

(19)



(10) **LT 4020 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

- (11) Patent numeris: **4020**
- (21) Paraiškos numeris: **IP1736**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 30**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 08 26**
- (60) SU duomenys: **PCT/SE 91/00381, 1991 05 30**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **9001985, 1990 06 01, SE**
- (51) Int. Cl.⁵: **C07K 13/00
C12N 9/20
C12N 9/16
C12N 15/55
A61K 37/54**
- (72) Išradėjas:
**Gunnar Bjursell, SE
Lars Blaeckberg, SE
Peter Carlsson, SE
Sven Enerbaeck, SE
Olle Hernell, SE
Jeanette Nilsson, SE
Thomas Olivercrona, SE**
- (73) Patent savininkas:
Astra AB, S-151 85 Soedertaelje, SE
- (74) Patentinis patikėtinis:
**Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company,
Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:
Žmogaus tulžies druskos stimuliuojamos lipazės dariniai ir juos turinčios farmacinės kompozicijos

- (57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su naujomis DNR sekomis, naujais baltymais, koduojamais šių sekų, ir su toliau aprašytu tokių baltymų panaudojimu. Šis išradimas taip pat apima vektorius, tokius kaip sukonstruotos plazmidės, savo sudėtyje turinčios šias DNR sekas, galinčias ekspresuoti norimus fermentus. Šis išradimas taip pat apima šių sukonstruotų plazmidžių transfekuotus organizmus, pvz., bakterijas, mieles, žinduolių ląsteles ir transgeninius gyvūnus. Išradimas taip pat susijęs su išrastų naujų produktų gamybos procesais. Išradimo nauji baltymai artimi fermentui, žinomam kaip žmogaus tulžies druskos stimuliuojama lipazė.

Šis išradimas yra apie naujas DNR sekas, apie naujus baltymus, koduojamus šių DNR sekų, ir apie šių baltymų panaudojimą, kuris aprašytas žemiau. Išradimas taip pat apima vektorius, tokius kaip sukonstruotos plazmidės, savo sudėtyje turinčios šias DNR sekas, galinčias ekspresuoti norimus fermentus. Išradimas taip pat apima šių sukonstruotų plazmidžių transfekuotus organizmus, pvz., bakterijas, mieles, žinduolių ląsteles ir transgeninius gyvūnus. Išradimas taip pat pasakoja apie išrastų naujų produktų gamybos procesus. Išradimo nauji baltymai priskiriami fermentui, žinomam kaip žmogaus tulžies druskos stimuliuojama lipazė.

Moters pieno liauka laktacijos metu gamina ir išskiria su pienu tulžies druskos - stimuliuojamą lipazę (TDSL) [Bläckberg, L., Änquist, K. A., a. Hernell, O. (1987) FEBS Lett. 217, 37-41], kuri po specifinės aktyvacijos pirminės tulžies druskomis [Hernell, O. (1975) Eur. J. Clin. Invest. 5, 267-272; Hernell, O., a. T. Olivecrona, 1974, Moters pieno lipazės II. Tulžies druskos - stimuliuojama lipazė. Biochim. Biophys. Acta 369: 234-244; Hernell, O., L. Bläckberg, a. T. Olivecrona. 1981. Moters pieno lipazės. Kn.: Gastroenterologijos ir kūdikių mitybos vadovėlis. red. E. Leubenthal. Raven Press, New York. 347-354] krūtimi maitinamam kūdikiui suteikia endogeninę galimybę žarnyne virškinti riebalus [Hernell, O., Bläckberg, L. a. Bernbäck S. (1988) Kn. „Perinatalinis maitinimas“/ red. Lindblad, B.S./ Bristol-Myers sinpoziumas maitinimo klausimais, t. 6. pp. 259-272, Academic Press, New York; Bernback S., Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1990) J.Clin.Invest. 221-226 (1990)]. Šis fermentas, sudarantis apie 1% visų pieno baltymų, yra ne specifinė lipazė [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225]: *in vitro* jis hidrolizuoja ne tik tri-, di-, ir monoacilglicerolius, bet taip pat ir cholesterol- ir retenil esterius ir

lizofosfattidilglicerolius [Hernell, O. a Bläckberg, L. (1982) *Pediatr. Res* 16, 882-885; Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a Olivecrona, T. (1981) *FEBS Lett.* 136, 284-288; Fredrikzon, B., Hernell, O., Bläckberg, L. a Olivecrona, T. (1978) *Pediatr. Res.* 12, 1048-1052; Wang, C.-S., Hartsuck, J.A. a Downs, D. (1988) *Biochemistry* 27, 4834-4840].

