 37°C 5 minutes. 31000-prepro-hBDNF žymės intensyvumo laipsniškas mažėjimas buvo lydimas atitinkamu jos padidėjimu 12500-produkte. Subrendusi hBDNF forma (molekulinės masės 12000) šiose sąlygose nesigeneravo. Fig. 30. 7 takas parodo [³⁵S]-žymėtuosius reakcijos produktus po CHO - ląstelių hBDNF fermentinio skaldymo su endogenine Arg-C, išskirta iš pelės pažandės liaukos ir gauta iš Beringer Mangeim Chemicals, Inc. Buvo atstatyta 100 vnt. šio fermento iš liofilizuotos formos su 100 nl vandens Milli-Q ir buvo saugoma prie -20°C. Fermentiniam CHO ląstelių hBDNF skaldymui buvo naudojami 5 vnt. (5 nl) fermento ir 50 nl [³⁵S]-žymėtojo baltymo iš CHO ląstelių supernatanto, turinčio prepro hBDNF (Fig. 30. 2 takas). Kaip matosi iš Fig. 30. 7 tako, 5 vnt. endoproteinazės - C sugebėdavo paversti prepro-formos hBDNF (31000 m.s.) į subrendusią formą hBDNF (12000 m.s.) per 5 minutes prie 37 °C.

CHO-ląstelių, ekspresuojančių hBDNF, supernatanto fermentinis apdorojimas endoproteinaze Arg-C padidino BDNF biologinį aktyvumą lyginant

su neapdorotu supernatantu. CHO-DG44 ląstelių, ekspresuojančių hBDNF, supernatantai buvo apdorojami endoproteinaze Arg-C 3 minutes prie 37°C. 200 nl supernatanto apdorodavo su 20 vnt. fermento ir tyrė tiek apdoroto, tiek ir neapdoroto hBDNF fiziologinį aktyvumą, panaudodami eksplantantus iš E8 viščiuko dorsalinės šaknelės mazgo. Praėjus 24 valandoms po hBDNF pridėjimo, įvertindavo kokybiškai aksonų ataugimą. Pastebėta, kad, sutinkamai su tuo kas aprašyta aukščiau, apdoroti su endoproteinaze BDNF pavyzdžiai turėjo žymiai didesnę hBDNF bioaktyvumą už kontrolinius (neapdorotus) pavyzdžius. Koncentracinė kreivė pagal šiuos duomenis pateikta Fig. 31.

Ir pabaigoje, išvalyta endoproteinazė Arg-C gali būti naudojama subrendusios bioaktyvios rekombinantinio neurotrofinio faktoriaus formos gavimui iš žmogaus smegenų iš nepilnai procesinguotų molekulių-pirmtakų (t.y., pro-BDNF). Pagal šį naują metodą bus galima išvystyti efektyvią, plataus masto bioaktyvaus žmogaus BDNF gamybą iš žinduolių ląstelių kultūrų. Pavyzdžiui, galima imobilizuoti endoproteinazę Arg-C ant kietos matricos ir įjungti stadiją efektyvios koloninės chromatografijos.

18. Pavyzdys: smegenų neurotrofinis faktorius padeda žiurkės ventralinių vidurinių smegenų dopaminerginių neuronų išgyvenimui ir subrendimui

18.1. Medžiagos ir metodai

18.1.1. Ląstelių kultūros

Disocijuotos kultūros buvo kuriamos mechaniniu ir fermentiniu būdu suskaldant ventralinių vidurinių smegenų audinius, išgautus iš žiurkės embrionų E14-E15 amžiaus disekcijos būdu. Paprastai audinį, surinktą iš dviejų ar trijų žiurkių vadų embrionų, iš vienu metu apsėklintų Sprague-Dawley rūšies žiurkių, apdorojo tripsinu (0,123%, Vortington) F-12 (Gibco) terpėje 20 minučių prie 37°C. Po praplovimo augimo terpėje (MEM, turinti šiuos priedus: gliutaminas 2 mM, gliukozė 6 mg/ml, penicilinas G 0,3 vnt./ml, streptomicinas 5 µg/ml, veršiuko fetalinio serumas 7,5%). Audinys buvo trumpai centrifuguojamas prie žemų apsakų 5 minutes ir nuosėdas trituruodami suskaldė. Palaukus 1-2 minutes kad nedispergavusios ląstelės nusėstų, vienalytę ląstelių suspensiją pasėdavo į 35

mm lėkšteles (iš anksto padengtas poliornitinu ir lamininu Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol. 112: 315), turinčias auginimo terpę, tankiu 5×10^4 ląstelių į kv.cm. Po inkubacijos augimo terpėje iki ryto, leidžiant ląstelėms įsitvirtinti, ląstelės buvo auginamos su ir be BDNF tam tikroje terpėje, neturinčioje serumo, aprašytoje Bottenstein ir Sato (Bottenstein ir Sato 1979, Proc. Natl. Acad. Sci JAV, 76:514), išskyrus tai, kad insulino buvo 20 ng/ml. Dopaminerginių ląstelių vizualizacijai, kultūras fiksavo 4% paraformaldehidu, ilgai praplovinėjo, padarė pralaidžiomis 0,02% saponinu Sorenseno buferyje su 1,5% arklio serumo, ir dažė monokloniniu antikūnu prieš žiurkės TH (firma Boehringer, Mangheim). Surištas pirminis antikūnas buvo vizualizuojamas, naudojant rinkinį Vectastasin ABC (Vector laboratorijos).

18.1.2. Dopamino įsisavinimo matavimas

Kultūros buvo ruošiamos, kaip aprašyta aukščiau 18.1.1. skyriuje, ir auginamos nurodytą kiekį dienų su ar be kiaulės BDNF 50ng/ml. Dopamino įsisavinimas buvo nustatomas trigubose kultūrose nurodytais laiko momentais. Ląsteles iš anksto praplaudavo specialiame buferyje, tokios sudėties: 136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mM KH_2PO_4 , 5 mM gliukozės, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 0,1 mM askorbato ir 0,1 mM pergilino su pH 7,4. Pavyzdžius, kuriuose buvo tiriamas ne neuroninis ^3H -dopamino įsisavinimas, laikė nurodytame benzotropino buferyje (BT), esant 5 μM koncentracijai. Po praplovimo ląsteles iš anksto pašildydavo iki 37°C 5 minutes šviežiame buferyje ir buvo pridedamas ^3H -dopaminas (NEN, 40°C (mmolis)) iki galutinės koncentracijos 50 nM. Po to kultūras inkubuodavo prie 37°C 15 minučių, tirpalą pašalindavo ir ląsteles perkeldavo ant ledo, 4 kartus perplaudavo aprašytu aukščiau, lediniu buferiu. Ląsteles surinkdavo pridėdami 0,5 M NaOH į kultivavimo lėkšteles ir ląsteles, esančias šarminiame ekstrakte, suskaičiuodavo scintiliaciniame Bekman skaitiklyje su 15 mls UltimaGold (scintiliacinis skystis). Specifinis neuronų įsisavintas dopaminas buvo nustatomas remiantis tuo, kad įsisavinimas (cpm), stebimas nesant BZT, buvo mažesnis už įsisavinimą, esant BZT. Paprastai, tarp 70 ir 90% bendro įsisavinimo galima buvo inhibuoti BZT pagalba. Replikuotose kultūrose kiekvienu laiko momentu TP+neuronų kiekis

buvo nustatomas imunocitocheminio dažymo pagalba ir parodytieji rezultatai tai įsisavinimas, normalizuotas remiantis TH+bazė pagrindu.

18.1.3. Laikinė BDNF ekspresija

COS M5 ląsteles transfekuodavo vektoriumi CDM8, turinčiu seką, koduojančią žmogaus BDNF. Praėjus 72 valandoms po transfekavimo surinkdavo 50 ml kultūros supernatanto ir dializuodavo 6 M karbamido. Dializuotas supernatantas apjungiamas su amfoliniais (pH 3,3-10 BioRad) 4,3 valandoms. Surinkdavo frakcijas, dializuodavo 25 mM NaPO₄ buferyje su pH 7,6 pasinaudodami dializės vamzdeliu, kurį iš anksto praskalaudavo su BSA (0,5 mg/ml), kad išvengtų nespecifinės adsorbcijos. Buvo tikrinamas frakcijų aktyvumas, skatinantis aksonų ataugimą E8 eksplantantų kultūrose iš viščiuko dorsalinės šaknelės mazgo. Aktyvios frakcijos buvo surinktos į rezervuarą. Rezervuare esančių frakcijų aktyvumo analizė SDS PAGE pagalba ir vėliau sidabrinio dažymu (Wraey ir kt., 1981, Anal. Biochem. 118:157) ant 8,18% gelio parodė, kad yra silpna juosta 68 kD atitinkanti BSA ir vienintelė juosta apytiksliai 12 kD atitinkanti tai, kas anksčiau buvo aptikta su kiaulės BDNF (Barde ir kt., 1982, EMBO, 1:549) (duomenys neparodyti). Lyginamuosiuose bioeksperimentuose, atliekamuose su eksplantantais iš vištos dorsalinės šaknelės mazginio ir simpatinio mazgų, skirtuose valyto rekombinantinio žmogaus BDNF specifinio aktyvumo ir neuroninio specifiškumo nustatymui, gauti rezultatai buvo panašūs su išgryninto kiaulės BDNF rezultatais.

18.1.4. hBDNF gavimas iš transfekuotų CHO ląstelių

CHO-DG44 ląsteles maloniai padovanojo dr. L.Chasin (Kolumbijos universitetas, JAV). Šios ląstelės turi mažai dihidrofolat-reduktazės (dhfr) (Urlaub ir Chasin 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV 77: 4216-4220). CHO - DG44 ląsteles laikė F-12 (Ham) terpėje su 10% veršiuko fetalinio serumu, 1% penicilinu ir streptomycinu ir 2 mM gliutaminu. Ląsteles peržiūrėdavo du kartus per savaitę ir, paprastai, tikrindavo ar neužkrėstos mikoplazma. Prieš transfekciją visa plazmidinė DNR buvo išvalyta dviguba cezio chloridine elektroforeze. Žmogaus smegenų neurotrofinio faktoriaus geną subklonavo į ekspresuojantį žinduolių vektorių pCDM8, tam kad pagaminti pC8hB kaip buvo

aprašyta anksčiau (Maisonpierre ir kt., Science 247,1446-1451). Susilpnintos dihidrofolat reduktazės geną, p410, maloniai perleido dr. L.Chasin. Šios dvi genetinės konstrukcijos kartu buvo transfekuotos į CHO-DG44 ląsteles, panaudojant elektroporaciją (ištirta Shigekawa ir Dower 1988, Biotechniques 6:742-751). Apytiksliai 1×10^6 ląstelių transfekavo 20ng pC8hB ir 0,2 ng p410. Praėjus 48 valandoms po transfekcijos, CHO-DG44 ląstelės skaidė selektyvioje terpėje, sudarytoje iš neturinčios nukleotidų F-12 (Ham) terpės, be timidino ir hipoksantino; -HT, plius 10% dializuoto veršiuko fetalinio serumo ir 1% penicilino ir streptomicino.

Atskiras kolonijas išskirdavo praėjus apytiksliai 10 dienų po ląstelių patalpinimo į selektyvią terpę be nukleotidų. Individualiai atrinktos kolonijos, atsparios augimui terpėje F-12 (-HT), be nukleotidų, apdorodavo su 0,02 arba 0,05 arba 0,1 μM metotreksato, kad inicijuotų geno amplifikavimą (Alt ir kt., 1978, J. BIOL. Chem 253: 1357-1370). Atsparias MTX (metotreksatui) kolonijas augindavo telkiniuose ir toliau amplifikuodavo su 1,5 arba 2,0 arba 2,5 μM MTX. Buvo išskirta vienintelė kolonija, atspari 2,5 μM MTX ir atrinkta plataus masto auginimui ir hBDNF gamybai. Šio klonų analizė Southern-blot pagalba (klonas DGZ 1000-B-2,5) parodė 50-kartinę BDNF geno amplifikaciją lyginant su laukinėmis CHO-DG44 ląstelėmis. Bioeksperimentai su vištos E8 embriono dorsalinės šaknelės mazgų (DRG) eksplantantais parodė, kad šis klonas produkavo apytiksliai 9,5 ng/ml hBDNF (neparodyta). Rekombinantinį hBDNF gamino dideliu mastu kultivuodami DGZ 1000-B-3-2,5 ląsteles 400 cm^2 roller-flakonuose. Terpę surinkdavo praėjus apytiksliai 4 dienoms po to, kai ląstelės susiliedavo. BDNF išvalymas iš auginimo supernatanto buvo atliekamas kaip nurodyta aukščiau, COS supernatanto atveju.

18.2. Rezultatai ir aptarimas

Apibudinimas molekulinį signalų, kontroliuojančių neuronų išgyvenimą ir taikinių inervacijos specifiškumą, turi fundamentalią reikšmę ne tik todėl, kad tai padeda suprasti kaip sudaryta nervų sistema, bet ir todėl, kad tai, greičiausiai, leis geriau suprasti mechanizmus, palaikančius ir atstatančius subrendusius neuronus tam tikrose sinaptinėse konfigūracijose. Kadangi plačiai pripažinta,

kad neuronų išgyvenimas ir palaikymas priklauso nuo specifinių, taikininės kilmės neurotrofinių faktorių (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1969, *Physiol. Rev* 48:534; Thoenen ir Barde 1980, *Physiol. Rev* 60:1284; Purves 1988, "Body and Brain", Harvard University Press, Cambridge; Barde, 1989, *Neuron* 2:1525; Lindsay 1988, *The Making of the Nervous Systems*, Oxford, p.148), tai iki šio laiko labai mažas kiekis tokių molekulių buvo pilnai apibudintos. Iki šiol parodyta, kad tik 2 neurotrofiniai faktoriai, nervinio augimo faktorius (NGF) ir smegenų neurotrofinis faktorius (BDNF) selektyviai palaiko įvairias neuronines populiacijas *in vivo* (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1968, *Physiol. Rev* 48:534; Barde 1989, *Neuron* 2: 1525; Leibrock ir kt., 1989, *Nature* 341:149).

Neuroninių ląstelių kultūros plačiai taikomos bioeksperimentuose, skirtuose neurotrofinio aktyvumo identifikavimui ląstelėse ir audinių ekstraktuose (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1968, *Physiol. Rev* 50:1284; Lindsay 1988, *The Making of the Nervous System*, Oxford, Varon ir Adler 1981, *Adv. Cell Neurofid.* 2:118) ir išvalytų neurotrofinių faktorių neuroninio specifiškumo (arba specifiškumų) nustatymui (Ebendal, 1989, "Nerve Growth Factors", John Wiley ir kt., 1982, *EMBO J.* 1:549; Davies ir kt., 1986, *J. Neurosci* 6:1897; Lindsay ir kt., 1985 *Dev. Biol.* 112:319).

Iki šiol daugelis tyrimų koncentravosi įvairių klasių neuronų neurotrofiniuose poreikiuose periferinėje nervų sistemoje. Pakol kas, geriausiai apibudintu neurotrofiniu faktoriumi buvo NGF, dėka jo prieinamumo: buvo parodyta, kad NGF *in vitro* ir *in vivo* būtinas neuronų subpopuliacijų išgyvenimui ir palaikymui tiek periferinėje, tiek ir centrinėje nervų sistemoje (Levi-Montalcini ir Angeletti, 1968, *Physiol. Rev.* 48:534; Thoenen ir Barde, 1980, *Physiol. Rev.*, 60:1284; Whittemore ir Seiger, 1987, *Brain Res. Rev.* 12:439, Snider ir Johnson, 1989, *Ann. Neurol.* 26:489; Heffl ir kt., 1989, *Neurobiology of Aging* 10:515; Martinez ir kt., 1987, *Brain Res.* 412: 295; Takei ir kt., 1988, *J. Neurochem.* 51:111, Hartikka ir Heffl, 1988, *J. Neurosci.* 8:2967). Sunkumai, identifikuojant neurotrofinius augimo faktorius nespecifiniams centrinės nervų sistemos neuronams, kilo dėl riboto priėjimo prie išvalytų neurotrofinių faktorių preparatų, skirtingų nuo NGF, o taip pat dėl sunkumų paruošiant vienalyčius

specifinių neuronų populiacijų preparatus. Du neseni pastebėjimai paskatino mus ištirti BDNF veikimą į CNS (juodosios medžiagos) dopaminerginių neuronų išgyvenimą. Pirmiausia, dabar aišku, kad BDNF genas ekspresuojamas centrinėje nervų sistemoje, ir sąlyginai aukštesniuose lygiuose už NGF geną (Leibrock ir kt., 1989, Nature 341:149). Antra, buvo skelbta, kad baltymas, išvalytas iš jaučio *striatum*, juodosios medžiagos dopaminerginių neuronų taikinio, ir turintis charakteristikas, akivaizdžiai panašias į BDNF charakteristikas, gali gerinti *in vitro* išgyvenimą dopaminerginių neuronų, paruoštų iš jaučio vidurinių smegenų (Dal Toso ir kt., 1988, J. Neurosci 8:733).

Fig.32a. demonstruoja tipišką disocijuotų ventralinių vidurinių smegenų ląstelių vaizdą po 9 dienų auginimo kultūroje. Faktiškai visos šios ląstelės turėjo fazoryškius perikarijonus ir ilgas ataugas. Keletas ląstelių buvo aiškiai fibroblastinės morfologijos bet nebuvo aptikta astroglijos ląstelių, kai kultūrą nudažė su antikūnu prieš astroglijinį markerį, glijinį fibriliarinį rūgštinį baltymą (GFAP; Bignami ir kt., 1972, Brain Res. 43:429). Dopaminerginių neuronų vizualizacijai šiose kultūrose, buvo atliekamas imunocitocheminis dažymas su monokloniniais antikūnais prieš TH. Kaip tikėtasi, TH+ neuronų kiekis kultūroje buvo nedidelis (strėliukės, Fig.32 b, c) ir kito priklausomai nuo auginimo laiko, tarp 0,1 ir 0,5 % nuo pasėtų ląstelių. Tarp TH+ ląstelių buvo neuronai, turintys skirtingas morfologijas, kaip parodyta Fig.33.

Visose kultūrose visais atvejais buvo stebimas laipsniškas TH+ ląstelių kiekio mažėjimas (Fig.34a, Fig. 35.) po pirmų 3-4 dienų *in vitro*. 8-tą auginimo dieną, pavyzdžiui, TH+ ląstelių kiekis kontrolinėse kultūrose sudarė tik 25% kiekio, aptinkamo panašiose kultūrose antrą dieną (Fig. 35.). Tačiau, kultūrose, apdorotose BDNF, TH+ląstelių praradimas buvo žymiai sumažintas lyginant su kontrole. Visuose ištirtuose laiko momentuose po 8 dienų *in vitro*, TH+ląstelių kiekis apdorotose su BDNF kultūrose buvo didesnis nei neapdorotose kontrolinėse kultūrose, pavyzdžiui, 1,8 karto didesnis po vienintelio BDNF pridėjimo (34a pav.) ir 3 kartus didesnis po daugkartinio pridėjimo (Fig. 35.). Net pridėdant tik vieną kartą į kultūras, palaikomas 8 dienas, BDNF veikimas priklauso nuo jo dozės (34b pav.). Patvirtindamas ankstesnius pranešimus (Dal

Toso ir kt., 1988, J. Neurosci 8:733; Knusel ir kt., 1990, J. Neurosci 10:558), NGF (50 ng/ml) nedarė įtakos TH+ ląstelių kiekiui (Fig.34c).

Toliau nagrinėjant BDNF poveikį į dopaminerginius neuronus šiose kultūrose buvo tiriamas TH+ląstelių sugebėjimas įsisavinti ^3H -dopaminą. Kaip parodyta X lentelėje, sugebėjimas įsisavinti dopaminą (normalizuotas pagal TH+neuroną) žymiai padidėjo po 8 dienų auginimo kultūroje, bet po to krito. Tačiau buvo aptikta, kad BDNF nekeičia TH+-ląstelių sugebėjimo įsisavinti dopaminą, kadangi tos pačios laikinės charakteristikos ir panašios reikšmės buvo aptiktos, tiek esant, tiek ir be BDNF (X lentelė). Remiantis šiuo rezultatu, buvo iškelta hipotezė, kad BDNF, greičiausiai, veikia tiesiogiai, gerindamas dopaminerginių neuronų išgyvenimą vidurinių smegenų kultūrose, o ne indukuoja dopaminerginio fenotipo ekspresiją neuronuose, kurie nebūtinai reikalauja BDNF savo išgyvenimui. Tolimesniam šito tyrimui, buvo atlikti eksperimentai, kuriuose TH+neuronų kiekis buvo nustatomas kultūrose, kuriose BDNF pridėjimą pradžioje užlaikydavo keletą dienų. Aptikta, kad kai BDNF pridėjimas užlaikomas iki 5 dienos, o TH+ląstelių kiekį nustatydavo 6, 8 ir 10 dieną, šiose kultūrose buvo akivaizdžiai mažiau dopaminerginių ląstelių, lyginant su paraleliomis kultūromis, kuriose BDNF buvo pridedamas 2-ą dieną (Fig. 36.). BDNF pridėjimas, nors ir užlaikytas, aiškiai didindavo TH+neuronų kiekį, lyginant su kontrole, tačiau nagrinėjant ekvivalenčiuose laiko momentuose buvo aptikta, kad užlaikytas pridėjimas niekada neišgelbėdavo tiek neuronų, kiek BDNF pridėjimas 2-ą dieną.

Kartu paėmus, šie rezultatai prieštarauja hipotezei, kad BDNF veikia didindama TH geno ekspresiją fiksuotame ląstelių skaičiuje ir palaiko hipotezę, kad BDNF veikia didindamas dopaminerginių neuronų išgyvenimą, kurie kitaip žūtų, jei šio faktoriaus nebūtų pridėta į kultūras ankstyvoje stadijoje. Buvo paskelbta keletas publikacijų apie vidurinių smegenų dopaminerginių neuronų subrendimo stimuliavimą ir išgyvenimo didinimą *in vitro*, panaudojant arba ekstraktus iš taikinių audinio arba įvairius neurotrofinius faktorius (Dal Toso ir kt., 1988, J. Neurosci. 8:733; Knusel ir kt., 1990, J. Neurosci 10:558; Prochiantz ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. JAV, 76:5387; Di Porzio ir kt., 1980, Nature,

288:370; Prochiantz ir kt., 1981, Nature 293:570; Denis-Donin ir kt., 1983, J. Neurosci 3:2292). Tačiau iki šiol nebuvo publikacijų apie pilnai išvalytą molekulę tiesiogiai arba selektyviai palaikančią TH+neuronų išgyvenimą, kai visiškai nėra glijos ląstelių arba vykstant ląstelių dalinimuisi (kas buvo stebėta, pavyzdžiui, su IGF-1 arba FGF, Dal Toso ir kt., 1988, J. Neurosci 8: 733). Sutinkamai su ankstesnėmis publikacijomis, kuriose buvo naudojami pelės ankstyvo embriono audiniai (Dal Toso ir kt., 1988, J. Neurosci 8:733), E14 ląstelės iš žiurkės ventralinių vidurinių smegenų buvo auginamos tam tikroje terpėje, neturinčioje serumo, ir šios ląstelių kultūros, kaip pasirodė, iš esmės neturi astrocitų ir fibroblastų. Naudojant šiuose tyrimuose santykinai žemą ląstelių tankį, 30000 ląstelių į cm^2 eilės, buvo sumažinti efektai bet kurio įmanomo endogeninio neurotrofinio aktyvumo ir buvo galima tiksliau apskaičiuoti ląsteles. Įvertinant pateiktus rezultatus, atrodo, kad neurotrofinis faktorius, Dal Toso ir kt. (1988, J. Neurosci 8:733) dalinai išvalytas iš jaučio *striatum*, greičiausiai, yra BDNF. Iš to galima padaryti prielaidą, kad BDNF gaminamas striatume ir įsisavinamas dopaminerginių neuronų ataugomis, nusitęsiančiomis nuo juodosios medžiagos. Tačiau, iki šiol northern-blot-analizės pagalba neaptiktas striatomo audinyje didesnis BDNF (ar kitų neurotrofinų šeimos narių) mRNR kiekis.

Aišku, kad net daugkartiniu BDNF pridėjimu negalima išsaugoti visų juodosios medžiagos dopaminerginių neuronų, tirtame auginimo periode. Šis fenomenas jau buvo stebimas eksperimente su panašiomis sąlygomis, atliktame Dal Toso ir kt. (1988, J. Neurosci 8:733), kuris parodė, kad šis žuvimas gali būti surištas su naudotu ląstelių tankiu; prie didesnių ląstelių tankių (4 kartus didesnių nei naudoti čia) galima buvo aptikti didelį kiekį katecholamin-fluorescuojančių ląstelių ir spontaninis šių ląstelių išnykimas mažėjo. Gal būt, tarpląstelinis kontaktas būtinas ilgalaikiui šių ląstelių išgyvenimui. Tolimesni tyrimai, ypač, skirti BDNF poveikiui ventralinių vidurinių smegenų dopaminerginių neuronų vystymuisi ir palaikymui *in vivo*, yra būtini, kad suvokti fiziologinę prasmę aprašytos čia BDNF veiklos. Turint omenyje specifinį juodosios medžiagos dopaminerginių neuronų žuvimą Parkinsono ligos metu, ypač pageidautina aptikti neurotrofinį faktorių, kuris pasirinktinai veikia į šias

ląsteles. Todėl čia pateiktas atradimas, kad BDNF palaiko išgyvenimą šių neuronų, reagujančių į NGF, skatina toliau vykdyti eksperimentus su gyvūnais, kurie leis nustatyti, ar gali BDNF apsaugoti dopaminerginius neuronus nuo neurotoksinio poveikio 6-hidroksidopamino arba MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinas). Tokie tyrimai gali nulemti naują terapinį parkinsonizmo gydymo būdą.

X lentelė

BDNF tiesiogiai nedidina dopamino įsisavinimo ventralinių vidurinių smegenų kultūrose

³H-dopamino įsisavinimas (cpm(TH) + neuronas/15 min)

auginimo dienos	kontrolė	paveiktos su BDNF
3	0,51±0,1	0,95±0,2
6	4,5±0,3	3,1±0,6
8	18,5±5,3	27,3±1,2
10	3,37±0,24	2,21±0,18

19. Pavyzdys: BDNF priklausomai nuo dozės inhibuoja gama-aminosviesto rūgšties įsisavinimą

19.1. Medžiagos ir metodai

19.1.1. Amonio rago lastelių kultūros

Amonio ragą disekcijos būdu pašalindavo iš E18-E19 žiurkės, Sprague-Dawley rūšies, embriono ir surinkdavo F10 terpėje. Audinius smulkindavo, du kartus praplaudavo F10 (Gibco) terpėje ir tripsinizuodavo 0,25% tripsinu (Gibco) 20 min. prie 37°C. Pepsiną inaktyvuodavo pridėdami terpę su serumu, sudarytą iš minimaliai būtinos terpės (MEM) su pridėtais veršiuko fetalinio serumu (FCS 10%), gliutaminu (2 mM), penicilinu (25 vnt./ml) ir streptomycinu (25 vnt./ml). Disociavusias ląsteles gaudavo atsargiai trituruodami, surinkdavo ir centrifuguodavo prie mažų apsisukimų (500 aps./min) 30 sek. Centrifugavimą pakartodavo du kartus ir ląstelių derbis buvo pakartotinai suspenduojamas terpėje su serumu. Po to ląstelės palikdavo 6 mm duobutėse arba 35 mm

lėkštelėse, kurios buvo padengtos poliornitinu (10 µg/ml) ir lamininu (10 µg/ml). Daugumoje eksperimentų ląsteles sėdavo mažu tankiu, apytiksliai 71000 ląstelių į cm². Praėjus 5-6 valandoms po ląstelių sėjos, terpę pakeisdavo kita, neturinčia serumo ir sudaryta iš 1% N3 ir penicilino-streptomicino (25 vnt./ml ir 25 µg/ml atitinkamai), be to buvo pridėdamas BDNF. Terpę keitė kas tris-keturias dienas, pridėdami BDNF kiekvieną kartą iš naujo.

19.1.2. Gama-aminosviesto rūgšties (GABA) didelio afiniškumo įsisavinimo matavimas

Didelio afiniškumo GABA įsisavinimą matuodavo pagal patobulintą Tamazawa ir Appel metodiką (1986, Brain Res. 399: 111-124). Ląstelės buvo praplaunamos specialiaame buferyje, turinčiame 140 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 6 mg/ml gliukozės, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ ir 0,1% BSA. Po praplovimo ląstelės buvo inkubuojamos nurodytame buferyje 5 min. prie 37°C. Po to pridėdavo ³H-GABA (NEN, NET-19IX, III.4 Ci (mmolis)) iki galutinės koncentracijos 12 mM ir inkubuodavo 10 min prie 37°C. Po to ląsteles laikė ant ledo ir tris kartus praplovė nurodytu buferiu. Ląsteles inkubavo su 0,14 NaOH 2 val. kambario temperatūroje ir apskaičiuodavo ³H-GABA kiekį ekstrakto. Aptikta, kad ³H-GABA įsisavinimas buvo tiesinis bent jau 30 minučių. GABA įsisavinimą ne neuroninėse ląstelėse inhibuodavo pridėdami 2 mM R-alanino, tuo tarpu neuronų specifinis įsisavinimas buvo patikrintas inhibuojant 1 mM nipekotine rūgštimi.

19.2. Rezultatai ir aptarimas

Neseniai mes aptikome didelio BDNF kiekio požymius amonio rago kultūrose, praturtintose neuronais, bet ne amonio rago astrocituose. Šie duomenys patvirtina, kad BDNF lokalizuojasi amonio rago neuronuose. Kad patikrinti BDNF poveikį amonio rago neuronams kultūroje, ląstelės buvo apdorojamos įvairiomis BDNF koncentracijomis (rotofor-valytoms iš COS supernatantų). Po aštuonių dienų apdorojimo matuodavo didelio afiniškumo GABA įsisavinimą neuronuose. Kaip parodyta Fig. 37., BDNF priklausomai nuo dozės inhibuodavo GABA įsisavinimą. Tuo būdu BDNF gali daryti įtaką GABA-erginių neuronų išgyvenimui ir/arba fenotipinei ekspresijai. BDNF nedarė jokios

įtakos neuronams, turintiems glutamato (kaip įvertinta matuojant glutamato įsisavinimą), nei į neurofilamentinio baltymo lygį. Tuo būdu, BDNF veikimas amonio rago kultūrose specifiškai nukreiptas į GABA-erginius neuronus.

20 Pavyzdys: BDNF apsaugo nuo toksinių MPP+ efektu

20.1. Medžiagos ir metodai

20.1.1. Neurotrofinių faktorių poveikio į SH-SV5V ląsteles, apdorotas su MPP+, išmatavimas

SH-SV5V ląsteles pasėjo į lėkšteles su 24 duobelėmis 1×10^5 ląstelių į duobutę tankiu. Praėjus 24 valandoms po sėjos, ląsteles apdorodavo neurotrofiniais faktoriais. Praėjus 24 valandoms po apdorojimo neurotrofiniais faktoriais, ląsteles apdorodavo su MPP+ (10 μ M). Praėjus 48 valandoms po apdorojimo su MPP+, gyvybingas ląsteles suskaičiuodavo panaudodami pašalinimą su tripanu mėlynuoju. Kaip neurotrofiniai faktoriai buvo naudojami mNGF-COS (skiedimas 1:5), hBDNF-COS (skiedimas 1:5), valytas rCNTF iš *E. coli* (15 ng/ml), išvalytas bFGF iš jaučio smegenų (25 ng/ml), rNT3-COS (skiedimas 1:5) ir išvalytas hEGF (25 ng/ml).

20.1.2. Neurotrofinių faktorių poveikio į ventralinių vidurinių smegenų kultūras, apdorotas su MPP+, išmatavimas

Ventralinių vidurinių smegenų disocijavusių ląstelių kultūras ruošė iš E14 žiurkių embrionų pagal nustatytas metodikas (žr. aukščiau 18 skyrių). Praėjus 48 valandoms po kultūrų sukūrimo, jas apdorodavo atitinkamu neurotrofiniais faktoriais, kaip nurodyta. Tarp neurotrofinių faktorių buvo hBDNF (rotoforvalytasis iš CHO-ląstelių, ≤ 50 ng/ml), išvalytas mNGF (50 ng/ml), rNT-3 (COS supernatantai skiesti 1:50), iš jaučio smegenų (10 ng/ml) ir išvalytas rCNTF iš *E. coli* (25 ng/ml). Praėjus 24 valandoms po neurotrofinių faktorių pridėjimo, šios kultūros buvo apdorojamos su MPP+ (1 μ M). Praėjus 48 valandoms po apdorojimo, identifikuodavo TH+ neuronus imunohistochemiškai ir juos suskaičiuodavo. Gauti vidurkiai iš trijų nepriklausomų eksperimentų su trimis mėginiais kiekviename eksperimente. TH+ neuronų kiekis po apdorojimo su

MPP+ atvaizduoti skersinėmis laužytomis linijomis. Atviros linijos atvaizduoja TH+ neuronų kiekį be apdorojimo su MPP+.

20.2. Rezultatai ir aptarimas

Kada atskirai buvo bandomi BDNF, NGF, CNTF, NT-3, bFGF ir EGF sugebėjimai apginti ląsteles nuo 1-metil-4-fenil-piridino (MPP+) toksiškumo, tai eksperimentiniai matavimai mėlynojo tripano pašalinimu, parodė, kad tik BDNF ir NGF žymiai apsaugo nuo MPP+ toksiškumo (XI ir XII lentelės).

XI lentelė

SH-SV5V ląstelių apsaugojimas nuo MPP+ toksiškumo BDNF ir NGF pagalba

Rezultatai: Gyvybingų ląstelių kiekis
(%gyvybingų)

menamas transfekavimas

(COS-Mock) (1:5)	0,4 x 10 ⁴	(5%)
BDNF-COS (1:5)	1,2 x 10 ⁵	(67%)
NGF -COS (1:5)	1,7 x 10 ⁵	(84%)
CNTF	0,6 x 10 ⁴	(14%)
NT-3	0,7 x 10 ⁴	(20%)
bFGF	0,4 x 10 ⁴	(11%)
EGF	0,1 x 10 ⁴	(5%)

XII lentelė

BDNF ir NGF įtaka MPP+ toksiškumui

Apdorojimas		Gyvybingų ląstelių %
COS -MOCK	(1:2)	13
	(1:5)	5
	(1:10)	3
	(1:20)	6
	(1:50)	7
	(1:100)	2

COS BDNF	(1:2)	73
	(1:5)	67
	(1:10)	65
	(1:20)	42
	(1:50)	30
	(1:100)	25
COS NGF	(1:2)	88
	(1:5)	24
	(1:10)	63
	(1:20)	50
	(1:50)	47
	(1:100)	34

Duomenys rodo, kad BDNF daro žymų gynybinį poveikį prieš MPP+ toksiškumą ventralinių vidurinių smegenų kultūrose, tuo tarpu bFGF daro mažesnę efektą (Fig. 38.). Buvo aptikta, kad apdorojimas su MPP+ sumažina 85% teigiamų tirozin-hidroksilazei neuronų kiekį, lyginant su kontrolinėmis kultūromis, ir tik 40% kultūrose, iš anksto apdorotose su BDNF (prieš ekspoziciją su MPP+). Manoma, kad MPP+ yra aktyvus metabolitas toksinui MPTP, kuris, kaip buvo pastebėta, sukelia panašų į Parkinsono sindromą *in vivo*, kas yra priimtas Parkinsono ligos sisteminis modelis. Tuo būdu, BDNF ir NT3 apsauginis poveikis rodo, kad šie junginiai gali būti panaudoti gydant Parkinsono ligą arba išvengiant neurologinio pažeidimo po toksino poveikio.

21. Mikroorganizmų deponavimas

1989 m. rugpjūčio 30 d. JAV kultūrų tipų kolekcijoje, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, buvo deponuoti šie rekombinantinis bakteriofagas ir plazmidinė DNR:

ph BDNF -C-1 40648

λh BDNF -G-1 40649

Šis išradimas neapsiriboja pateiktais aprašyme specifiniais įgyvendinimais. Iš tikrųjų, įvairūs išradimo pagerinimai, papildomai prie aprašytų įkūnijimų, bus akivaizdūs specialistui iš aukščiau pateikto aprašymo ir jį lydinčių piešinių. Tokius patobulinimus apima žemiau einantys apibrėžties punktai. Įvairios cituojamos publikacijos yra įtrauktos į aprašą pilnomis nuorodomis.

APIBRĖŽTIS

1. Rekombinantinės DNR molekulė, besiskirianti tuo, kad turi nukleotidinę seką, koduojančią smegenų neurotrofinį faktorių (BDNF) arba jo subseką, apytiksliai sudarytą bent jau iš 10 nukleotidų.
2. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad smegenų neurotrofinis faktorius, koduojamas nukleotų sekos arba subsekų, yra iš esmės toks, kaip parodyta Fig.1, nuo apytiksliai 167 nukleotido iki apytiksliai 927 nukleotido, o Fig.1 yra šio punkto dalis.
3. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 arba 2 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi kDNR seką.
4. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 arba 2 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi genominės DNR seką.
5. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad turi žmogaus DNR seką arba subseką, iš esmės tokia, kaip parodyta Fig.5, o Fig. 5 yra šio punkto dalis.
6. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 5 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi bent dalį sekos iš esmės tokios, kaip pavaizduota Fig.5, tarp apytiksliai 974 ir 1440 nukleotidų.
7. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 arba 2 punktą, besiskirianti tuo, kad turi kiaulės DNR seką.
8. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 5 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yratokia kaip vektoriuje, pasirinktame iš grupės, susidedančios iš phBDNF-C-1, deponuotame ATCC su numeriu 40648, ir λ hBDNF-G-1, deponuoto ATCC su numeriu 40649.
9. Rekombinantinės RNR molekulė, besiskirianti tuo, kad yra komplementari rekombinantinės DNR molekulei pagal 1 arba 2 punktą.
10. Nukleino rūgšties seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja baltymą, homologinį aminorūgščių sekai, parodytai Fig.1, arba šios sekos daliai.
11. Nukleino rūgšties seka, besiskirianti tuo, koduoja baltymą, iš esmės homologinį aminorūgščių sekai, atvaizduotai Fig.5, arba šios sekos daliai.

12. Nukleino rūgšties seka, besiskirianti tuo, kad ji yra iš esmės homologinė aminorūgšties sekai, atvaizduotai Fig.1, arba jos daliai, galinčiai hibridintis.

13. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 1 arba 2 punktus, besiskirianti tuo, kad nukleino rūgšties seka, koduojanti BDNF baltymą arba jo peptidinį fragmentą, yra reguliuojama antra nukleino rūgšties seka taip, kad smegenų neurotrofinio faktoriaus baltymas arba peptidas ekspresuojasi šeimininke, transformuotame rekombinantinės DNR molekulės.

14. Rekombinantinės DNR molekulė pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra pCMN-pBDNF-1.

15. Nukleino rūgšties vektorius, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal 1 punktą.

16. Rekombinantinis mikroorganizmas, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal 1, 2 arba 12 punktus.

17. Rekombinantinis mikroorganizmas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra bakterija.

18. Rekombinantinis mikroorganizmas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra mielės.

19. Ląstelė, besiskirianti tuo, kad joje yra rekombinantinės DNR molekulė pagal 12 punktą.

20. Ląstelė, besiskirianti tuo, kad joje yra rekombinantinės DNR molekulė pagal 13 punktą.

21. Nukleino rūgšties seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja aminorūgščių seką, iš esmės, sutampančią su seka atvaizduota Fig.1 arba jos subseką, turinčią antigeno determinantą.

22. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad jo aminorūgščių seka iš esmės sutampa su seka, atvaizduota Fig.1, arba turi subseką, turinčią antigeno determinantą.

23. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, iš esmės, sutampančią su seka atvaizduota Fig.1, arba jos subseką, turinčią funkciškai aktyvų peptidą.

24. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad jis turi aminorūgščių seką, iš esmės, sutampančią su atvaizduota Fig.5, arba jos subseką, turinčią antigeno determinantą.

25. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad jis turi aminorūgščių seką, iš esmės, sutampančią su atvaizduota Fig.5, žmogaus BDNF seka, arba jos subseką, turinčią funkciškai aktyvų peptidą.

26. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, iš esmės, sutampančią su atvaizduota Fig.1, turinčią apytiksliai nuo 134 aminorūgšties iki apytiksliai 252 aminorūgšties, arba jos subseką, turinčią antigeno determinantą.

27. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, koduojamą nukleino rūgščių sekos, iš esmės, sutampančią su viščiuko BDNF seka, atvaizduota Fig.5 arba jos subseką, turinčią antigeno determinantą.

28. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, koduojamą nukleino rūgščių sekos, iš esmės, sutampančią su viščiuko BDNF seka, atvaizduota Fig.5, arba jos subseką, turinčią funkciškai aktyvų peptidą.

29. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, koduojamą nukleino rūgščių sekos, iš esmės, sutampančią su žiurkės BDNF seka, atvaizduota Fig.5, arba jos subseką, turinčią antigeno determinantą.

30. Išgrynintas baltymas, besiskiriantis tuo, kad turi aminorūgščių seką, koduojamą nukleino rūgščių sekos, iš esmės, sutampančią su viščiuko BDNF seka, atvaizduota Fig.5, arba jos subseką, turinčią funkciškai aktyvų peptidą.

31. BDNF baltymo arba jo fragmento gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad augina rekombinantinį mikroorganizmą, turintį DNR molekulę pagal 1 punktą, taip, kad šią DNR molekulę ekspresuoja mikroorganizmas, ir išskiria ekspresuotą BDNF baltymą arba fragmentą.

32. BDNF baltymo arba jo fragmento gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad augina rekombinantinį mikroorganizmą, turintį DNR molekulę pagal 2 punktą, taip, kad šią DNR molekulę ekspresuoja mikroorganizmas, ir išskiria ekspresuotą BDNF baltymą arba fragmentą.

33. BDNF baltymo arba jo fragmento gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad (a) auginama rekombinantinį mikroorganizmą, turintį DNR molekulę pagal 13 punktą, tokiose sąlygose, kad ši DNR molekulė ekspresuojasi tokiam mikroorganizme, ir (b) išskiria ekspresuotą BDNF baltymą arba fragmentą.
34. BDNF baltymo arba jo fragmento gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad (a) auginama rekombinantinį mikroorganizmą, turintį DNR molekulę pagal 14 punktą, tokiose sąlygose, kad ši DNR molekulė ekspresuojasi mikroorganizme, ir (b) išskiria ekspresuotą BDNF baltymą arba fragmentą.
35. BDNF baltymo arba jo fragmento gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad (a) auginama rekombinantinį šeimininką, turintį DNR molekulę pagal 2 punktą, tokiose sąlygose, kad ši DNR molekulė ekspresuojasi šeimininke, ir po to (b) ekspresuotą BDNF baltymą arba fragmentą išskiria.
36. Būdas pagal 35 punktą, besiskiriantis tuo, kad šeimininkas tai eukarijotinė ląstelė.
37. Būdas pagal 36 punktą, besiskiriantis tuo, kad šeimininkas tai transgeninis nežmogiškas gyvūnas.
38. Produktas, besiskiriantis tuo, kad jį gauna 31-34 punktuose apibrėžtu būdu.
39. Produktas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame nėra detergento.
40. Produktas pagal 35 arba 38 punktus.
41. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jo darinys, besiskiriantis tuo, kad jis atpažįsta BDNF baltymą, peptidinį fragmentą arba darinį.
- 42.. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jo darinys pagal 41 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra gaunamas būdu, kuriame gyvūnas-šeimininkas yra imunizuojamas BDNF baltymu, peptidiniu fragmentu arba dariniu, kurie (baltymas, fragmentas arba darinys) yra gauti auginant rekombinantinį organizmą, ekspresuojantį rekombinantinį nukleino rūgšties vektorių, koduojantį BDNF baltymą, peptidinį fragmentą arba darinį.
43. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jo darinys pagal 41 punktą, besiskiriantis tuo, kad juos gauna panaudojant nukleino rūgščių vektorių, kuris turi nukleotidinę seką, iš esmės tokią kuri atvaizduota Fig.1.

44. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jo darinys pagal 41 punktą, besiskiriantys tuo, kad jie yra gaunami būdu, kuriame imunizuoja gyvūną-šeimininką išgrynintu BDNF baltymu, peptidiniu fragmentu arba dariniu pagal 23 punktą.

45. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jo darinys pagal 41 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis atpažįsta B5 peptidinį fragmentą, turintį 153-185 liekanas iš aminorūgščių sekos, iš esmės sutampančios su seka, atvaizduota Fig.1.

46. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis labai gryno BDNF baltymo farmakologiškai priimtinaime nešiklyje.

47. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis labai gryno, funkciškai veiklaus BDNF peptidinio fragmento arba darinio farmakologiškai priimtinaime nešiklyje.

48. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis labai gryno, funkciškai veiklaus BDNF peptidinio fragmento arba darinio su antigeniniu determinantu farmakologiškai priimtinaime nešiklyje.

49. Farmacinė kompozicija pagal 47 punktą, besiskirianti tuo, kad BDNF peptidinis fragmentas arba darinys turi bent jau dalį aminorūgščių sekos, iš esmės sutampančios su seka, atvaizduota Fig.1.

50. Farmacinė kompozicija pagal 46 punktą, besiskirianti tuo, kad BDNF baltymas turi aminorūgščių seką, iš esmės sutampančią su seka, atvaizduota Fig.1.

51. Farmacinė kompozicija pagal 46 punktą, besiskirianti tuo, kad BDNF baltymas turi aminorūgščių seką, iš esmės sutampančią su seka, atvaizduota Fig.1, nuo apytiksliai 134 aminorūgšties iki apytiksliai 252 aminorūgšties.

52. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis produkto pagal 35 arba 38 punktus farmakologiškai priimtinaime nešiklyje.

53. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis produkto pagal 39 punktą farmakologiškai priimtinaime nešiklyje.

54. Farmacinė kompozicija pagal 50 punktą, besiskirianti tuo, kad ji gali padidinti neuronų augimą.

55. Farmacinė kompozicija pagal 50 punktą, besiskirianti tuo, kad ji gali padidinti neuronų išlaikymą.

56. Farmacinė kompozicija pagal 50 punktą, besiskirianti tuo, kad ji sugeba palaikyti diferencijuotą ląstelės funkciją.

57. Farmacinė kompozicija pagal 50 punktą, besiskirianti tuo, kad baltymas, peptidas arba darinys yra gliukozilinti.

58. Farmacinė kompozicija pagal 50 punktą, besiskirianti tuo, kad baltymas, peptidas arba darinys nėra gliukozilinti.

59. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis antikūno, kuris atpažįsta BDNF baltymą arba peptidinį fragmentą arba jo darinį.

60. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis derinio, susidedančio iš labai gryno BDNF baltymo arba jo peptidinio fragmento arba derinio ir antro agento.

61. Farmacinė kompozicija pagal 60 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytas darinys pasižymi sinergizmu BDNF funkcinio aktyvumo atžvilgiu.

62. Farmacinė kompozicija pagal 60 punktą, besiskirianti tuo, kad antrasis agentas yra nervinis augimo faktorius.

63. Farmacinė kompozicija pagal 60 punktą, besiskirianti tuo, kad antrasis agentas yra kitas BDNF/NGF šeimos narys.

64. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus kiekis baltymo arba peptido, kurie apima : (a) pirmąją aminorūgščių seką, homologinę dviems skirtingiems žinomiems BDNF/NGF šeimos nariams, ir (b) antrąją aminorūgščių seką, kuri nėra homologinė nei BDNF, nei NGF, arba jų darinio.