Be to, jo aktyvumas neapsiriboja vien tik emulsiniais substratais, panašiu greičiu jis hidrolizuoja tirpius ir micelinius substratus [Bläckberg, L. a Hernell, O. (1983) *FEBS Lett.* 157, 337-341].

TDSL nesuskyja keliaudama kartu su pienu per skrandį, o dvylikapirštėje žarnoje nuo inaktyvacijos tokiomis kasos proteazėmis, kaip tripsinas ir chimotripsinas, ją apsaugo tulžies druskos [Hernell, O. (1975) *Eur. J. Clin. Invest.* 5, 267-272; Bläckberg, L. a Hernell, O. (1983) *FEBS Lett.* 157, 337-341]. Tačiau šis fermentas inaktyvuojamas pieno pasterizacijos metu, pvz., kaitinant iki 62.5° C, 30 min. [Björkstén, B., Burman, L.G., deChateau, P., Fredrikzon, B., Gothefors, L. a Hernell, O. (1980) *Br. Med. J.* 201, 267-272]. Sprendžiant iš tyrimų *in vitro* duomenų, manoma, kad triacilglicerolio virškinimo galutiniai produktai, gauti reakcijoje dalyvaujant TDSL, yra skirtingi [Bernback S., Bläckberg, L.a.Hernell, O. (1990) *J. Clin. Invest.* 221-226 (1990); Hernell, O.a. Bläckberg, L. (1982), *Pediatr. Res* 16, 882-885]. Kadangi naujagimystės periode intraluminalinė tulžies druskos koncentracija yra mažesnė, ši sąlyga yra palankesnė geresnei produkto absorbcijai [Brueton, M.J., Berger, H.M., Brown, G.A., Ablitt, L., Iyangkaran, N.a. Wharton B.A. (1978) *Gut*, 19, 95-98; Murphy, G.M. a Singer, E. (1975) *Gut* 15, 151-163; Bernback S., Bläckberg, L.a.Hernell, O. (1990) *J. Clin. Invest.* 221-226 (1990); Hernell, O., Staggers, J.E. a Carey, M.C. *Biochemistry* (1990), 29: 2041-2056].

Atrodo, kad žmogaus kasos sulčių karboksilinė esterinė hidrolazė (KEH) funkciniu požiūriu yra identiška arba jau bent labai panaši į TDSL [Lombardo, D., Guy, O. a. Figarella, C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 527, 142-149; Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a. Olivecrona,

T. (1981) FEBS Lett. 136, 284-288]. Jos turi bendrus epitopus [Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a. Olivecrona, T. (1981) FEBS Lett. 136, 284-288; Abouakil, N., Rogalska, E., Bonicel, J. a. Lombardo, d. (1988) Biochim. Biophys. Acta, 961, 299-388], turi identiškas N-terminalines aminorūgščių sekas [Abouakil, N., Rogalska, E., Bonicel, J. a. Lombardo, d. (1988) Biochim. Biophys. Acta, 961, 299-388] ir jas inhibuoja serino esterazių inhibitoriai, pvz., ezerinas ir diizopropilfluorofosfatas [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225; Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a. Olivecrona, T. (1981) FEBS Lett. 136, 284-288; Lombardo, D., Guy, O. a. Figarella, C. (1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 142-149]. Spėjama, kad šie du fermentai yra to paties geno produktai [Hernell, O., Bläckberg, L.a. Lindberg, T. (1988) Kn. „Gastroenterologijos ir kūdikių mitybos vadovėlis“ /red. Lebenthal, E., pp. 209-217, Raven Press, New York; Wang, C.-S. (1988) Biochem. Biophys. Res. Com. 155, 950-955]. Stebėtas molekulinį masių skirtumas gali būti paaiškintas, matomai, skirtingu glikoziliniu [Abouakil, N., Rogalska, E., Bonicel, J. a. Lombardo, d. (1988) Biochim. Biophys. Acta, 961, 299-388].

Maistiniai lipidai yra svarbus energijos šaltinis. Energija turtingi triacilgliceroliai daugiau nei 95% sudaryti iš šių lipidų. Kai kurie lipidai, pvz., tam tikros riebios rūgštys ir riebaluose tirpūs vitaminai, yra pagrindiniai dietiniai komponentai. Prieš rezorbciją virškinimo trakte triacilgliceroliai, o taip pat ir mažesni komponentai, t.y. esterinti riebaluose tirpūs vitaminai ir cholesterolis, diacilfosfatidilgliceroliai, turi būti hidrolizuoti suskaldant esterinius ryšius tam, kad gautųsi mažiau hidrofobiški, gerai absorbuojami produktai. Šias reakcijas katalizuoja specifinė fermentų grupė - lipazės.