65. Nukleino rūgšties molekulė, turinti bent jau 10 nukleotidų, iš esmės sutampančių su pavaizduotais Fig.5, skirta nervų sistemos ligų arba sutrikimų diagnozavimui, sudarant kontaktą tarp audinio ir pažymėtos, nustatymui užtikrinti, nukleininės rūgšties molekulės, sąlygose kuriose gali vykti hibridizacija, ir nustatant įvykusią hibridizaciją.

66. Nukleino rūgšties molekulė, turinti bent jau 10 nukleotidų, iš esmės sutampančių su pavaizduotais Fig.1, skirta nervų sistemos ligų arba sutrikimų diagnozavimui, sudarant kontaktą tarp RNR, surinktos iš audinio, arba sudarant kontaktą tarp kDNR, pagamintos iš RNR, surinktos iš audinio, ir nustatymui

užtikrinti pažymėtos šios nukleino rūgšties molekulės sąlygose, kuriose gali vykti hibridizacija, ir nustatant įvykusią hibridizaciją.

67. Nukleino rūgšties molekulė pagal 65 arba 66 punktą, skirta nervų sistemos ligų arba sutrikimų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro navikai, degeneracinės ligos, tinklainės ligos ir sensorinių neuronų ligos, diagnozavimui.

68. Nukleino rūgšties molekulė pagal 65 arba 66 punktą, skirta neuroblastomos diagnozavimui.

69. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, skirtas nervų sistemos ligų arba sutrikimų diagnozavimui, eksponuojant audinį su aptikimo užtikrinimui pažymėta antikūno molekule, sugebančia susijungti su šiuo baltymu, fragmentu arba dariniu, sąlygose, kuriose gali vykti šis susijungimas, ir nustatant susijungimą.

70. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 69 punktą, skirtas nervų sistemos ligų arba sutrikimų diagnozavimui atliekamam *in vivo*.

71. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 69 punktą, skirtas nervų sistemos ligų arba sutrikimų diagnozavimui atliekamam *in vitro*.

72. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 69 punktą, skirtas nervų sistemos ligų arba sutrikimų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro navikai, degeneracinės ligos, tinklainės ligos ir sensorinių neuronų ligos, diagnozavimui.

73. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 71 punktą, skirtas sutrikimo, tokio kaip įgimtas tinklainės sutrikimas, diagnozavimui.

74. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 69 punktą, skirtas neuroblastomos diagnozavimui.

75. BDNF baltymas, jo funkciškai aktyvus peptidinis fragmentas arba darinys, skirtas naudoti kaip vaistas nervų sistemos ligų arba sutrikimų gydymui.

76. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 75 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas ligų arba sutrikimų, tokių kaip sutrikimai, sukelti toksinio agento poveikio, gydymui.

77. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 75 punktą, skirtas ligų arba sutrikimų, sukeltų maisto trūkumo, gydymui.

78. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 75 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas nervų sistemos ligų arba sutrikimų, tokių kaip degeneracinės ligos, gydymui.

79. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 78 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas degeneracinių ligų, tokių kaip tinklainės ligos, gydymui.

80. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 79 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas tinklainės ligų, sukeltų pažeidus regos nervą, gydymui.

81. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 78 punktą, skirtas degeneracinių ligų, tokių kaip "Parkinsono-plius" sindromas, gydymui.

82. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 78 punktą, skirtas degeneracinių ligų, tokių kaip Alchaimerio liga, gydymui.

83. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 78 punktą, skirtas degeneracinių ligų, tokių kaip Hantingtono chorėja, gydymui.

84. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 78 punktą, skirtas degeneracinių ligų, tokių kaip Parkinsono liga, gydymui.

85. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 81 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas "Parkinsono-plius" sindromo, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš progresyvinio paralyžiaus (Stilo-Ričardsono-Olševskio sindromas) olivopontocerebralinės atrofijos, Šai-Dregerio sindromo (daugybė sisteminė atrofija) ir Guamanskio parkinsoninės demencijos komplekso, gydymui.

86. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 84 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas tuo atveju, kai Parkinsono ligos simptomai yra sukelti toksinio agento.

87. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 75 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas nervų sistemos ligų arba sutrikimų, tokių kaip nervų sistemos pažeidimai, gydymui.

88. BDNF baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys, pagal 85 punktą, skirtas naudoti kaip vaistas nervų sistemos pažeidimų, sukeltų tokių atvejų, kaip trauma, operacija, infarktas arba piktybinis darinys, gydymui.

89. BDNF baltymo, jo peptidinio fragmento arba darinio darinys su antruoju agentu, skirtas nervų sistemos ligų arba sutrikimų gydymui.

90. Derinys pagal 89 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi sinergizmu BDNF funkcinio aktyvumo atžvilgiu.

91. Derinys pagal 89 punktą, besiskiriantis tuo, kad antrasis agentas yra nervo augimo faktorius.

92. Derinys pagal 89 punktą, besiskiriantis tuo, kad antrasis agentas yra kitas BDNF/NGF šeimos narys.

93. Derinys pagal 89 punktą, skirtas sutrikimų, sukeltų toksinio agento poveikio, gydymui.

94. Derinys pagal 89 punktą, skirtas ligų ir sutrikimų, tokių kaip degeneracinės ligos, gydymui.

95. Derinys pagal 94 punktą, skirtas degeneracinių ligų, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro Alchaimerio liga, Hantingtono chorėja, tinklainės ligos ir Parkinsono liga, gydymui.

96. Derinys pagal 89 punktą, skirtas ligų arba sutrikimų, apimančių nervų sistemos pažeidimus, gydymui.

97. Derinys pagal 89 punktą, skirtas nervų sistemos pažeidimų, sukeltų tokių atvejų kaip trauma, chirurginė operacija, infarktas arba piktybinis darinys bei toksinis agentas, gydymui.

98. Derinys pagal 89 punktą, skirtas ligų arba sutrikimų, apimančių sensorinių neuronų ligas arba sutrikimus, gydymui.

99. Derinys pagal 89 punktą, skirtas ligų arba sutrikimų, apimančių įgimtą tinklainės ligą, gydymui.

100. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse BDNF kiekio padidavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia kainine rūgštimi arba giminingu jai junginiu.

101. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse BDNF kiekio padidinimo būdas, besikiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia ne NMDA receptoriaus antagonistu.

102. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse BDNF kiekio padidinimo būdas, besikiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia vaistais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš karbacholio arba bradikinino.

103. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse NGF kiekio padidinimo būdas, besikiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia kainine rūgštimi arba giminingu jai junginiu.

104. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse NGF kiekio padidinimo būdas, besikiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia ne NMDA receptoriaus antagonistu.

105. Ekspresuojamo nervų sistemos ląstelėse NGF kiekio padidinimo būdas, besikiriantis tuo, kad nervų sistemos ląsteles veikia vaistais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš karbacholio, histamino arba bradikinino.

106. Dopaminerginių neuronų išgyvenimo gerinimo būdas, besiskiriantis tuo, kad neuronus veikia efektyviais BDNF kiekiais.

107. Cholinerginių neuronų išgyvenimo gerinimo būdas, besiskiriantis tuo, kad neuronus veikia efektyviais BDNF kiekiais.

108. Būdas pagal 105 punktą, besiskiriantis tuo, kad cholinerginiai neuronai yra pagrindiniai priekinių smegenų cholinerginiai neuronai.

109. Būdas pagal 105 punktą, besiskiriantis tuo, kad cholinerginiai neuronai yra pertvariniai cholinerginiai neuronai.

110. Astroglijos ląstelių proliferacijos slopinimo būdas, besiskiriantis tuo, kad astroglijos ląsteles veikia efektyviu BDNF kiekiu.

111. Gama-aminosviesto rūgšties įsisavinimo neuronuose inhibavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad neuronus veikia efektyviu BDNF kiekiu.

112. NGF receptorių ląstelių paviršiuje ekspresijos reguliavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad ląsteles veikia efektyviu BDNF kiekiu.

113. Aktyvaus BDNF iš mažiau aktyvaus molekulinio pirmtako gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad pirmtako molekulę veikia efektyviu endoproteinazės Arg-C kiekiu.

114. Būdas pagal 111 punktą, besiskiriantis tuo, kad efektyvus endoproteinazės Arg-C kiekis yra 0,1 vieneto mikrolitre.

115. Aktyvi BDNF forma, besiskirianti tuo, kad ji yra gauta pagal 111 arba 112 punktų būdą.

FIG. 1

	AAACCGGG	8
CACCAAAGATTCCCCCTACCCCTTCTTTTGACCAAAGGGAACGTGAAAAATAATAGAGTCTGGGGATTTGGGGCC		84
GAAGTCTTCCCCAGAGCAGCTGCCTTGATGTTTACTTTGACAAGTAGTACTGAAAAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTG		166
1	10	20
Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala Ala Pro		
ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GTT ATT TCA TAC TTC GGT TGC ATG AAG GCT GCC CCC		226
	30	40
Met Lys Glu Ala Asn Val Arg Gly Gln Gly Ser Leu Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His		
ATG AAA GAA GCC AAC GTC CGA GGA CAA GGC AGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG ACC CAT		286
	50	60
Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Ser Ser		
GGG ACT CTG GAG AGC GTG AAT GGG CCC AAG GCA GGT TCA AGA GGC CTG ACA TCG TCG TCA		346
	70	80
Ser Ser Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln		
TCG TCG TCG TTG GCG GAC ACT TTT GAA CAC GTG ATC GAG GAG CTG TTG GAC GAG GAC CAG		406
	90	90
Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Met Tyr Thr Ser Arg Val Met		
AAA GTT CGG CCC AAT GAG GAA AAC AAT AAG GAC GCG GAC ATG TAT ACG TCC CGA GTC ATG		466
	110	120
Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys Asn		
CTC AGC AGT CAA GTG CCT TTG GAG CCT CCT CTT CTC TTT CTG CTG GAG GAA TAC AAA AAT		526
	130	140
Tyr Leu Asp Ala Ala <u>Asn Met Ser</u> Met Arg Val Arg Arg <u>His Ser Asp Pro Ala Arg Arg</u>		
TAC CTG GAT GCT GCA AAC ATG TCC ATG AGG GTC CGG CGC CAC TCG GAC CCC GCC CGC CGC		586
	150	160
<u>Gly Glu Leu Ser Val</u> Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp <u>Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr</u>		
GGG GAG CTG AGC GTG TGC GAC AGC ATT AGC GAG TGG GTG ACG GCG GCG GAT AAA AAG ACG		646
	170	180
<u>Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly</u>		
GCA GTG GAC ATG TCG GGT GGC ACG GTC ACG GTC CTC GAA AAA GTC CCC GTC TCG AAA GGC		706
	190	200
<u>Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr</u> Lys Cys Asn Pro Met <u>Gly Tyr Thr Lys Glu Gly</u>		
CAA CTG AAG CAG TAC TTC TAC GAG ACC AAG TGC AAT CCT ATG GGG TAC ACA AAG GAG GGC		766
	210	220

FIG.1 (Tęsinys)

[illegible]

FIG. 2

HSDPARRGELSVCDSEVVTAAADKKTAVDMSSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNP
 SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVVV..GDKTTATDIKGKEYMYLGEVNINNSVFKQYFFETKCRD
 SSSHPVFHRGEFSVCDSISVVV..GDKTTATDIKGKEYMYLGEVNINNSVFKQYFFETKCRD
 SSTHPVFHMGFSVCDSVSVVV..ADKTTATDIKGKEYTVLAEVNNNNVFKQYFFETKCRD
 SSTHPVFHMGFSVCDSVSVVV..GDKTTATDIKGKEYTVLAEVNINNSVFRQYFFETKCRD
 TAPVLRHGEFSVCDSVSMVV..GDKTTATDIKGKEYTVLGEVNINNNVFKQYFFETKCRD
 EDHPVHNLGEHSVCDSVSAVV...TKTTATDIKGNTVTVMENVNLNKKVYKQYFFETKCKN

kiaulės BDNF
 žmogaus NGF
 jaučio NGF
 kiaulės NGF
 pelės NGF
 viščiuko NGF
 gyvatės NGF

HGYTKEGCRGIDKRHVNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGVRFIRIDTSCVCILTIKGR
 PNPVDSGCRGIDSKHVNSYCTTHTFVKALTMGKQ.AAVRFIRIDTACVCLSRKAVRRA
 PNPVDSGCRGIDAKHVNSYCTTHTFVKALTMGKQ.AAVRFIRIDTACVCLSRKTGQRA
 PSPVESGCRGIDSKHVNSYCTTHTFVKALTTDKQ.AAVRFIRIDTACVCLNRKAARRG
 SNPVESGCRGIDSKHVNSYCTTHTFVKALTTDEKQ.AAVRFIRIDTACVCLSRKATRRG
 PRPVSSGCRGIDAKHVNSYCTTHTFVKALTMGKQ.AAVRFIRIDTACVCLSRKSGRP
 PNPEPSGCRGIDSSHVNSYCTETDTFIKALTMGKQ.ASVRFIRIETACVCVITKKKGK

kiaulės BDNF
 žmogaus NGF
 jaučio NGF
 kiaulės NGF
 pelės NGF
 viščiuko NGF
 gyvatės NGF

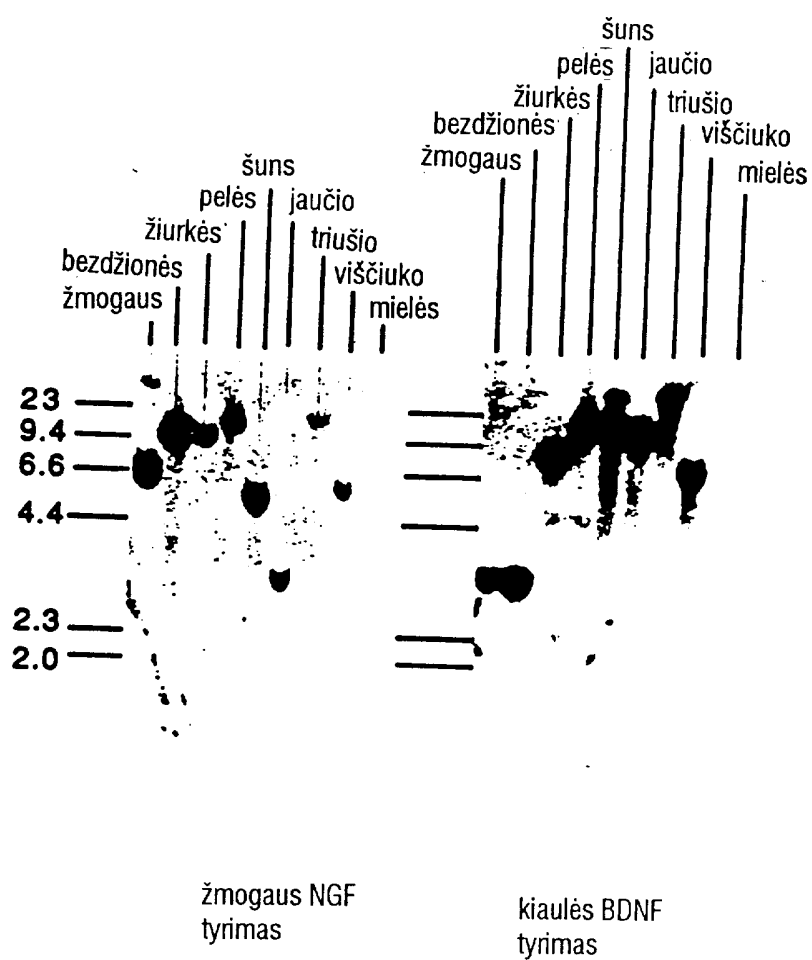


FIG. 3

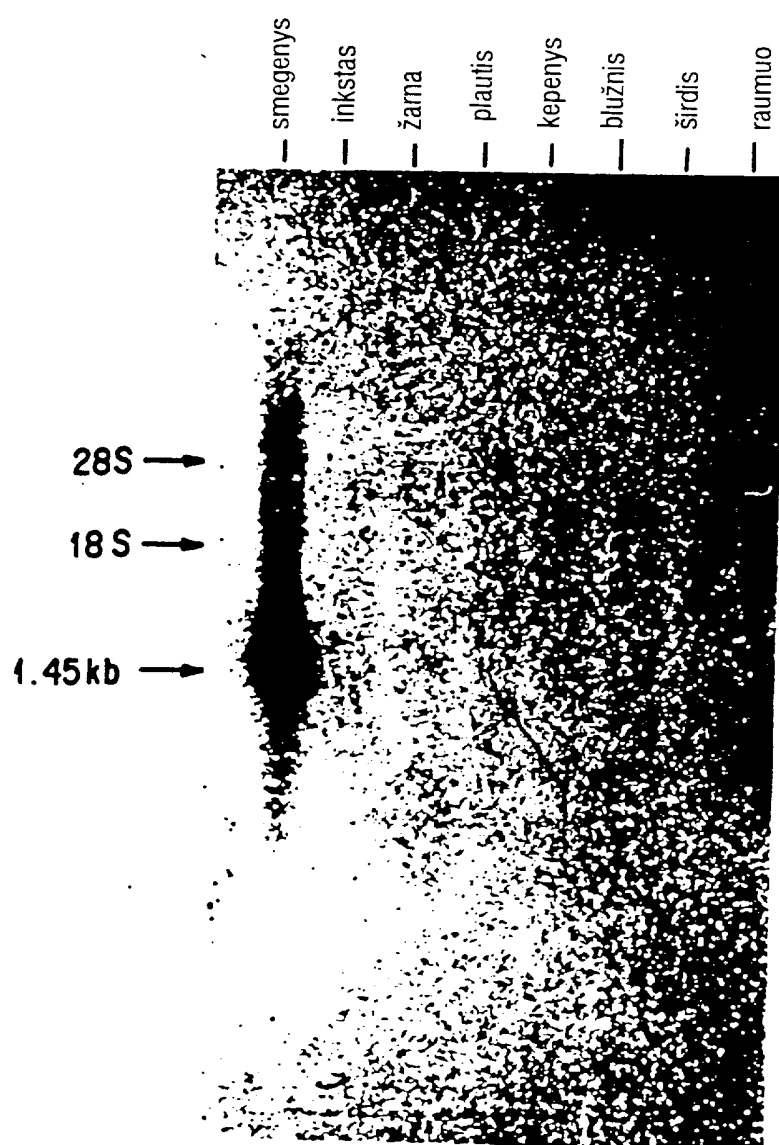


FIG. 4

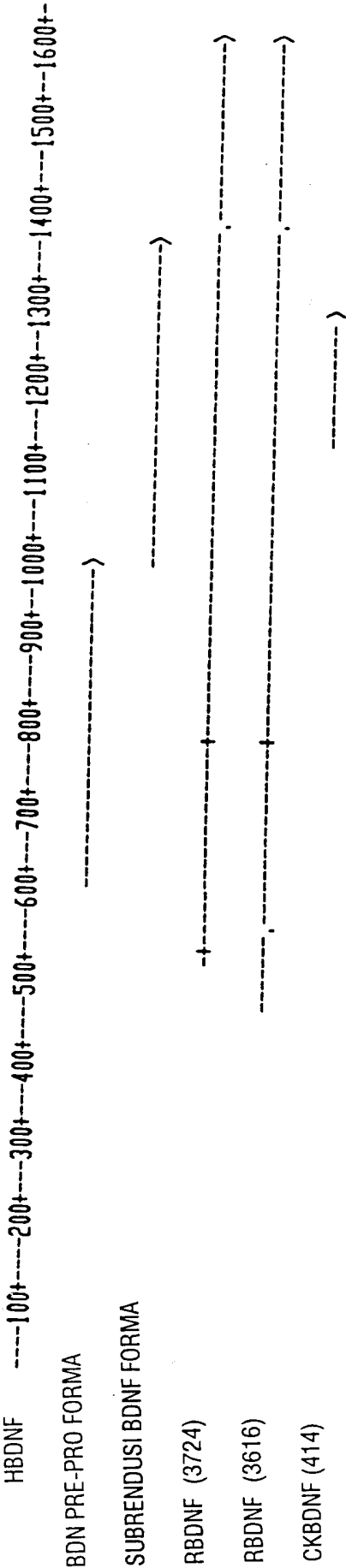


FIG. 5

[illegible][illegible][illegible]

GTTCCAGGATTCACCTTCTCTCTTGACTTCGGTGTAAACGTCGAACCAATCTTCGGTAGATTAGAGTCCAAATACGATCTAGAACCCCGTTGTGAGCTAGAGACCAATATATTTT
 ZMOGAUS : CCACATACACGACACACTACTGACACTGATTTGTGCTGTCGACGCTGGAGTTTATCACCAGAGATAAAAAACCTTGACCCCTCGAGAAATGGCTTGGAAATACAAATCAGATGGGCCACATGGCATCCCGG
 GGTGATGTCGTGTGATGACTGTGACTAAACACAGACCAAGCTCGACCTCAAAATAGTGGTTCTGATATTTTTTGGAACTGGGAGCGCTTACCGGACCTTAAATGTTAGCTACCCGGGTGATCCGTAGGGCC

ŽŪRKĖS 4
KIAULĖS 39

...CA...GGG...G.G...AAAAA.T.GA.T.TG..G.....~..A..I.....>
.....-G.A.T.I.....-C>

[illegible]

FIG.5 (Tęsinys)

[illegible][illegible]

FIG.5 (Tésiny)

HBDNF

ZMOGAUS
 TGT ACA TTG ACC ATT AAA AGG GGA AGA TAGTGGATTATGTTGATAGATTAGATTATATTGAGACAAAAATTACTATTGTTATATATACATAAACAGGGTAAATTATTTCAGTTAAGAAA
 ACA TGT AAC TGG TAA TTT TCC CCT TCT ATCACCCTAAATACACACATATCTATCTAATATATACCTCTGTTTTAATAGATAAACATATATATGATTGTCCCAITTAATAGTCAATTCITTT
 Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
 _____b____SUBRENDUSI BDNF FORMA _____b____b____
 JHBNF

ZIŪRKĒS 807 ... C... ..
A

FIG.5 (Tésiny)

FIG.5 (Təşinys)

XbaI
5'-ATAATCTAGATGACCATCTTTCCTT-3'
Met Thr Ileu PheLeu

IleLysArgGlyArgEND
3'-TAATTCCTCCCTTCTATCAGATCTAATA-3'
XbaI

1. Kiaulės genominės DNR reakcija su PCR
2. Produkto perskėlimas XbaI.
3. 765bp fragmento įjungimas į pCMV1.

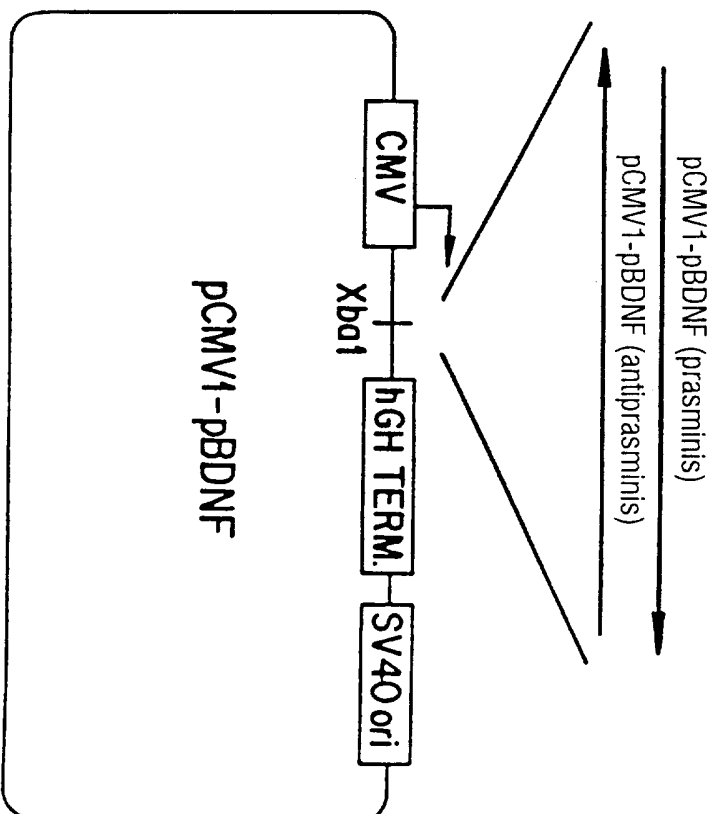
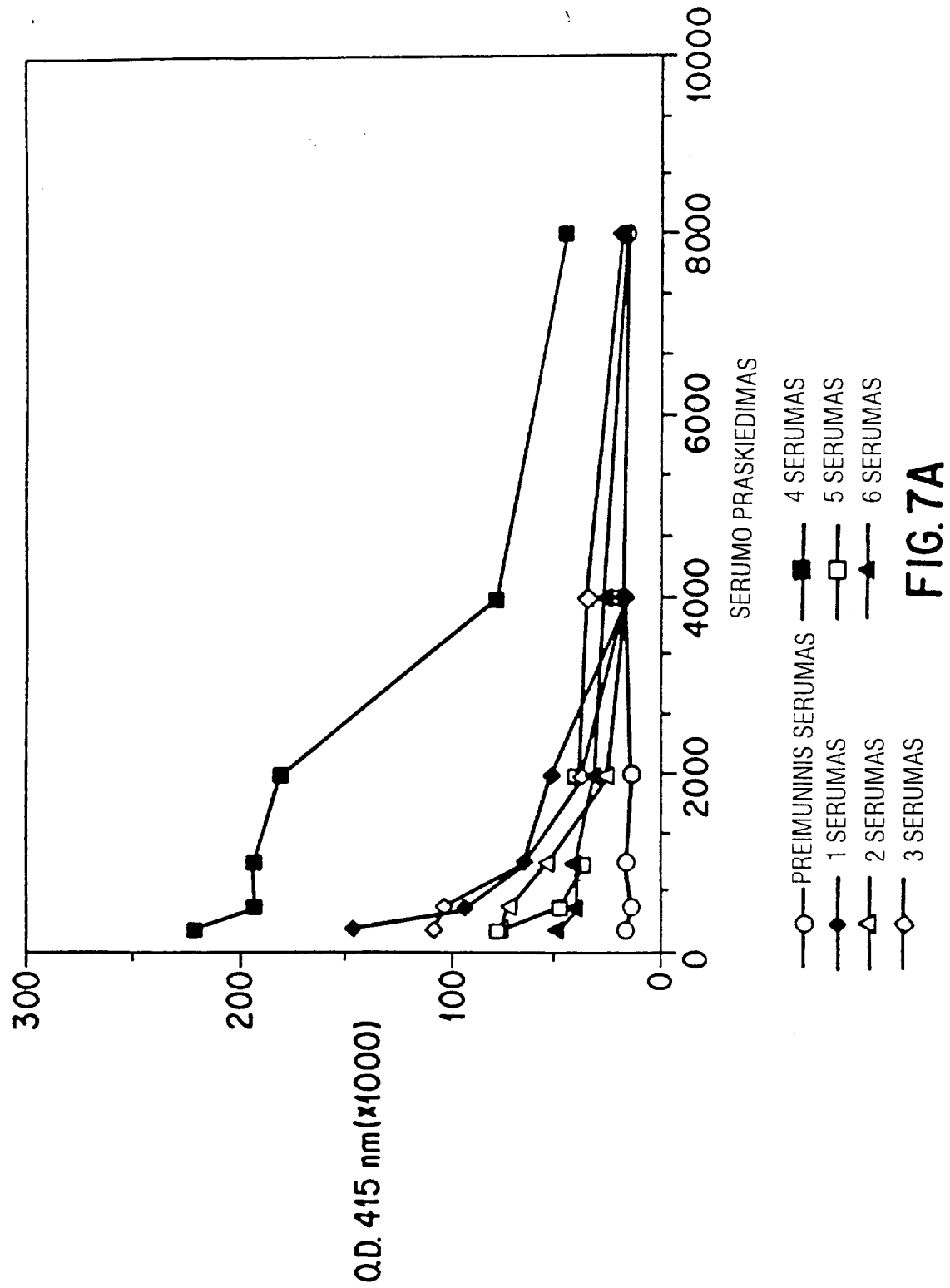