Suaugusio žmogaus organizme pagrindinės lipazės yra šios: skrandžio lipazės, nuo kasos kolipazės-priklausoma lipazė (tri- ir diacilglicerolių hidrolizė), kasos fosfolipazė A2 (diacilfosfatidilgliceroliai) ir karboksilinė

esterinė hidrolazė (cholesteril- ir riebaluose tirpių vitaminų esteriai). Pas krūtimi maitinamą naujagimį tulžies druskos-stimuliuojama lipazė vaidina pagrindinį vaidmenį hidrolizuojant keletą aukščiau paminėtų lipidų. Lipidų virškinimo produktai drauge su tulžies druskomis sudaro mišrias micleles, kurios dalyvauja absorbcijoje [Hernell, O., Bläckberg, L. a. Bernbäck S. (1988) Kn. „Perinatalinis maitinimas“/ red. Lindblad, B.S./ Bristol-Myers sinpoziumas maitinimo klausimais, t. 6. pp. 259-272, Academic Press, New York; Bernback S., Bläckberg, L.a.Hernell, O. (1990) J. Clin. Invest.. 221-226 (1990)].

Blogos lipidų rezorbcijos priežastys ir iš to atsiradęs blogas virškinimas susijęs su sumažėjusia nuo kasos kolipazės-priklausomos lipazės ir/ar tulžies druskų intraluminaliniais kiekiais. Tokių lipazių stygiaus tipišku pavyzdžiu gali būti pacientai, sergantys cistine fibroze, įprastu genetiniu susirgimu, kurių 80% pasireiškia šis stygius per visą gyvenimo trukmę, taip pat jie suserga lėtiniu pankreatitu ir dažnai lėtiniu alkoholizmu.

Naujagimių kasos ir kepenų veikla dar nėra pilnai išvystyta, o ypač tai pasireiškia pas prieš laiką gimusius naujagimius. Bloga riebalų rezorbcija dėl fiziologinių priežasčių - įprastas sutinkamas reiškinys, kurį, kaip manoma, sąlygoja maža intraluminalinė nuo kasos kolipazės-priklausomos lipazės ir tulžies druskos koncentracija [Hernell, O., Bläckberg, L. a. Bernbäck S. (1988) Kn. „Perinatalinis maitinimas“/ red. Lindblad, B.S./ Bristol-Myers sinpoziumas maitinimo klausimais, t. 6. pp. 259-272, Academic Press, New York; Hernell, O, L. Bläckberg, B. Fredrikzon, and T. Olivecrona. 1981. Žmogaus pieno tulžies druskos - stimuliuojama lipazė ir lipidų virškinimas naujagimystės periode. Kn.: „Gastroenterologijos ir kūdikių mitybos vadovėlis“ red. E. Lebenthal. Raven Press, New York. 465-471; Brueton, M.J., Berger, H.M., Brown, G.A., Ablitt, L., Iyangkaran, N.a. Wharton B.A. (1978) Gut, 19, 95-98; Murphy, G.M. a Singer, E. (1975) Gut 15, 151-163; Hernell, O., Staggars, J.E. a. Carey, M.C. Biochemistry (1990), 29: 2041-2056]. Tačiau dėl TDSL

bloga rezorbcija yra retesnė pas krūtimi maitinamus kūdikius negu pas kūdikius, maitinamus pasterizuotu žindyvės pienu [Hernell, O., Bläckberg, L. a. Bernbäck S. (1988) Kn. „Perinatalinis maitinimas“/ red. Lindblad, B.S./ Bristol-Myers sinpoziumas maitinimo klausimais, t. 6. pp. 259-272, Academic Press, New York; Hernell, O, L. Bläckberg, B. Fredrikzon, and T. Olivecrona. 1981. Žmogaus pieno tulžies druskos - stimuliuojama lipazė ir lipidų virškinimas naujagimystės periode. Kn.: „Gastroenterologijos ir kūdikių mitybos vadovėlis“ red. E. Lebenthal. Raven Press, New York. 465-471; Bernback S., Bläckberg, L.a.Hernell, O. (1990) J. Clin. Invest. 221-226 (1990); Björkstén, B., Burman, L.G., deChateau, P., Fredrikzon, B., Gothefors, L. a. Hernell, O. (1980) Br. Med. J. 201, 267-272; Atkinson, S.A., M.H. Bryan a. G.H. Andersson, 1981. Neišnešiotų naujagimių maitinimas moters pienu: baltymų, riebalų ir angliavandenių balansas gyvenimo pirmosiomis dviem savaitėmis. J. Pediatr. 99: 617-624; Chappell, J.E., M.T. Clandinin, C. Kearney-Volpe, B. Reichman a. P.W. Swyer. 1986. Riebiųjų rūgščių balanso tyrimai pas neišnešiotus kūdikius, maitintus moters pienu arba mišiniais: kalcio priedų efektas. J. Pediatr. 108: 438-447]. Tai yra viena iš priežasčių, kodėl patariama, kad naujagimiai, ypač prieš laiką gimę, kurie negali būti maitinami savo motinos pienu, turėtų būti maitinami nepasterizuotu kitos žindyvės pienu [Björkstén, B., Burman, L.G., deChateau, P., Fredrikzon, B., Gothefors, L. a. Hernell, O. (1980) Br. Med. J. 201, 267-272].

Dabartiniu metu ligoniai, sergantys kasos lipazės nepakankamumu, gydomi skiriant peroraliai vartoti dideles neišvalyto kiaulių kasos fermentų preparato dozes. Žemas pH inaktyvuoja nuo kolipazės-priklausomą kasos lipazę. Skrandyje kaip tik vyrauja analogiškos sąlygos, ir tai sąlygoja peroraliai pavartotų kasos lipazių faktiškai pilną inaktyvavimą joms keliaujant iš skrandžio į žarnas. Todėl naudojant dideles fermento dozes, negalima pilnai išvengti šio neigiamo poveikio. Panaudotos didelės dozės yra neadekvačios daugumai ligonių, o patys preparatai yra neišvalyti ir

neskanūs. Tam tikros tabletės buvo sukurtos, galinčios pereiti skrandžio rūgščiąją zoną ir išlaisvinti fermentą santykinai šarminėje aplinkoje-tuščiojoje žarnoje. Tačiau daugelis ligonių, sergančių kasos sutrikimais, turi tuščiojoje žarnoje nenormaliai rūgščią terpę, ir todėl tokios tabletės bus neefektyvios. Be to, kadangi dabartinis komercinis preparatas yra gautas iš nežmogaus kilmės šaltinio, tai egzistuoja tam tikra imuninių reakcijų rizika, nes šios reakcijos pacientui gali būti žalingos arba gali mažinti terapinį efektą. Kitas dabartinis preparatų ypatumas yra tas, kad jų kiti lipoliziniai aktyvumai, išskyrus nuo kolipazės - priklausomą lipazę, nėra nustatyti. Faktiškai, dauguma jų turi mažus KEH/TDSL-aktyvumus. Tai gali būti viena iš priežasčių, kodėl daugelis ligonių, sergančių cistine fibroze, nežiūrint papildančios terapijos, vis tiek stokoja riebaluose tirpių vitaminų ir pagrindinių riebiųjų rūgščių.

Tokiu būdu, labai reikalingi produktai, pasižymintys žmogaus kilmės lipazių ypatumais ir sandara, turintys platų substratinį specifiškumą, ir kuriuos peroraliai galėtų vartoti ligoniai, sergantys vieno ar keletos kasos lipolizinių fermentų stygiu. Šio išradimo produktai patenkina šį poreikį patys arba derinyje su kitomis lipazėmis, arba derinyje su kitais preparatais, turinčiais kitas lipazes. Be to, kai kuriems žmonių kūdikiams reikia pagerinti riebalų įsisavinimą naudojant įprastinius kūdikių maitinimo produktus arba pasterizuotą kitų žindyvių pieną iš taip vadinamų pieno bankų.

TDSL pasižymi keletu unikalių savybių, kurios ją daro idealiai tinkama pakeičiančioje ir papildančioje terapijoje. Šios savybės būtinos vartojant peroraliai. Taigi, šis fermentas atsparus slinkčiai per skrandį ir yra aktyvuojamas plonojoje žarnoje jos turiniu. Šio fermento specifinės aktyvacijos mechanizmas turėtų apsaugoti nuo rizikingos maisto ar audinių lipidų lipolizės saugojimo metu ir slinkties į veikimo vietą metu.

Plataus substratinio specifiškumo dėka jis gali sąlygoti pilną daugumos dietinių lipidų, įskaitant ir riebaluose tirpių vitaminų esterius, suvirškinimą.