FIG. 6



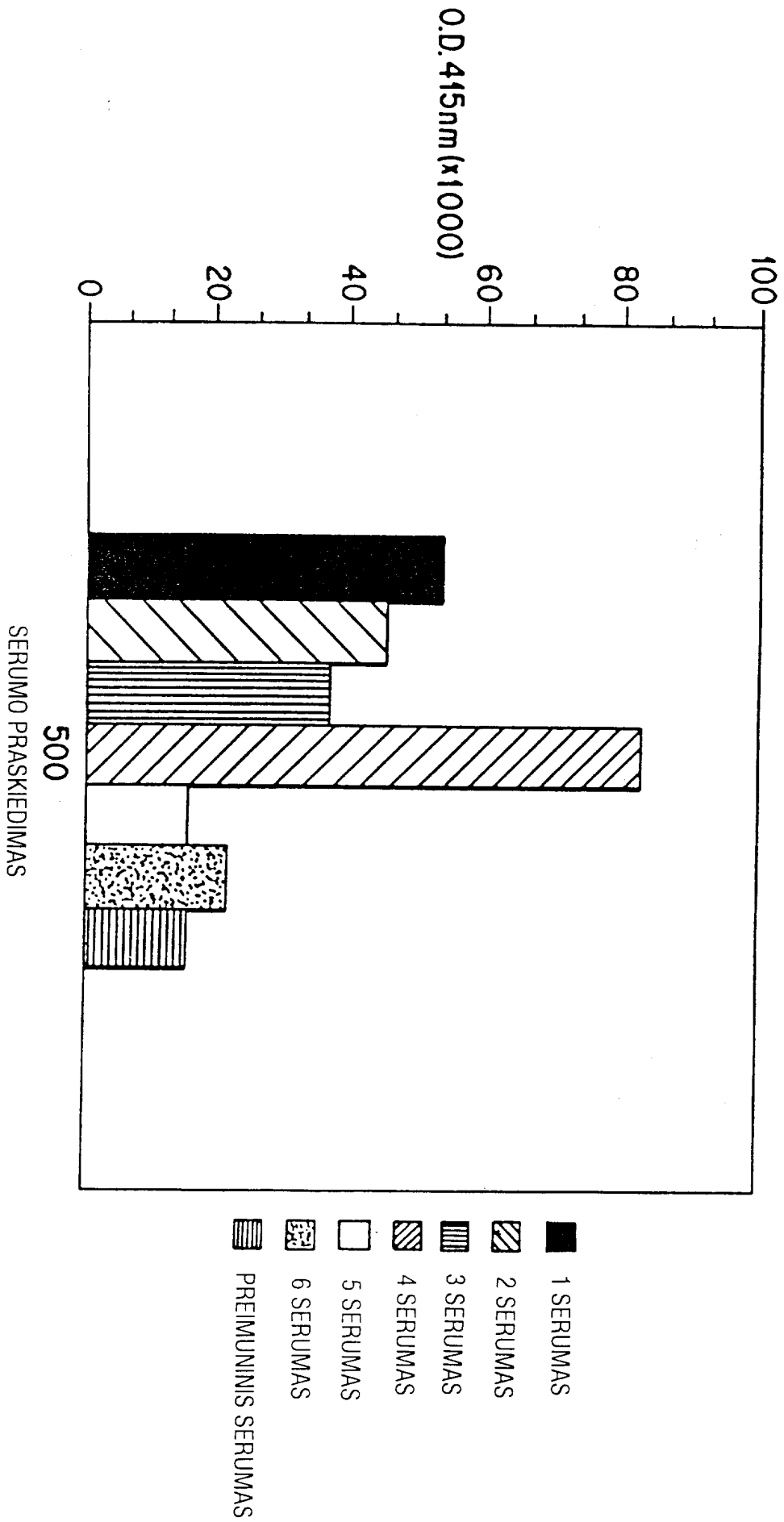


FIG. 7B

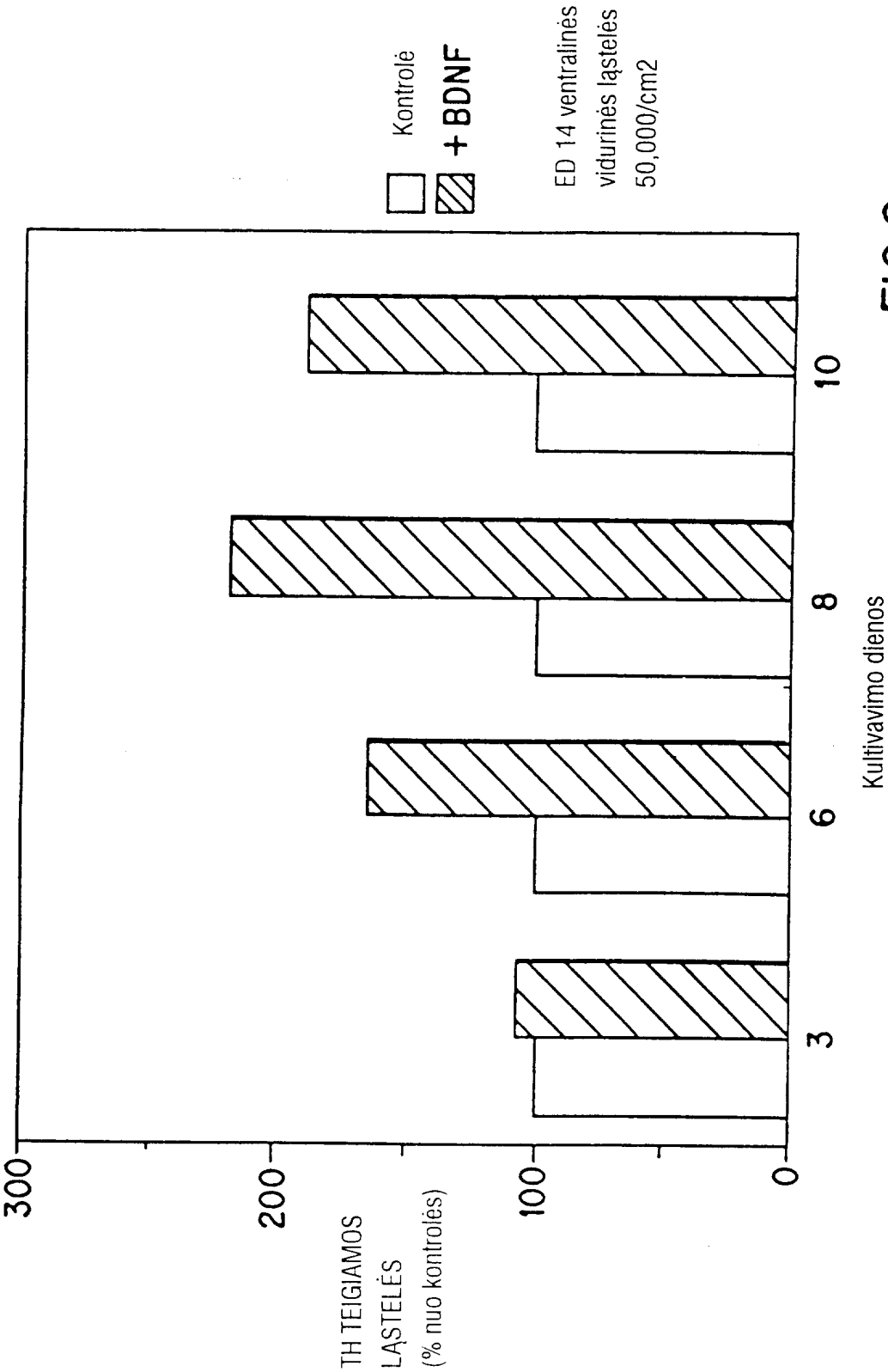


FIG. 8

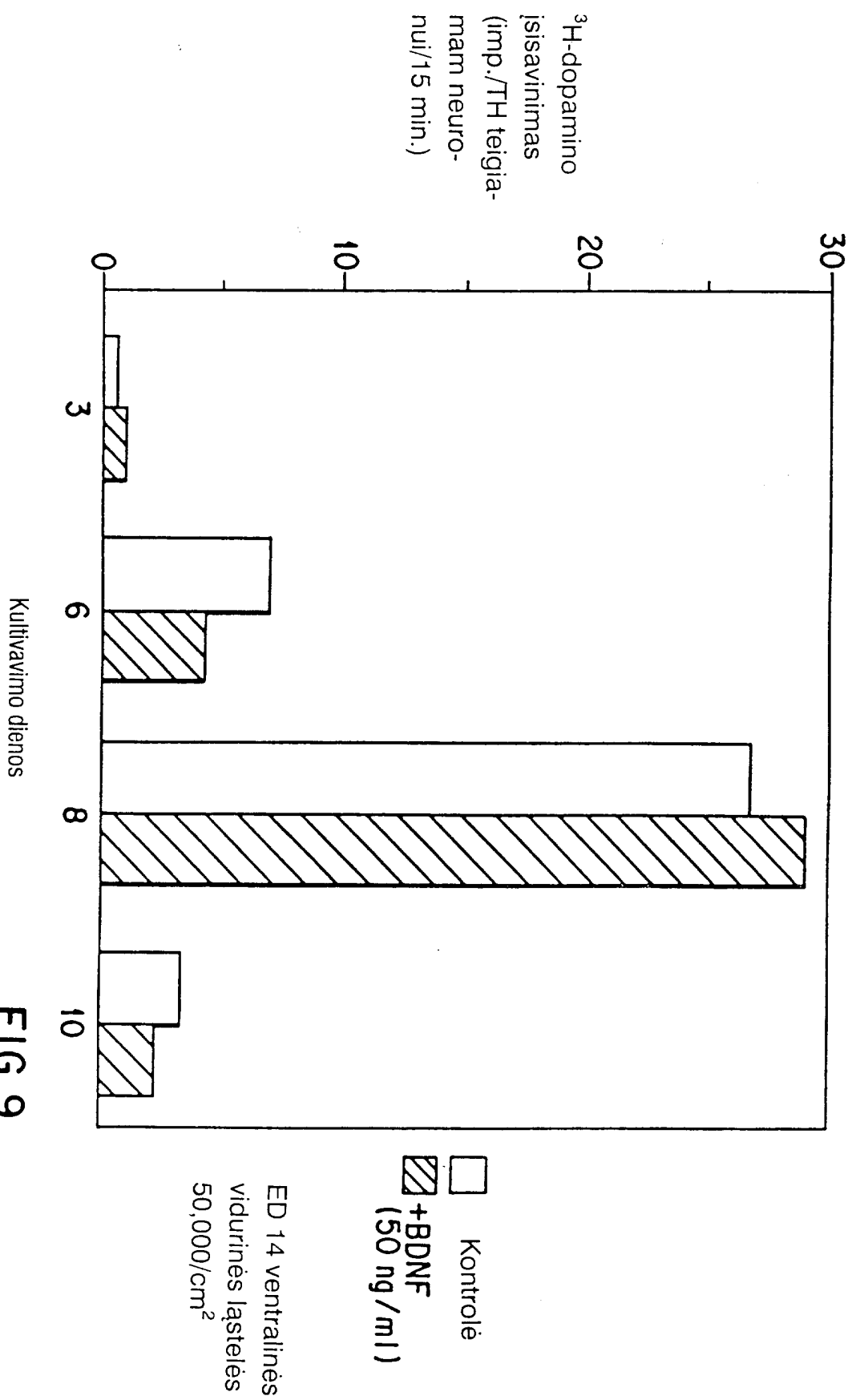


FIG. 9

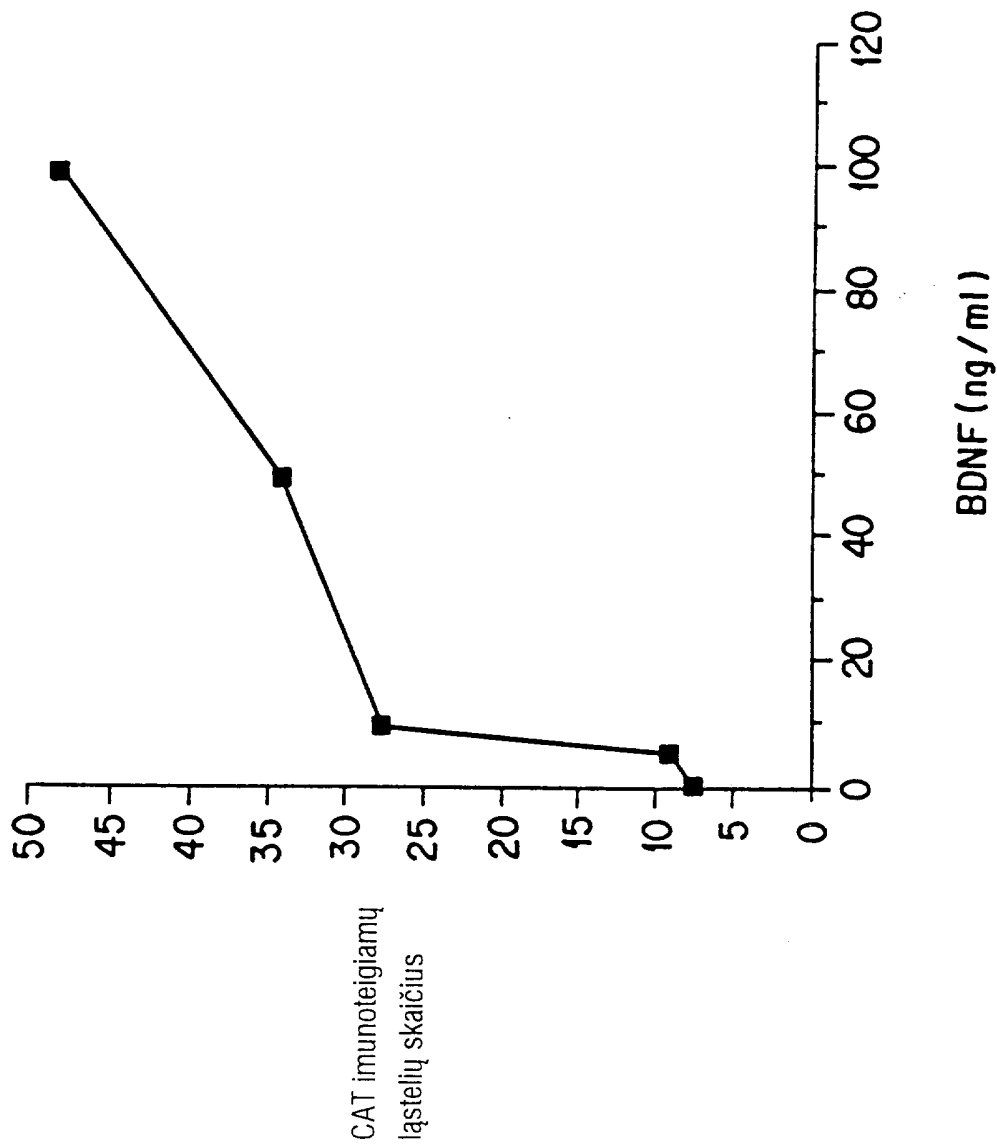


FIG. 10A

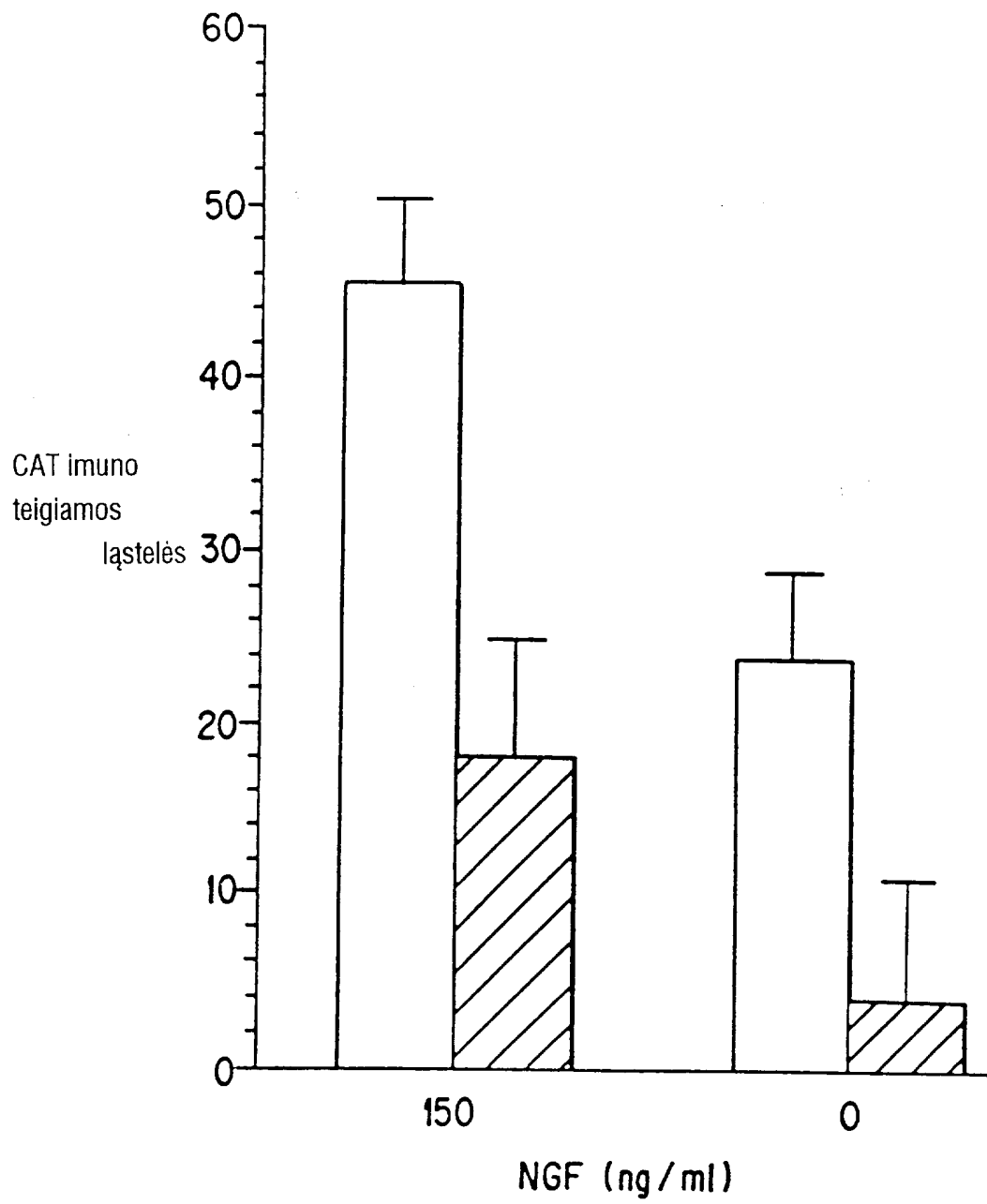


FIG. 10B

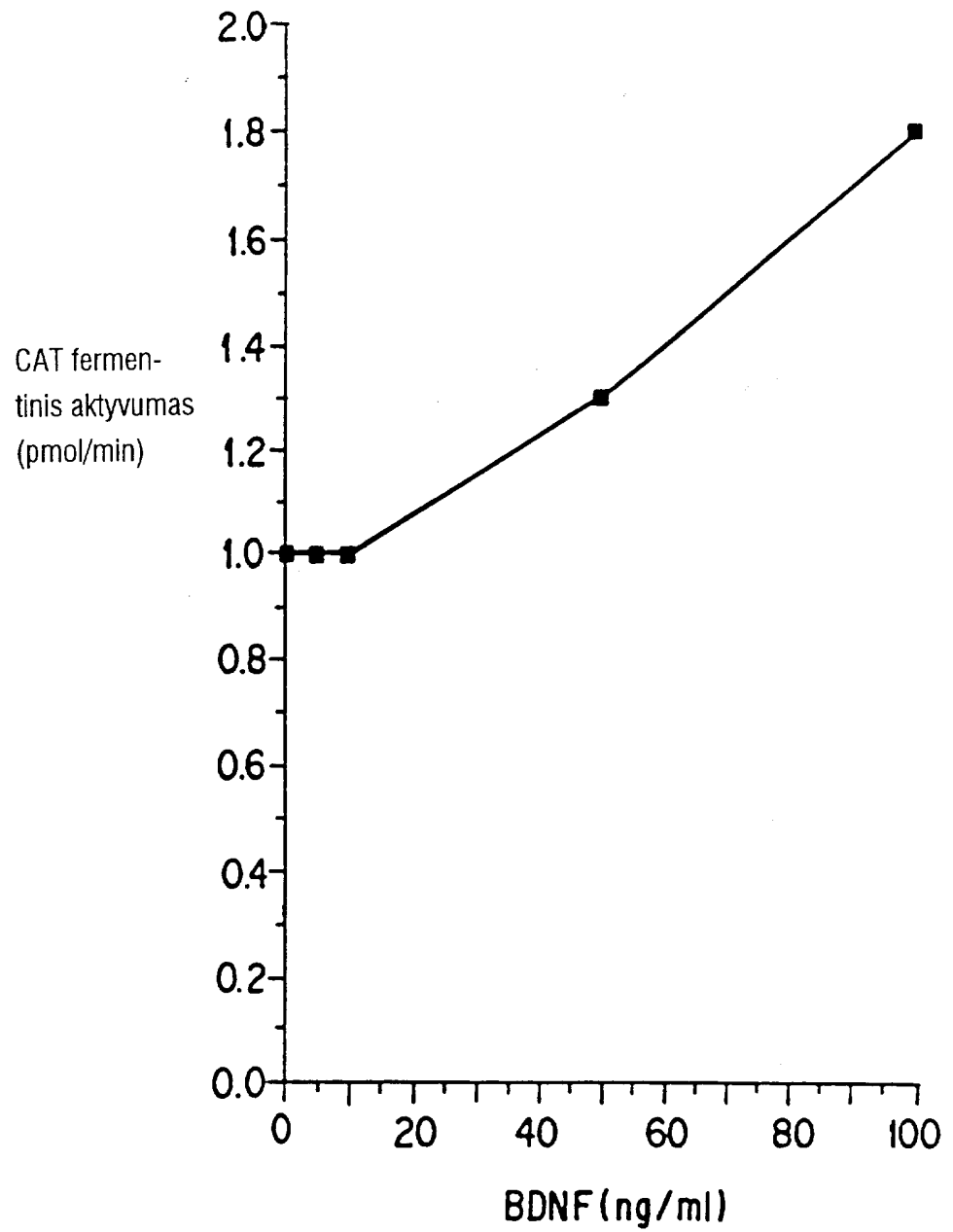


FIG.11

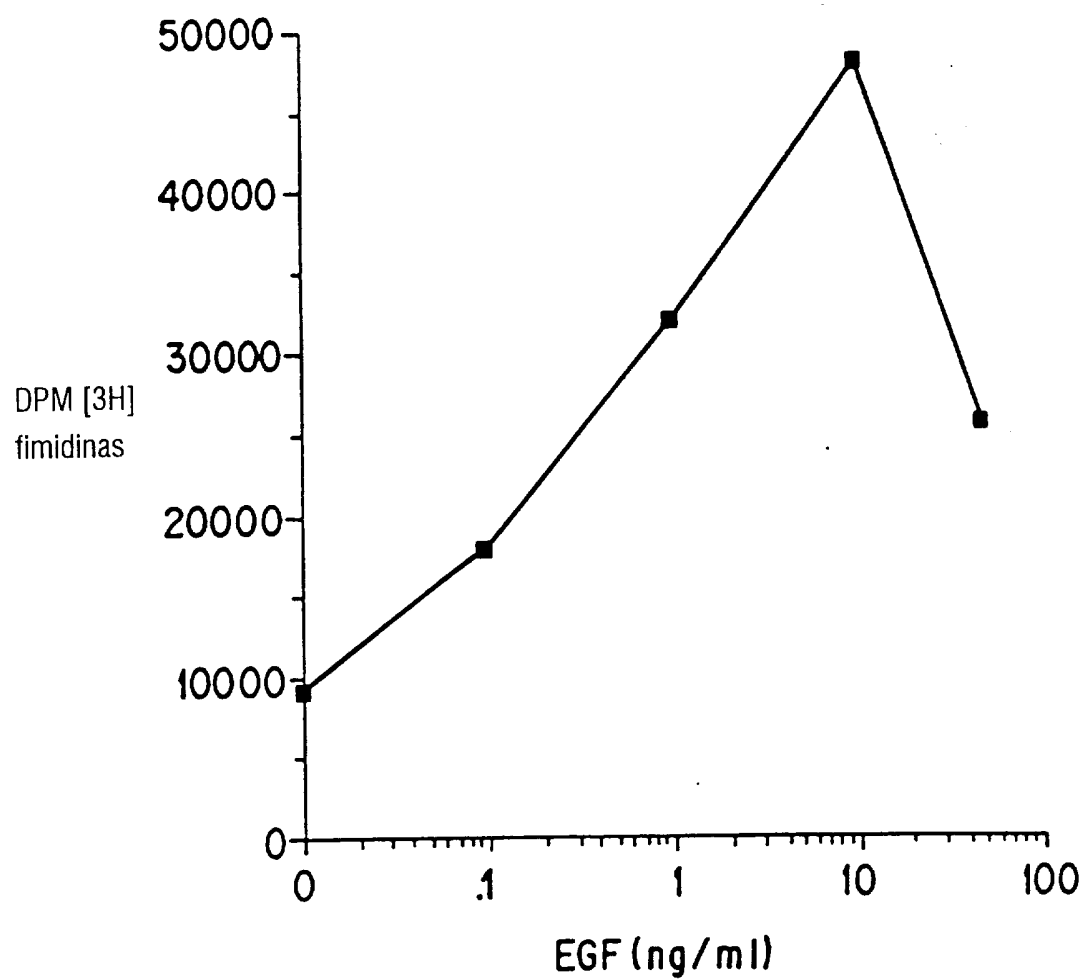


FIG. 12A

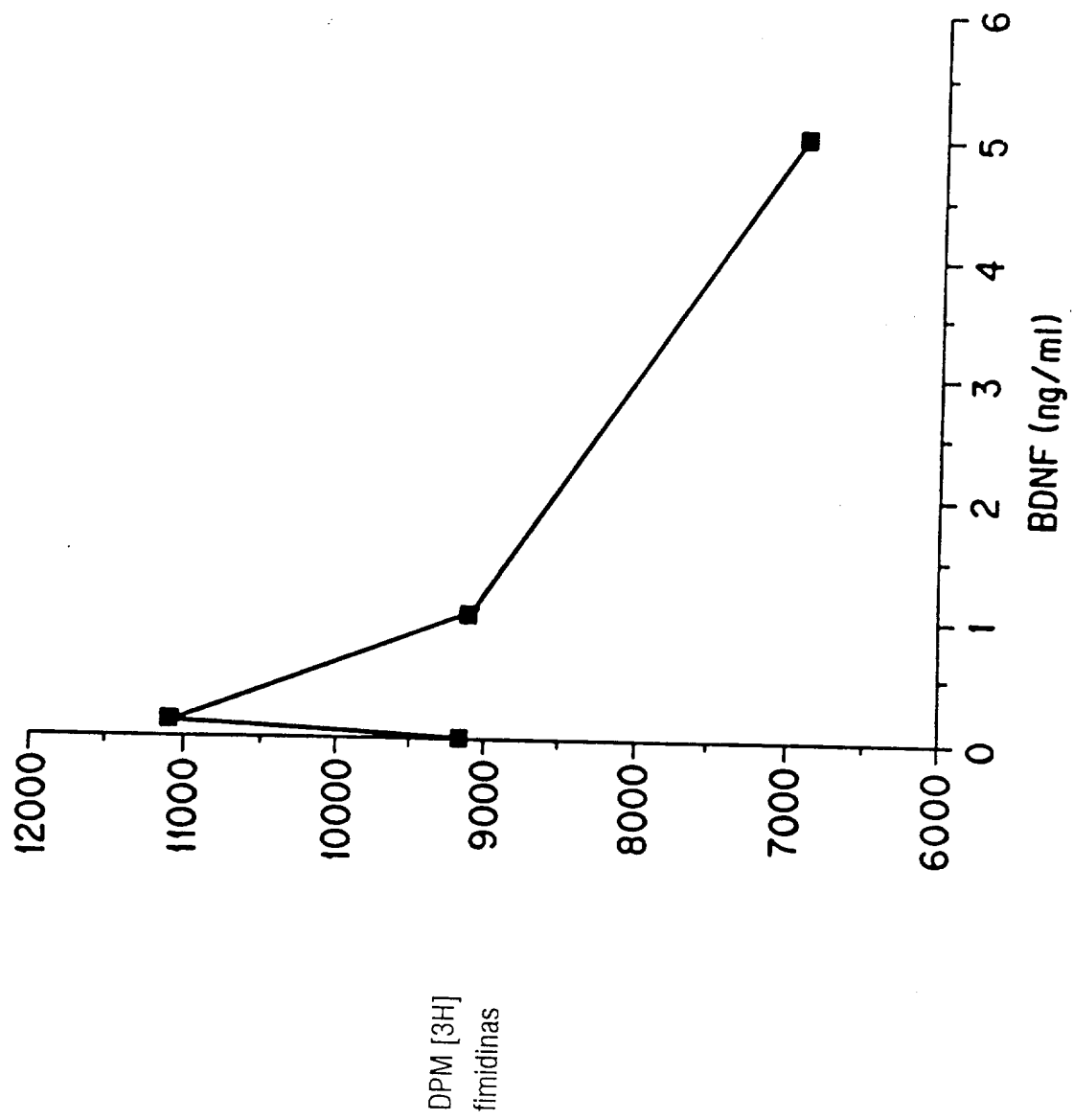


FIG. 12B

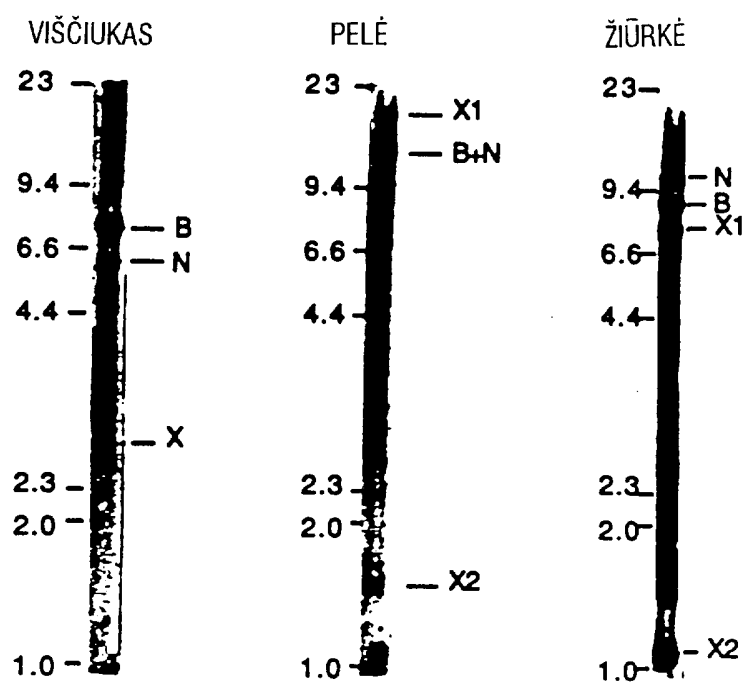


FIG. 13

M3/4 GAT GAC AAA CAC TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACT TCG CAA ACC
 Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr

MuNGF Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr

HuBDNF Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser

M3/4 TAT GTC CGA GCA CTG ACT TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC
 Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly

MuNGF Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp --- Glu Lys Gln Ala Ala

HuBDNF Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly

M3/4 TGG CGC TGG ATA CGA ATA GAC ACT TCC TGT GTG TGT GCC TTG
 Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu

MuNGF Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu

HuBDNF Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu

M3/4 TCG AGA AAA ATT GGA AGA ACA TGA ATT GGC ATC TGT CCC CAC
 Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End

MuNGF Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Gly END

HuBDNF Thr Ile Lys Arg Gly Arg END

M3/4 ATA TAA ATT GAT TGG ACT NNA AAT TAT ATG ATA TGC ATG TAG

M3/4 CAT ATA AAT GTT TAT ATT TTT ATA TAT TAT AAG TTG ACC TCT

M3/4 ATT TAT TAA ACT TCA GCA ACC CTT

FIG. 14

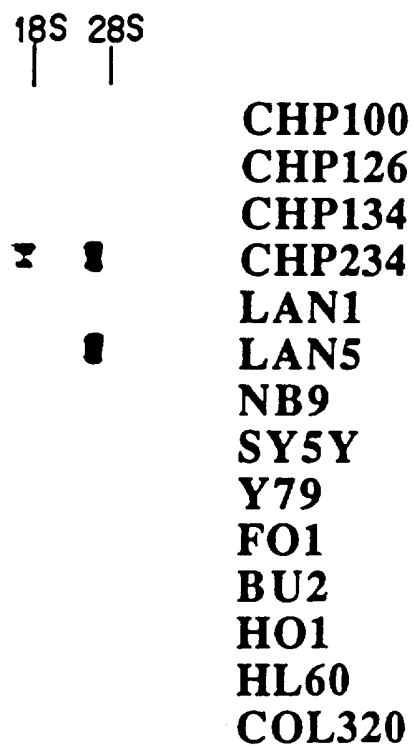


FIG. 15



FIG. 16A

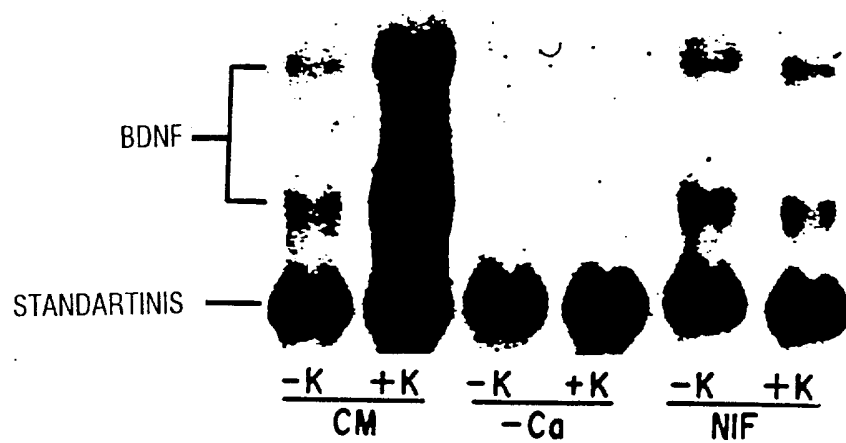


FIG. 16B

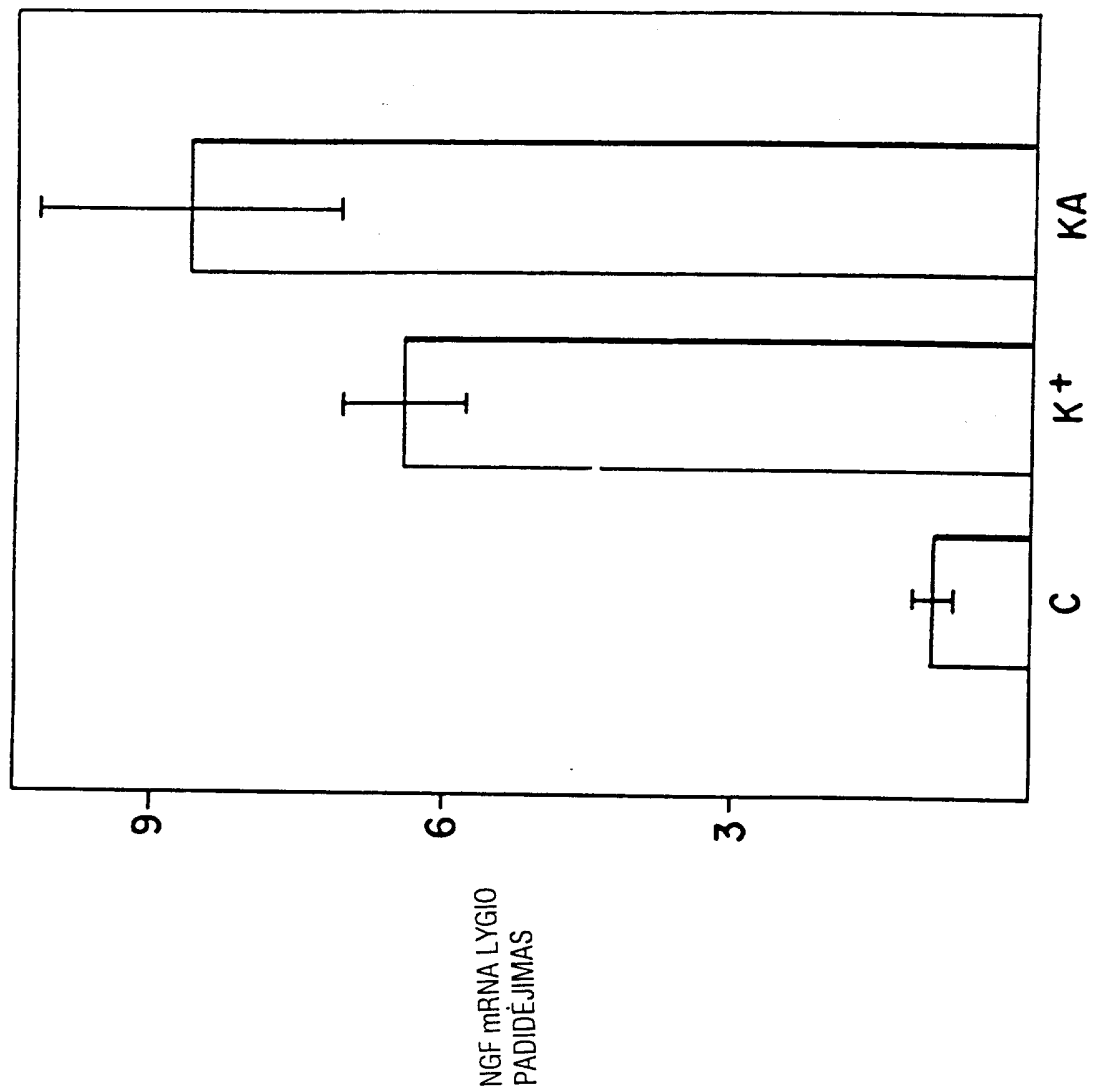
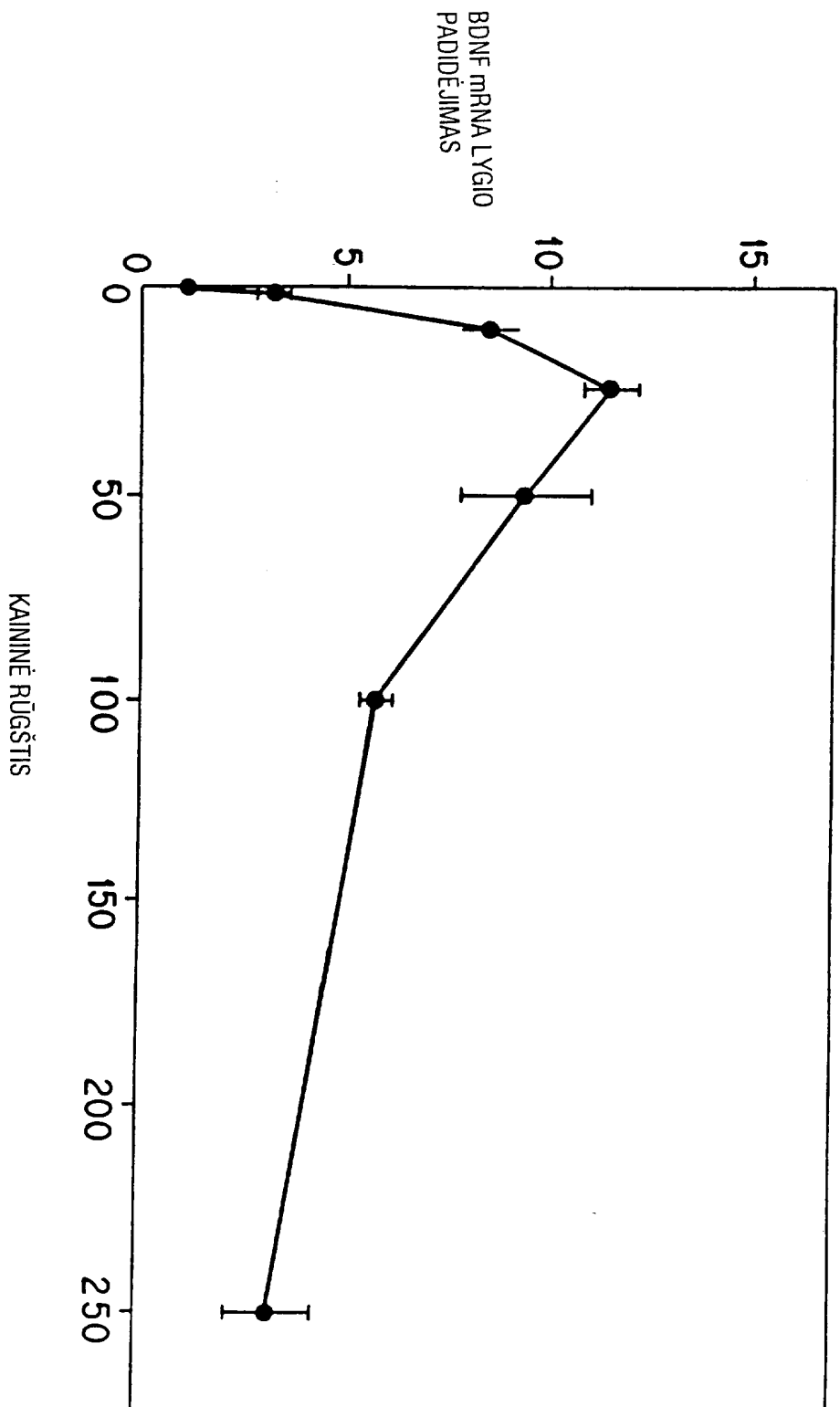


FIG.17



KAININĖ RŪGŠTIS
FIG. 18

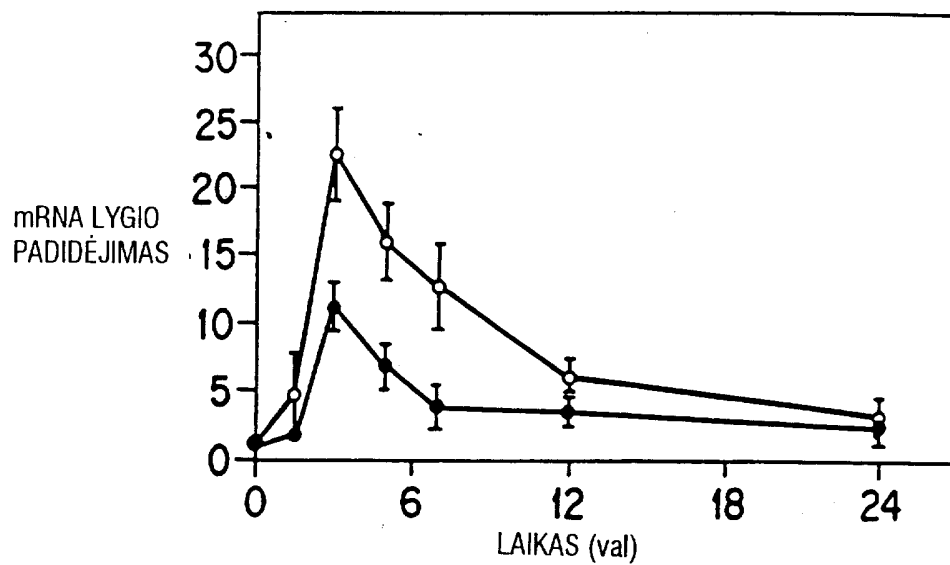


FIG. 19 A

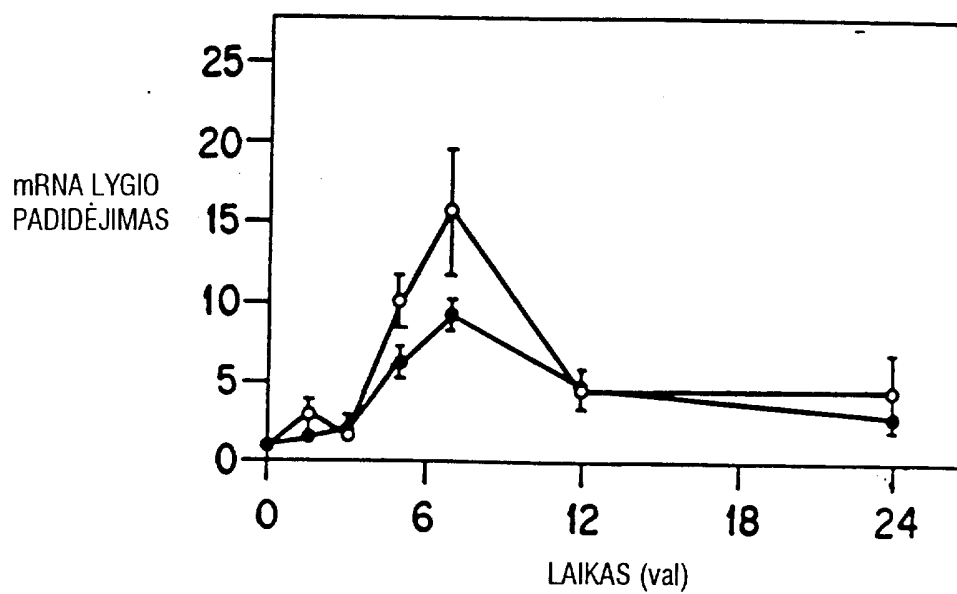


FIG. 19 B

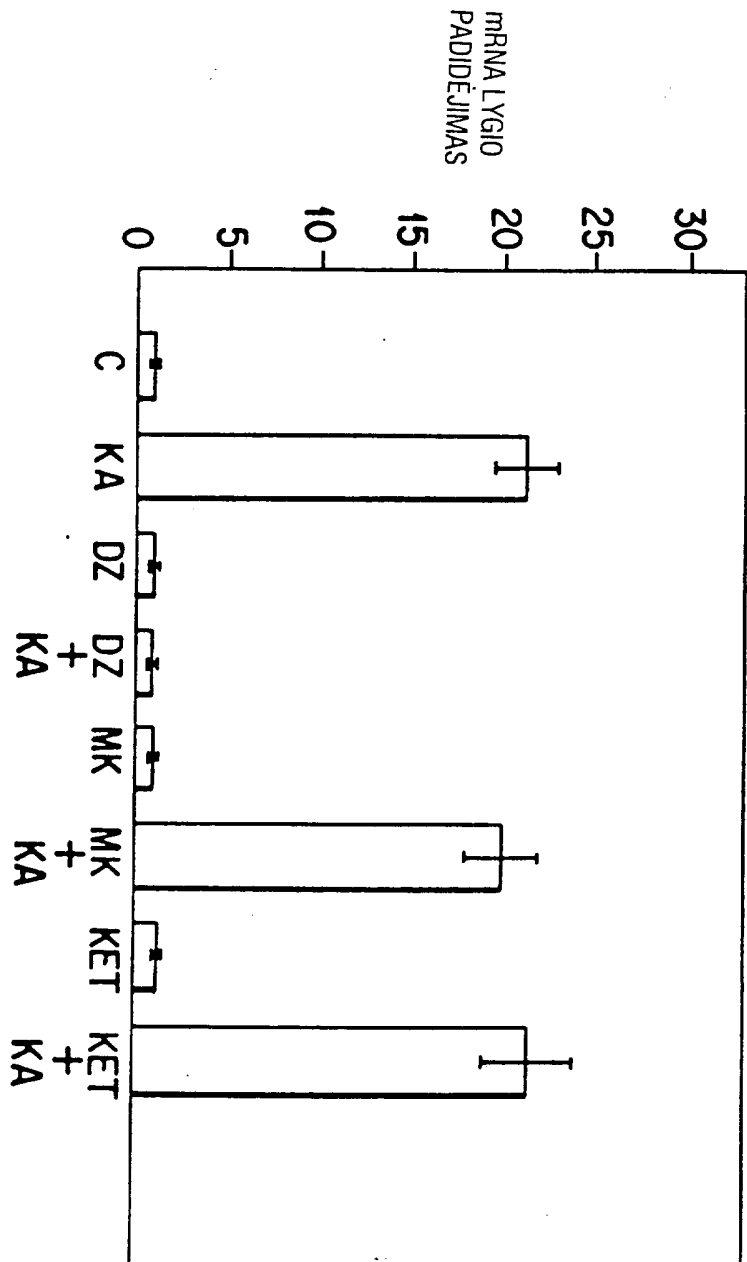


FIG. 20

FIG.21A



FIG.21B



FIG.21C

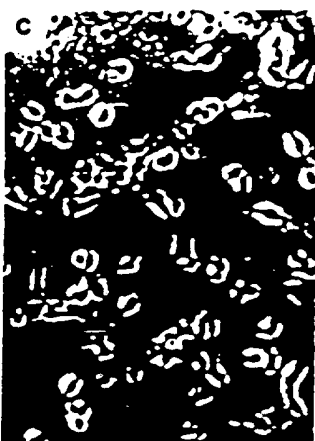


FIG.21D



FIG.21E



FIG.21F



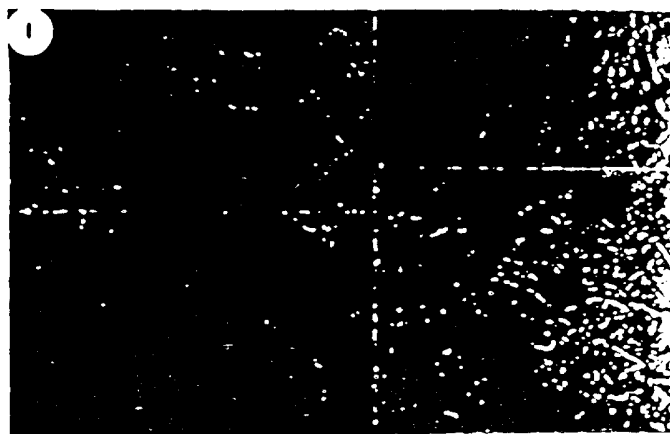
FIG.21G



FIG.21H



FIG.21I



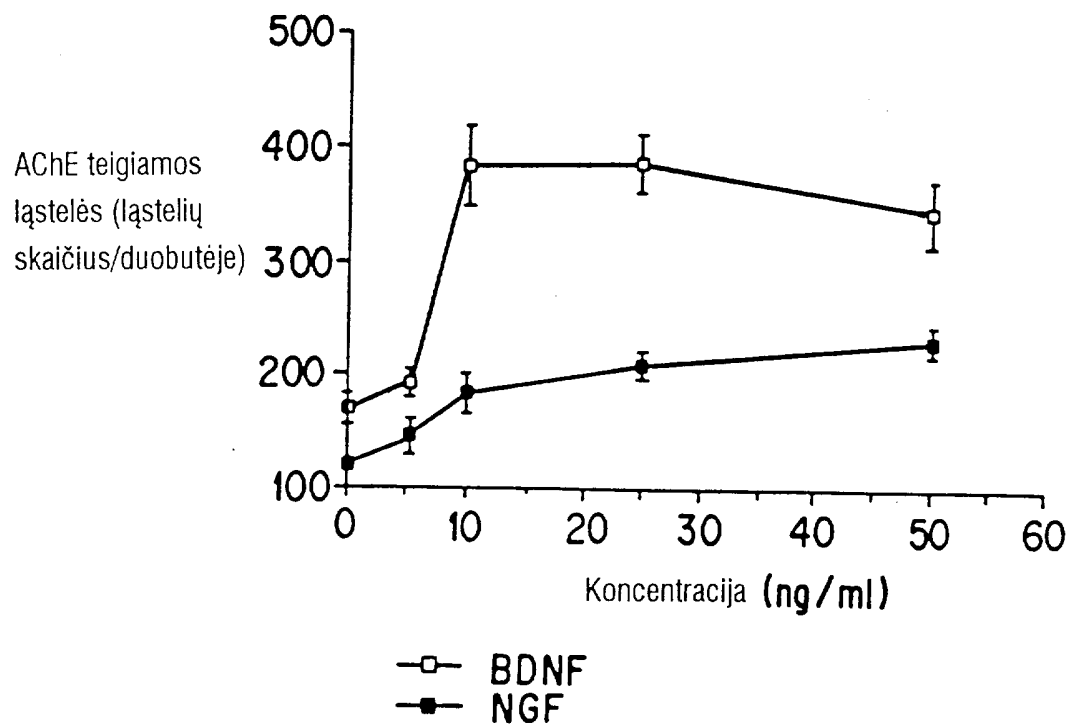
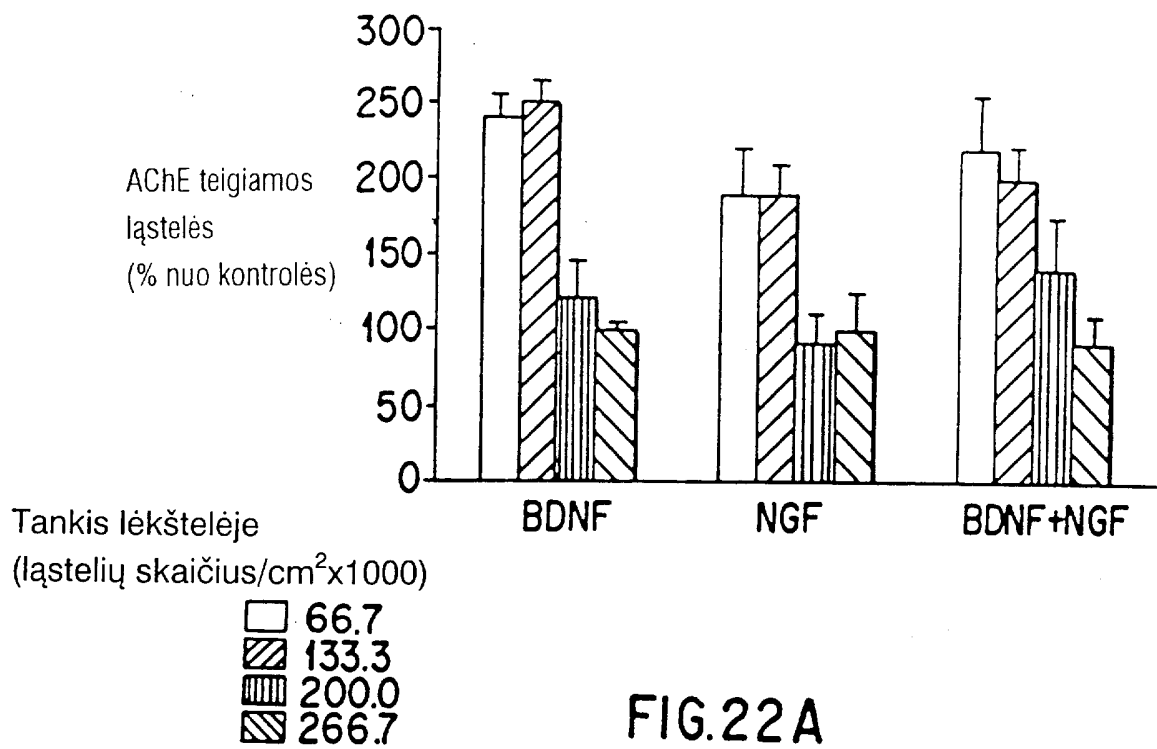


FIG. 22 B

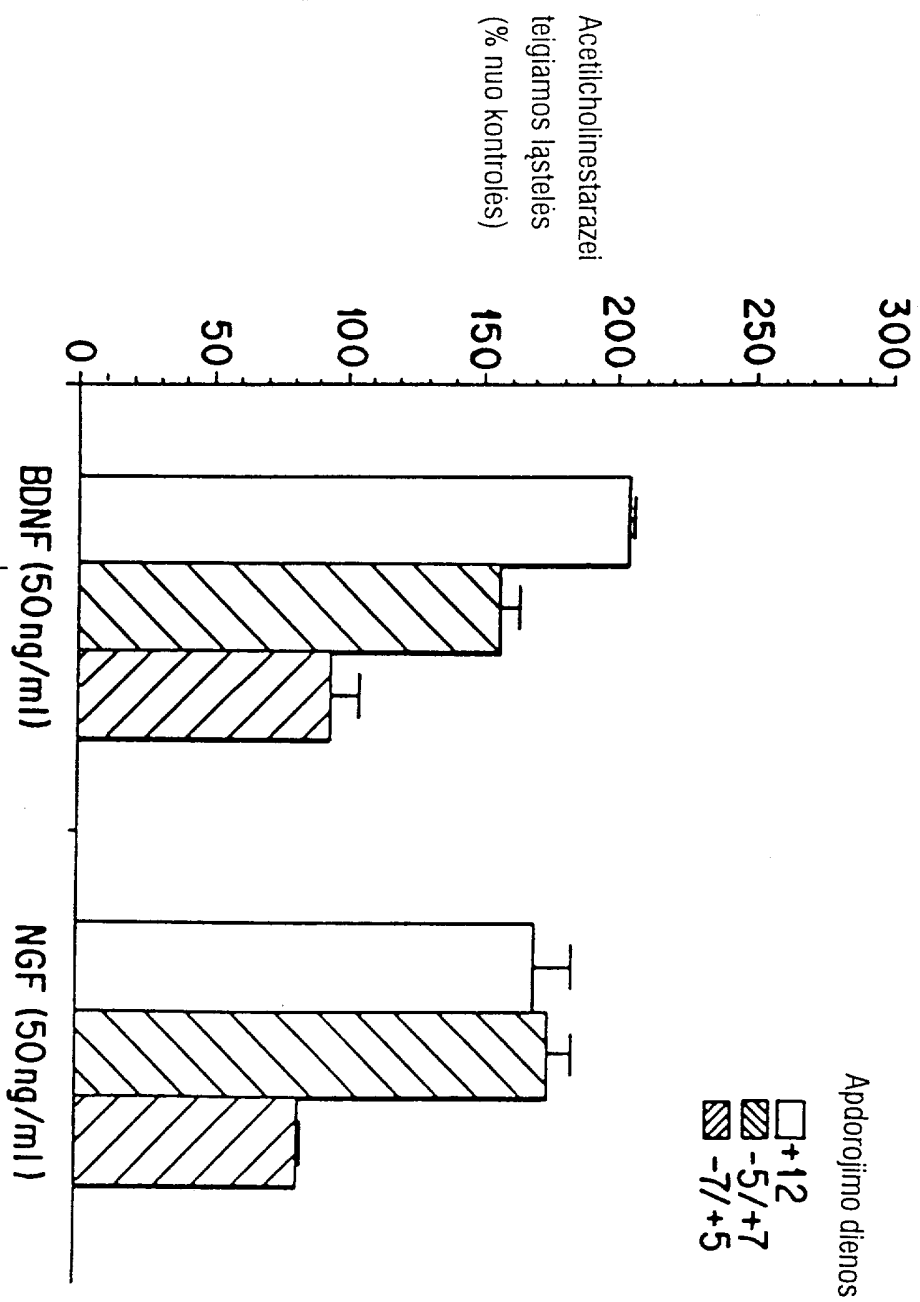


FIG. 23

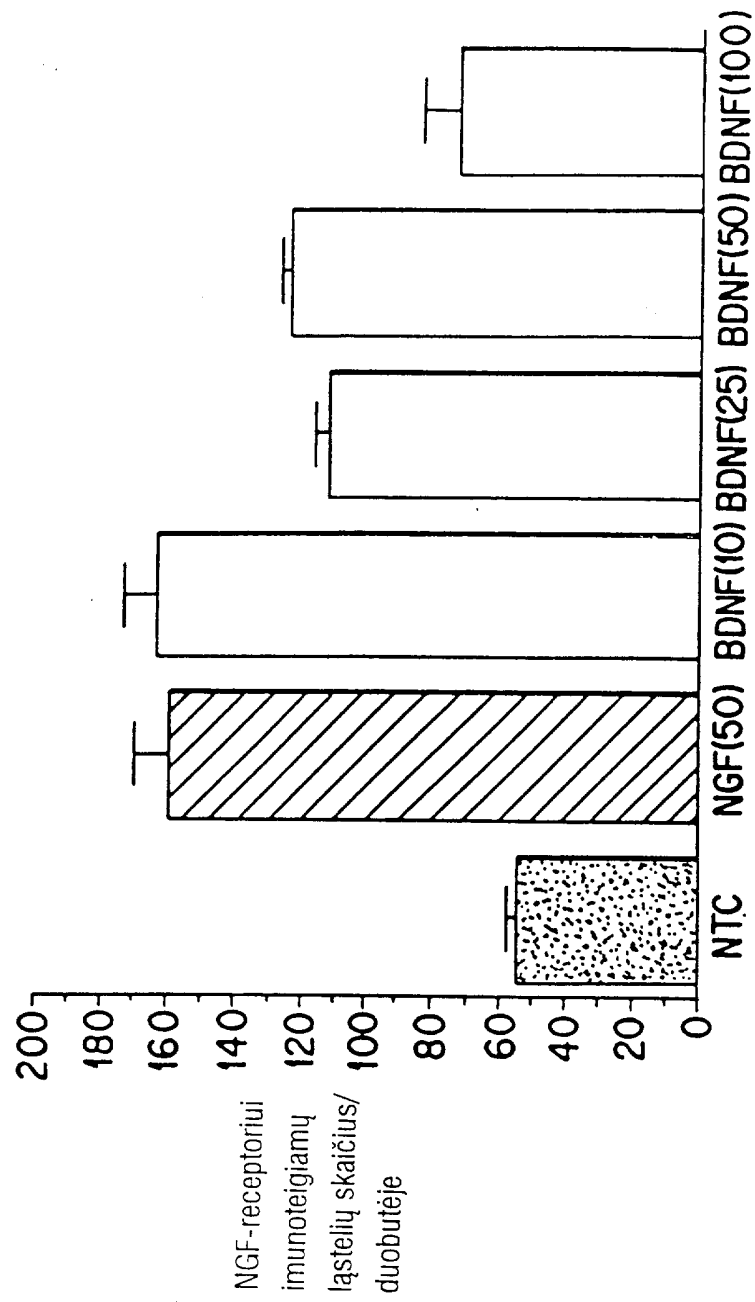


FIG. 24

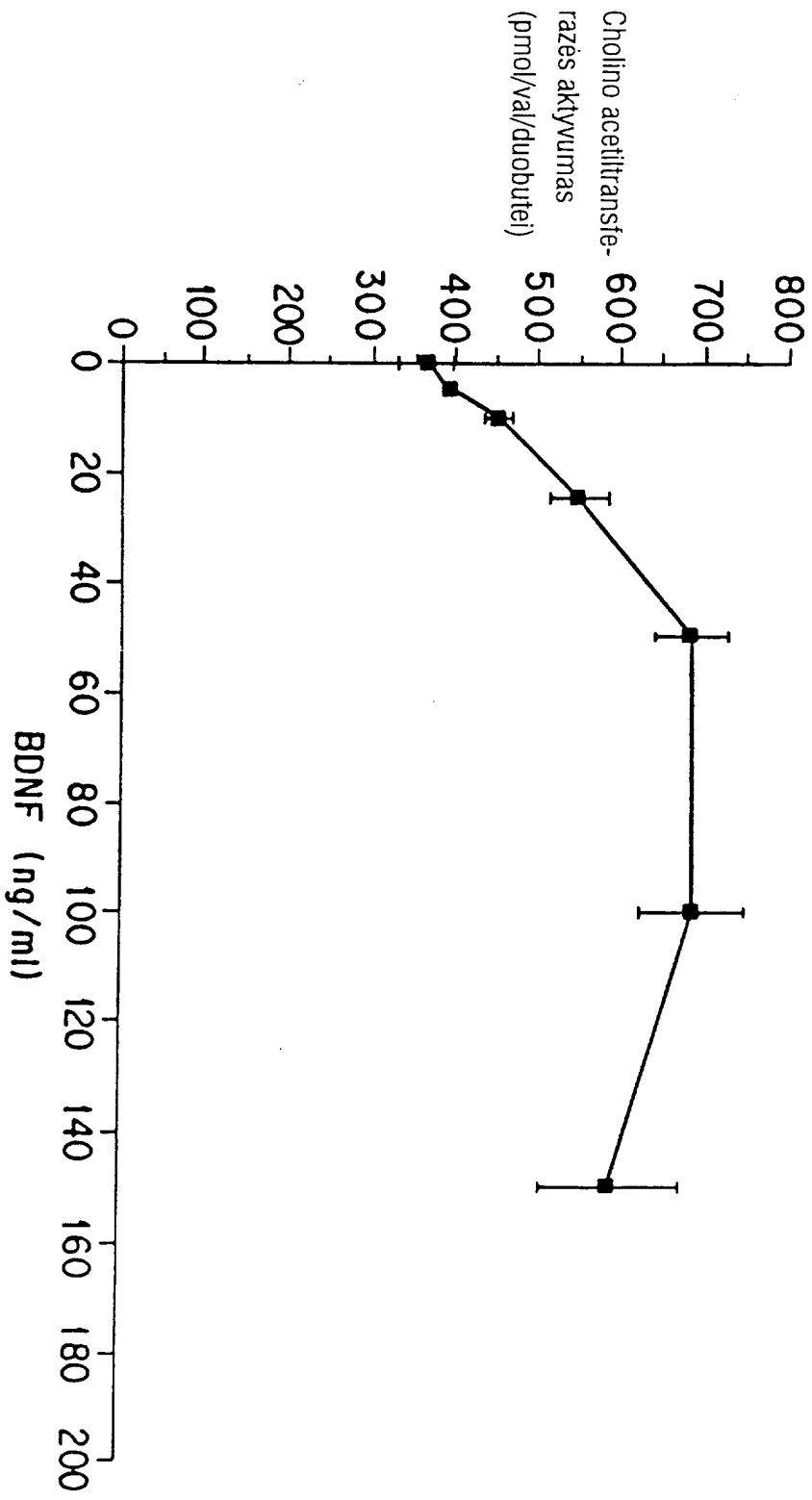


FIG. 25A

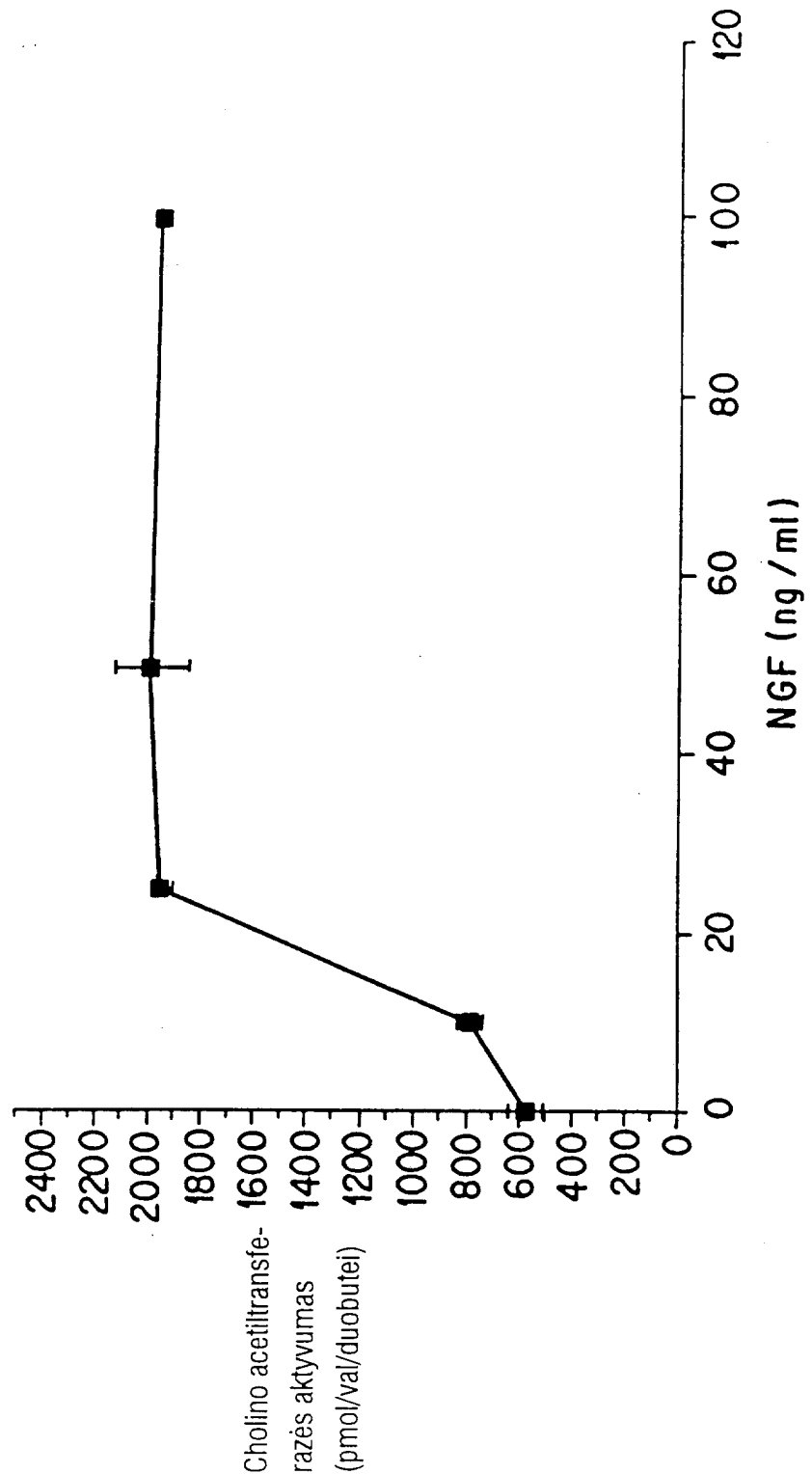


FIG. 25B

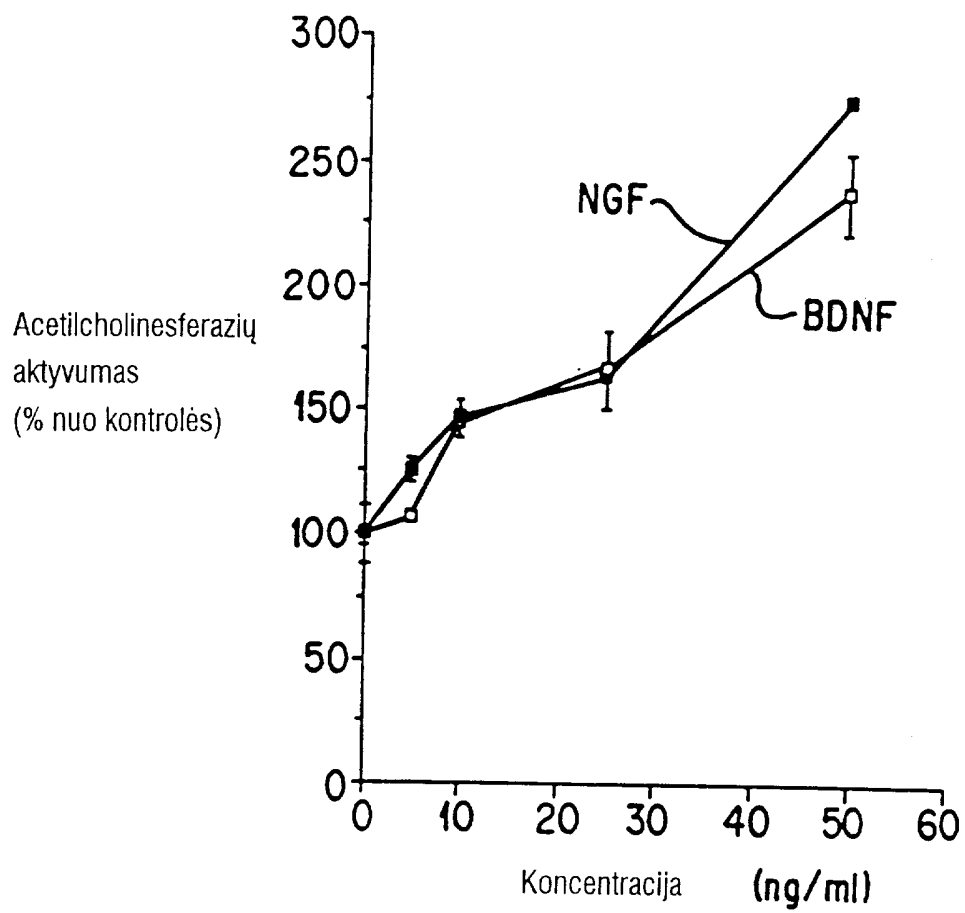


FIG. 26

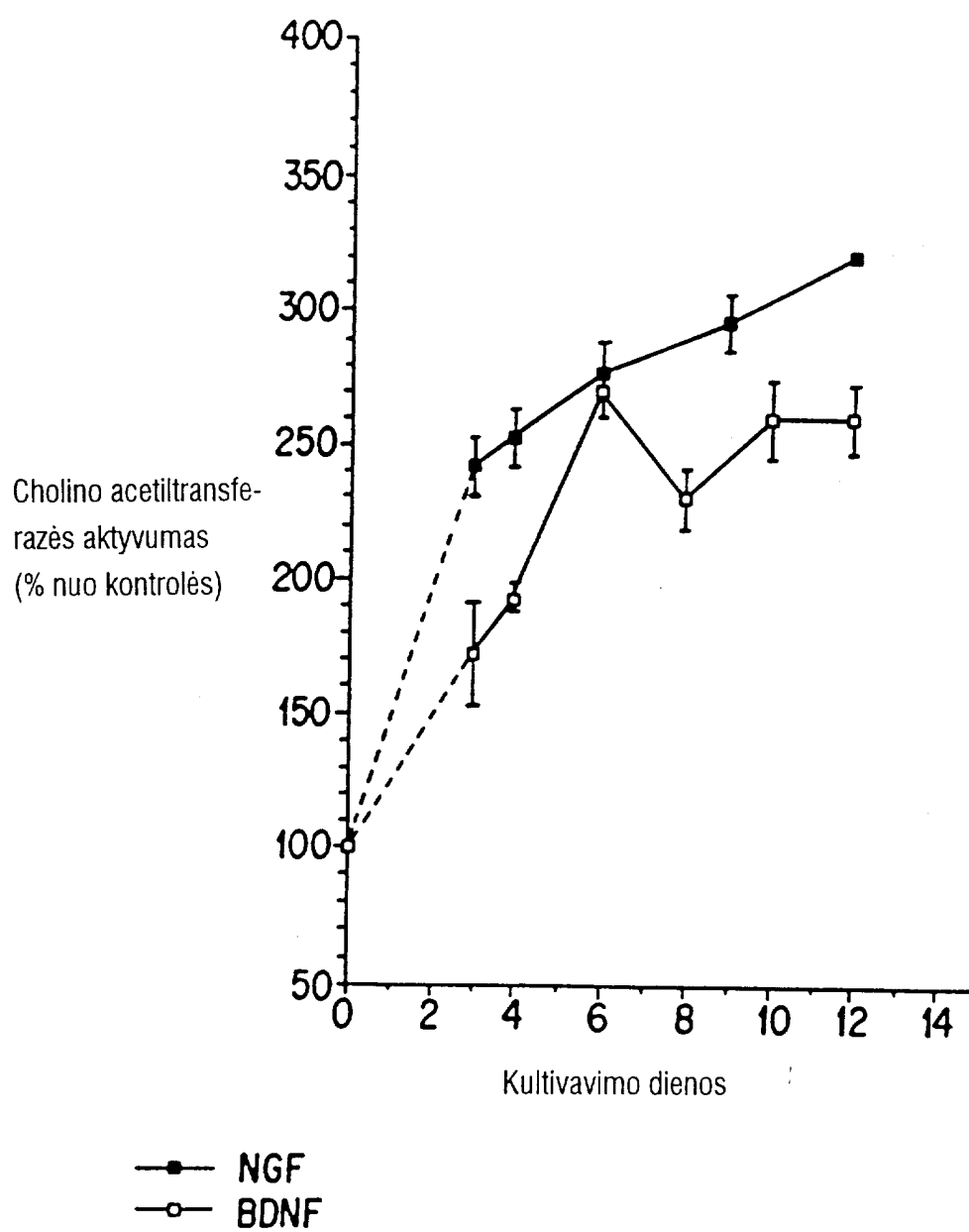
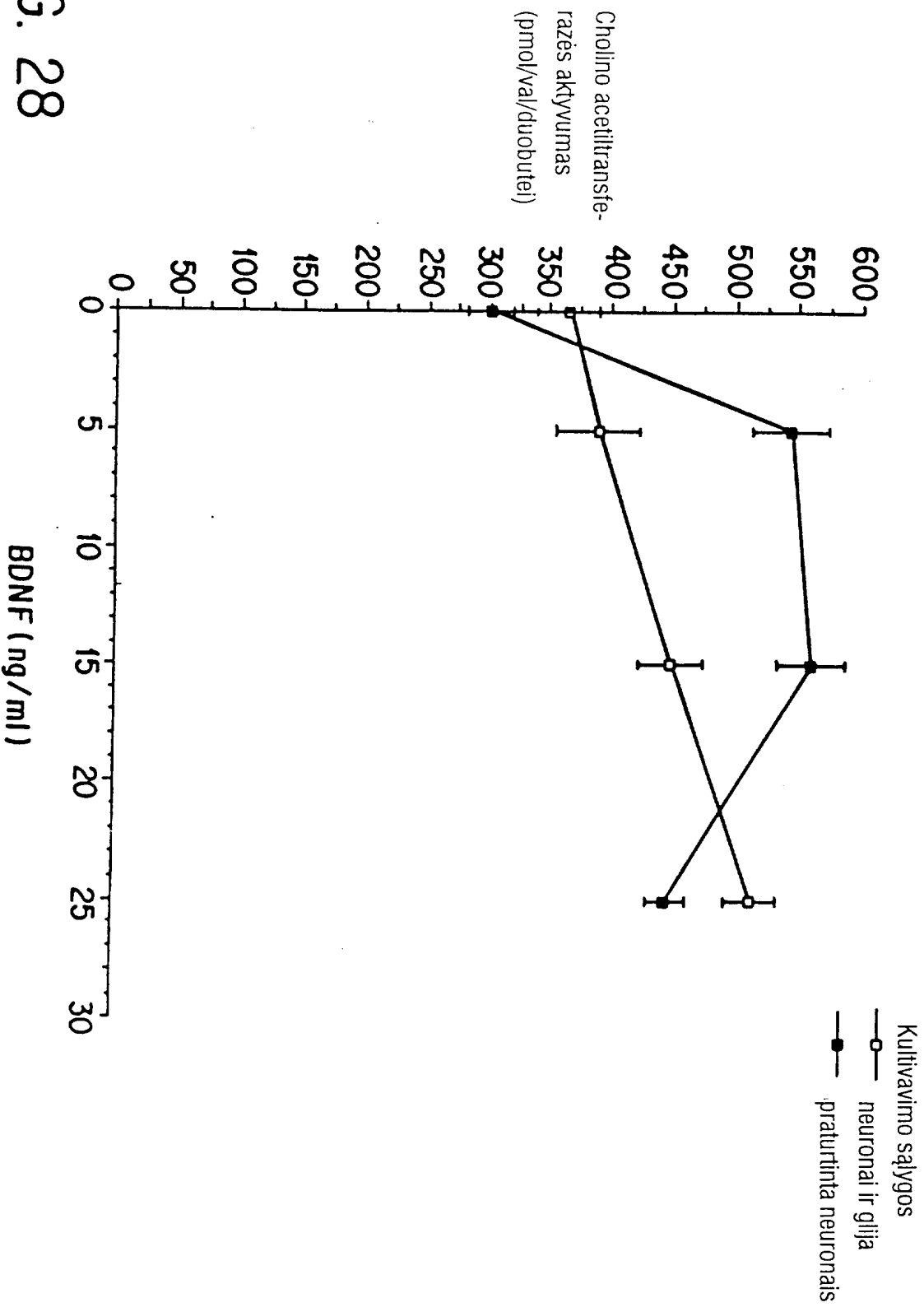


FIG. 27

FIG. 28



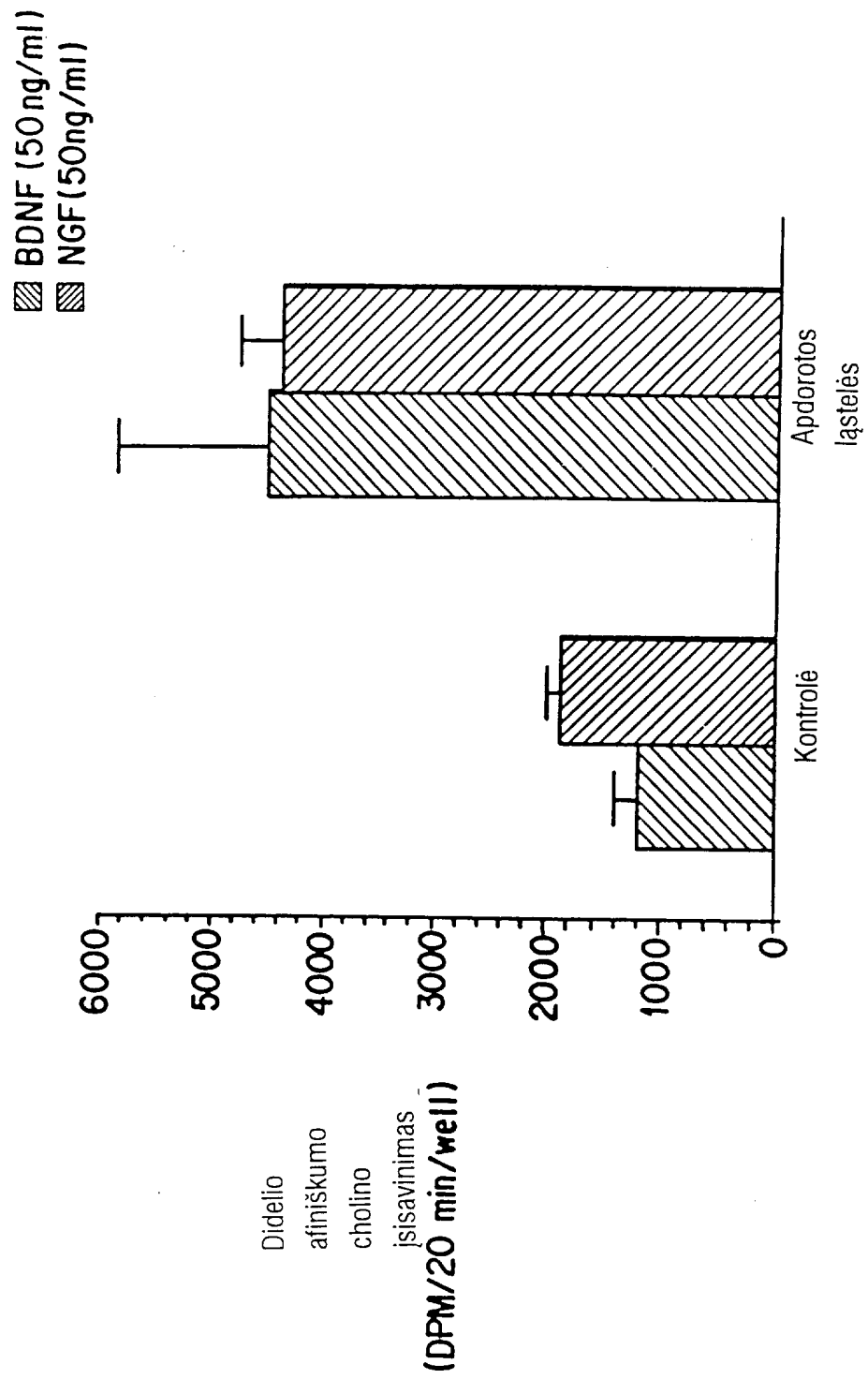


FIG. 29

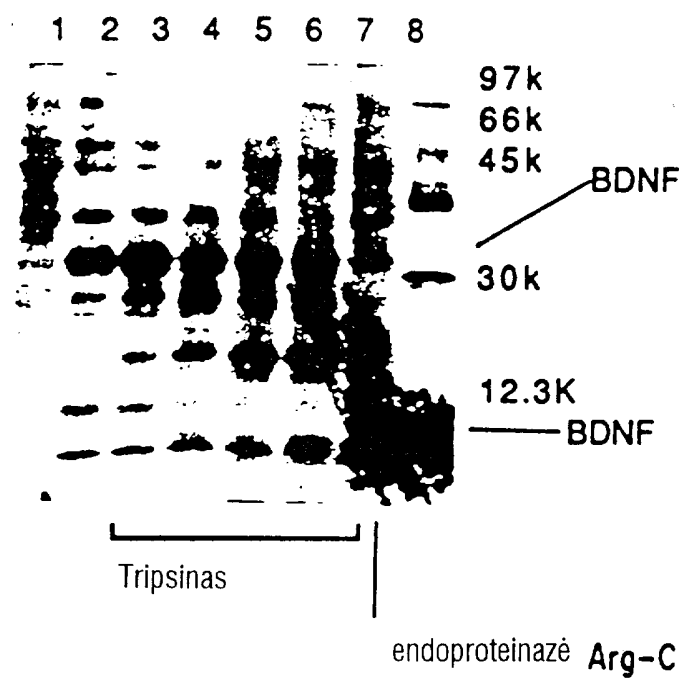


FIG. 30

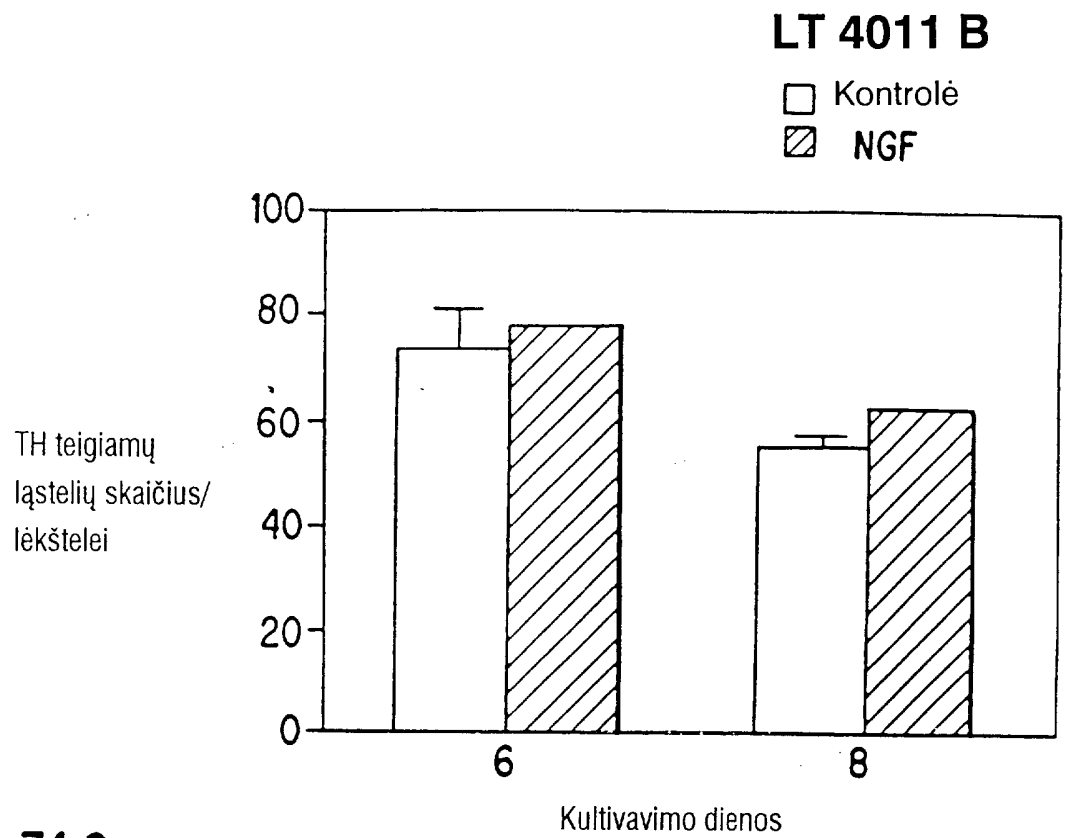


FIG. 34C

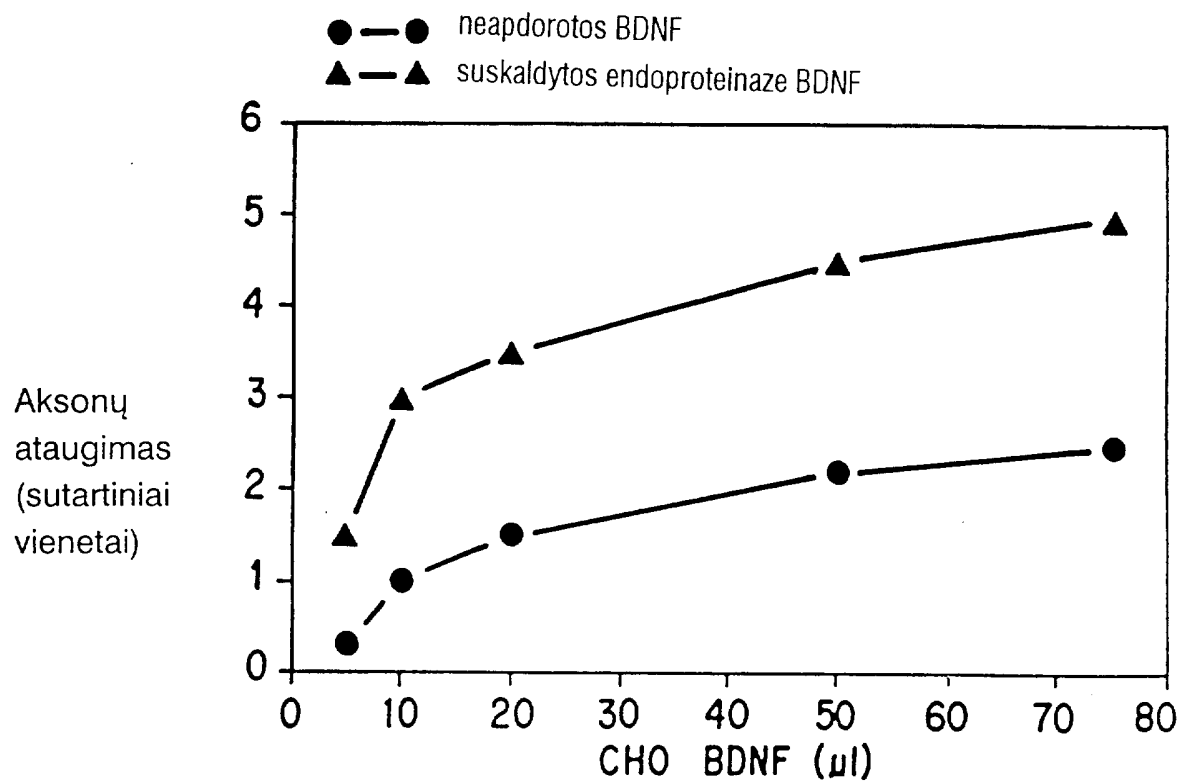


FIG. 31

FIG. 32A

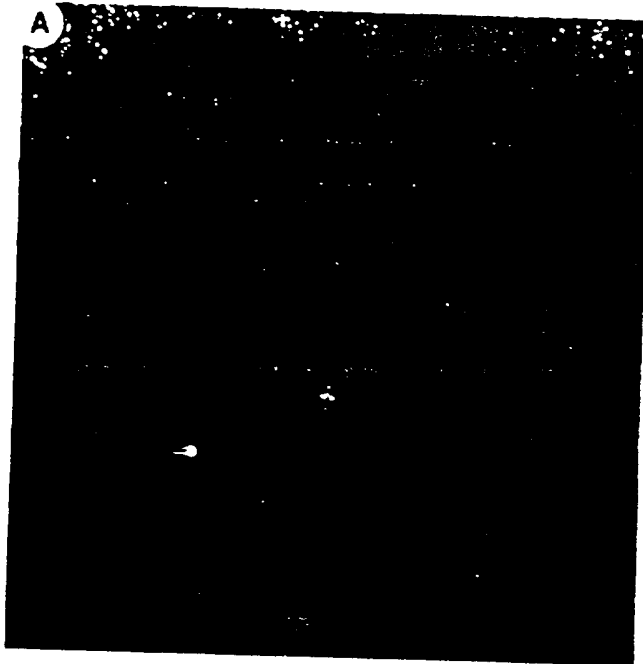


FIG. 32B

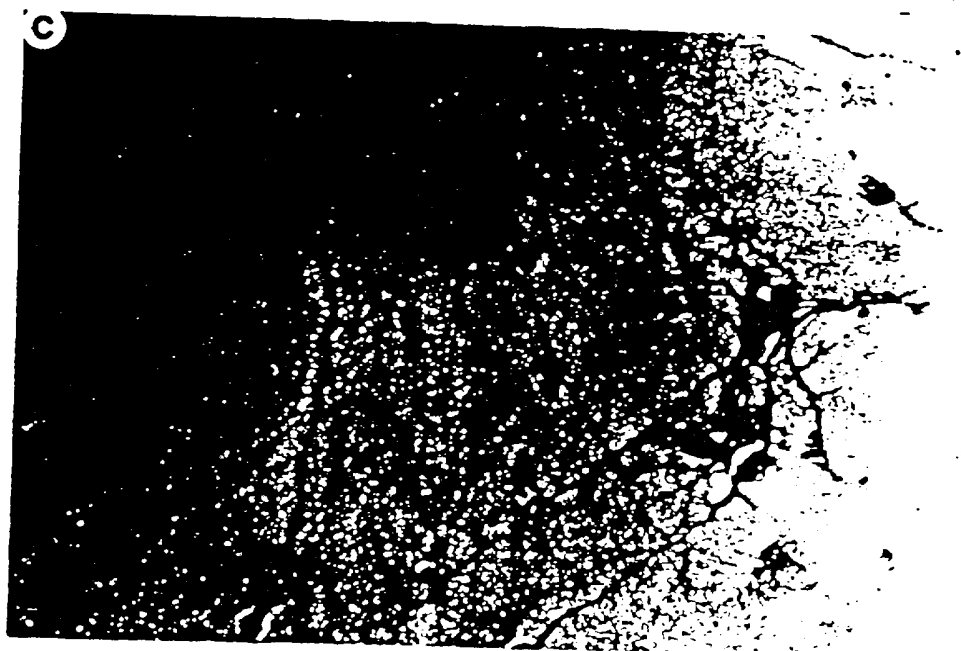


FIG. 32C

FIG. 33A

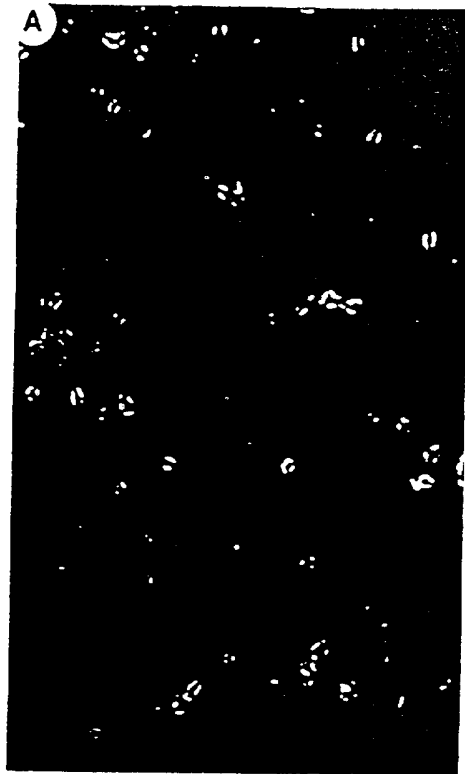


FIG. 33B



FIG. 33C

48/52

□ Kontrolė
▨ BDNF

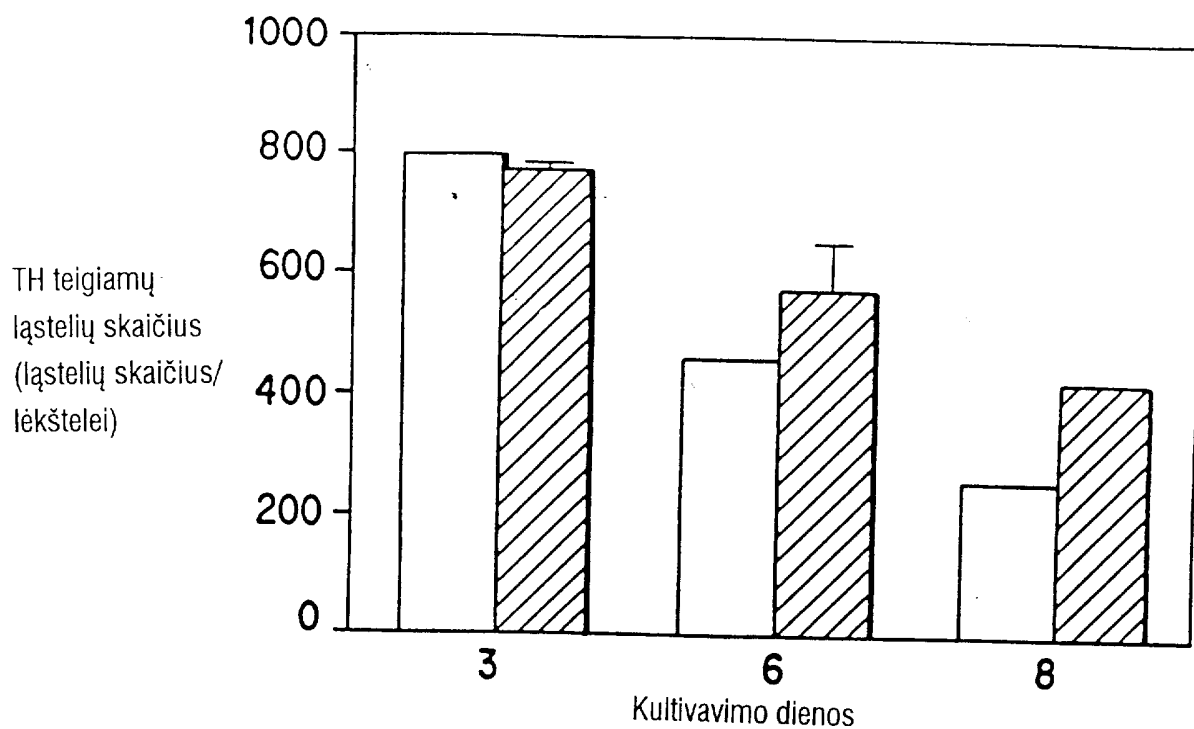


FIG. 34 A

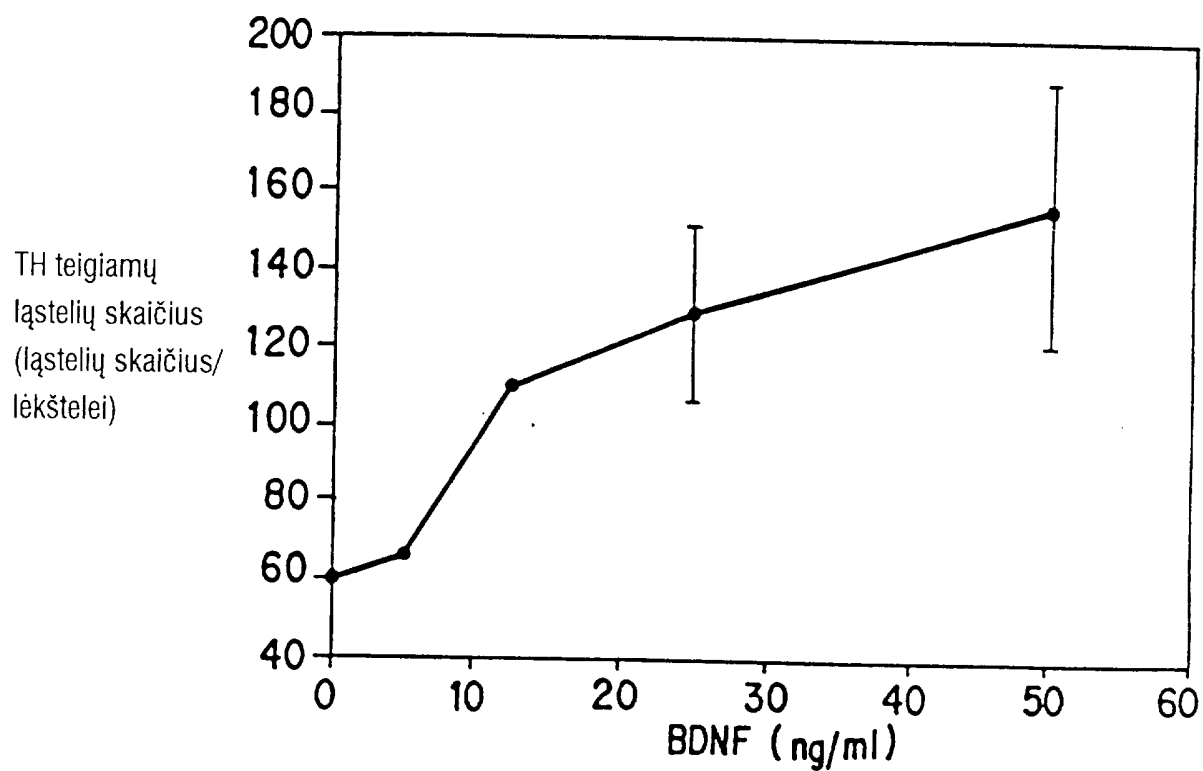


FIG. 34 B

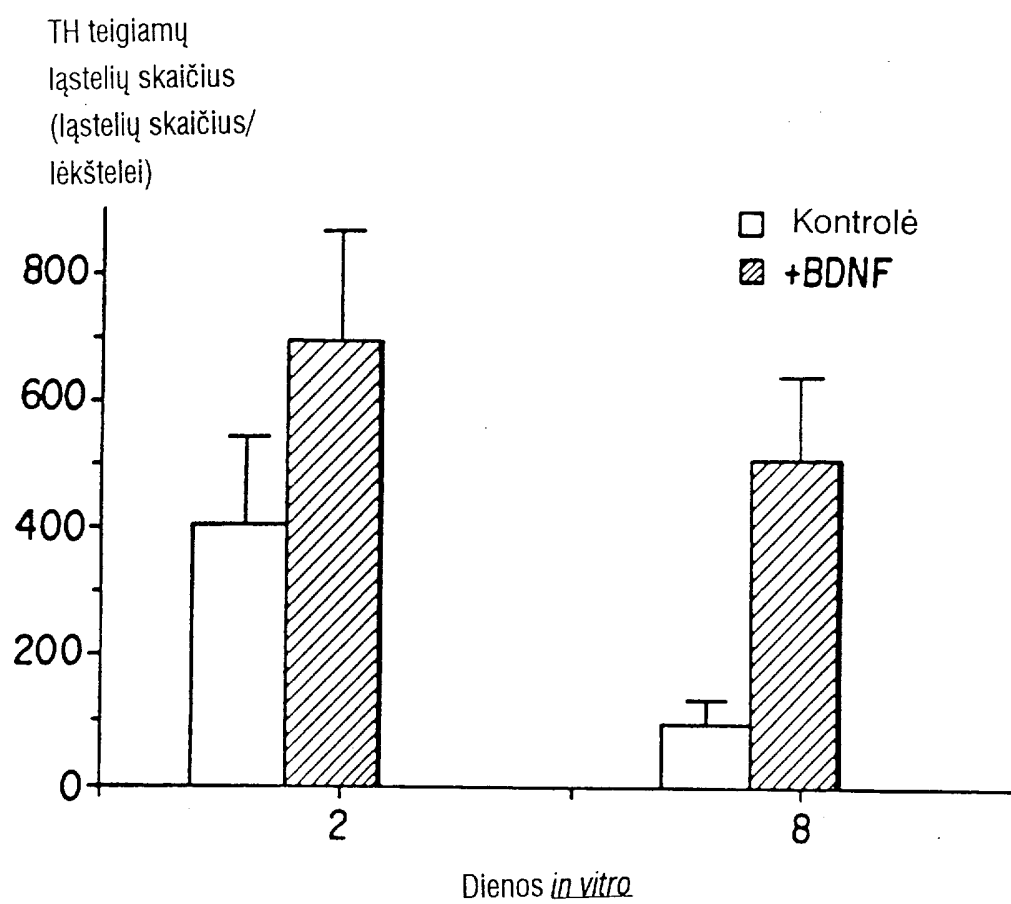


FIG. 35

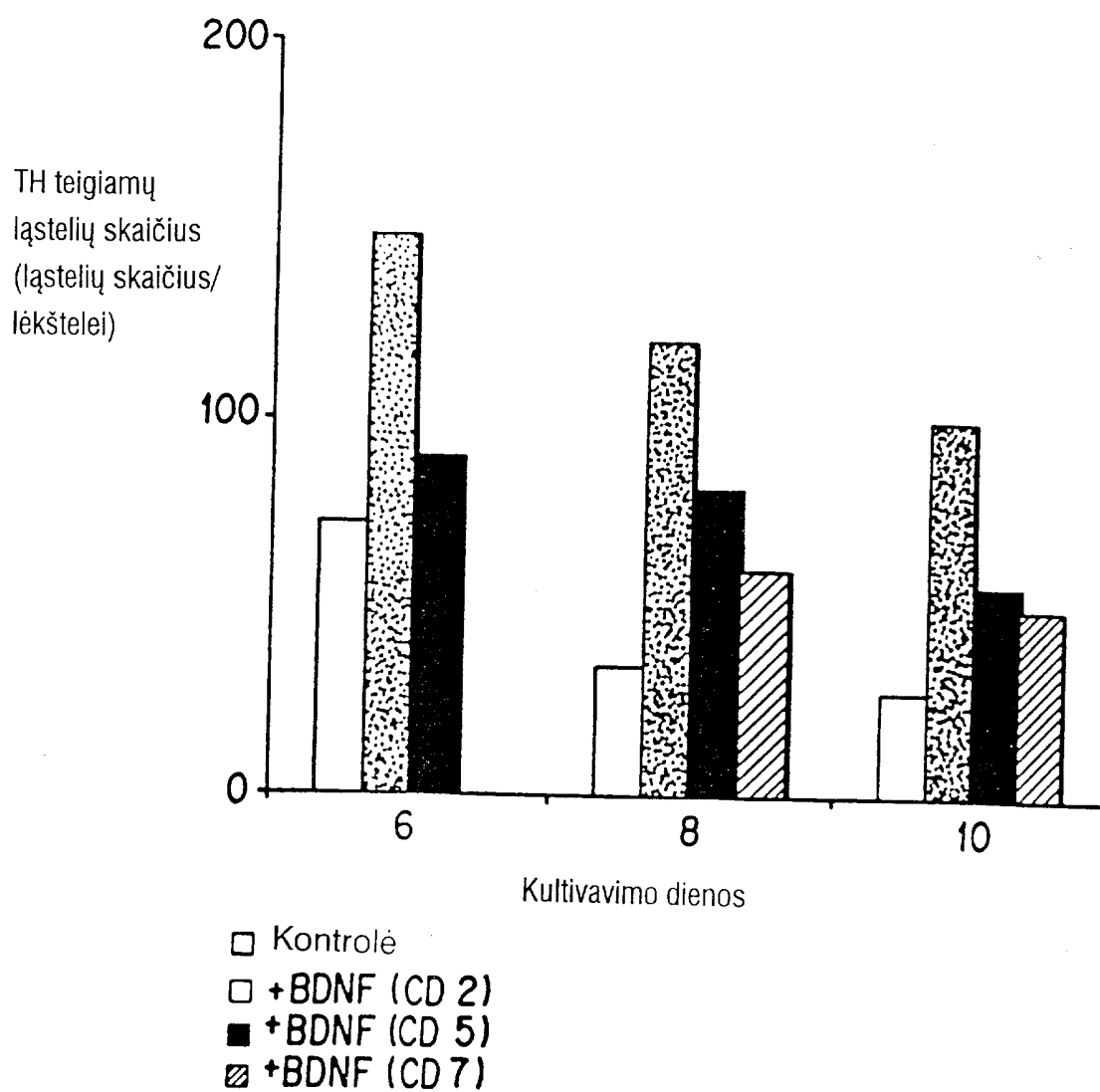


FIG. 36

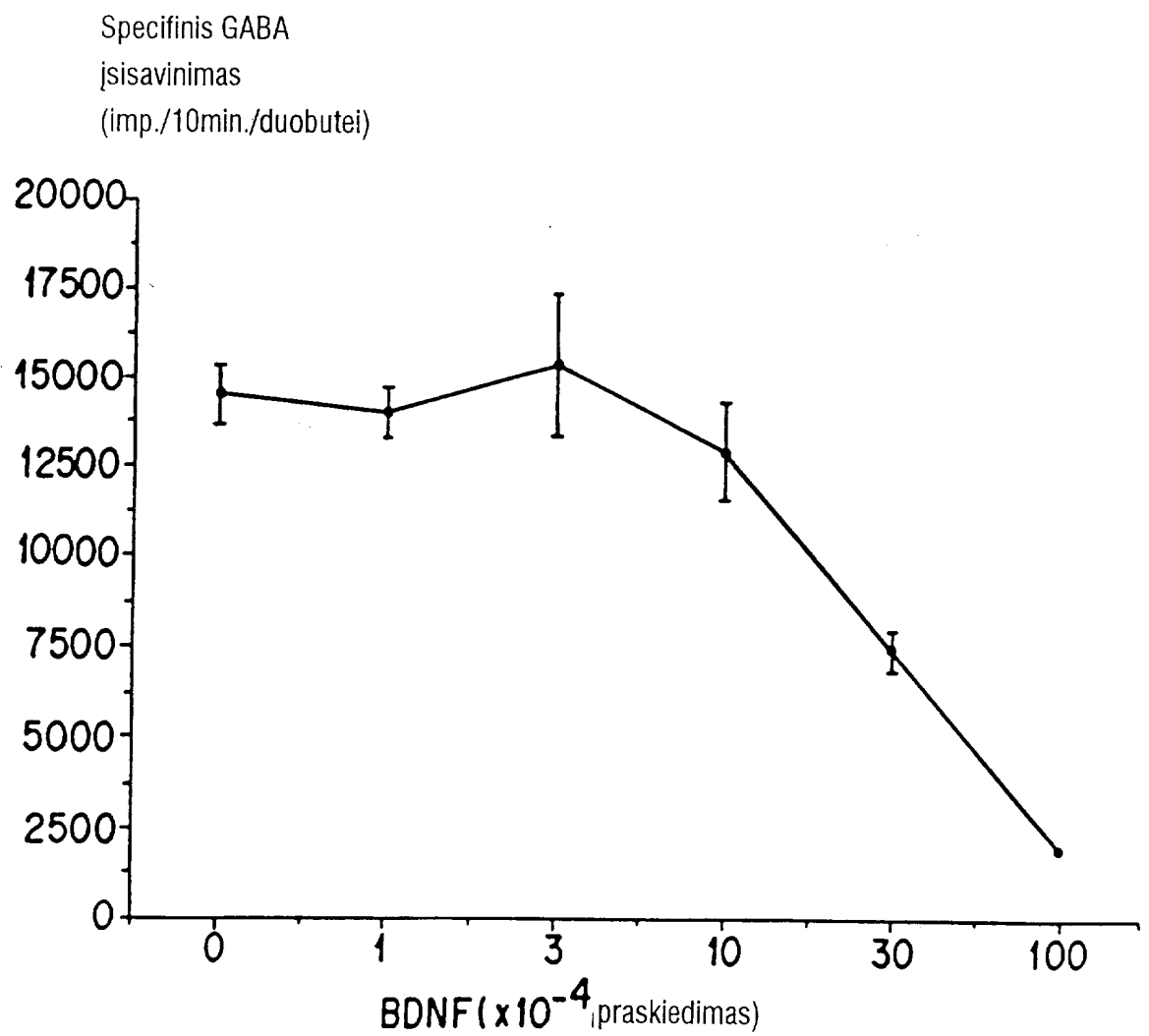


FIG. 37

TH teigiamų
ląstelių skaičius
(% nuo neapdorotų MPP+)

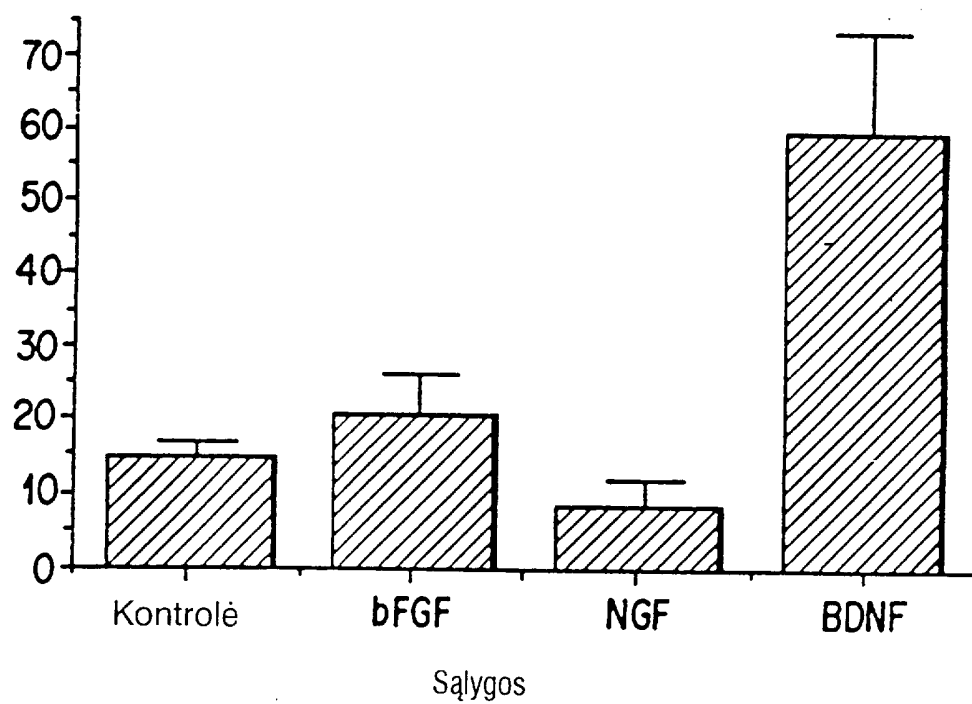


FIG. 38