TDSL gali geriau hidrolizuoti esterinius ryšius turinčias polineprisotintas riebių rūgščių ilgas grandines negu kasos nuo kolipazės priklausoma lipazė.

Esant skrandžio lipazei ir nesant arba būnant mažiems nuo kolipazės - priklausomos lipazės kiekiams, TDSL gali užtikrinti pilną triacilglicerolio suvirškinimą *in vitro*, net jeigu tulžies druskos kiekiai yra tokie maži kaip pas naujagimius. Esant TDSL, triacilglicerolio virškinimo galutinis produktas yra laisvos riebios rūgštys ir monoacilglicerolis, kurio atsiradimą sąlygoja kitos dvi lipazės [Bernback S., Bläckberg, L.a.Hernell, O. (1990) J. Clin. Invest. 221-226 (1990)]. Tai palengvina produkto rezorbciją ypač tada, kai intraluminaliniai tulžies druskos kiekiai yra maži [Hernell, O., Bläckberg, L. a. Bernbäck S. (1988) Kn. „Perinatalinis maitinimas“/ red. Lindblad, B.S./ Bristol-Myers sinpoziumas maitinimo klausimais, t. 6. pp. 259-272, Academic Press, New York; Hernell, O., Staggars, J.E. a. Carey, M.C. Biochemistry (1990), 29: 2041-2056].

Tulžies druskos-stimuliuotų lipazių (TDSL) panaudojimą papildymui, pakeitimui ar gydymui arba baltymų su pagrindinėmis TDSL savybėmis panaudojimas aukščiau paminėtiems tikslams reikalauja didelių produkto kiekių. Gamykloje gaminant šiuos produktus negalima pasikliauti natūraliais šaltiniais, tokiais kaip pienas, kad jie galėtų būti stambiamastės gamybos pradinė medžiaga. Be to, dar be aukščiau paminėtos problemos kad pasterizacijos metu TDSL inaktyvuojasi, egzistuoja dar papildoma rizika užkrėsti medžiagą iš natūralių šaltinių įvairiais infekciniais agentais, pvz., tokiais virusais kaip ŽIV ir CMV. Taigi reikalingi dideli gamybiniai produktų, pasižyminčių TDSL savybėmis, kiekiai. Pateikiamas išradimas pristato šiuos produktus ir jų gamybos būdus.

Prioritetinės publikacijos pateiktos toliau šiame aprašyme.

Šio išradimo pagrindą sudaro cDNR (komplementarios DNR), koduojančios TDSL, išskirtos iš pieno liaukos, klonavimas. Mes taip pat

išskyrėme iš žmogaus kasos dalinę cDNR, koduojančią KEH. Prielaidą, kad TDSL ir KEH yra identiškos, palaiko duomenys, gauti tiriant aminorūgščių sekas, nustatytas pagal žmogaus komplementarias DNR ir taip pat palyginant su kitų rūšių KEH.

Kaip bus aprašyta tai detaliau sekančiuose skyriuose, nustebino duomenys, gauti nustatant baltymo struktūrą pagal cDNR sekas, kuri pasirodė besanti visai skirtinga negu kitų lipazių struktūra. Netikėtai paaiškėjo, kad ši struktūra labiau panaši į tipiskų esterazių struktūrą, kaip pavyzdžiui, cholinesterazės.

Pagal Fig. 2 ir Fig. 7 paveikslus, išradimo produktai yra:

- a) baltymas, apibrėžtas 1-722 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - b) baltymas, apibrėžtas 1-535 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - c) baltymas, apibrėžtas 1-278 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - d) baltymas, apibrėžtas 1-341 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - e) baltymas, apibrėžtas 1-409 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - f) baltymas, apibrėžtas 1-474 aminorūgščių sekomis Fig. 7,
 - g) baltymų, apibrėžtų b-f, deriniai, pvz., pagal aminorūgščių sekas šiose pozicijose: 1-278, 279-341, 279-409, 279-474, 342-409, 342-474 ir 536-722,
 - h) baltymų, apibrėžtų b-g, deriniai, kombinuojant su vienu ar daugiau pakartojimų pagal Fig. 5,
 - i) baltymas, apibrėžtas a-h, turintis papildomą N-terminalinę aminorūgštį, metioniną ir funkciniu požiūriu ekvivalentiškas baltymų, apibrėžtų aukščiau paminėtais a-i, variantams ir mutantams;
- Reikia pažymėti, kad a, b, c, d, e, f, h ir i aukščiau nurodyti baltymai nebus visais aspektais identiškai natūraliai TDSL, tačiau pasižymi viena ar daugiau esminių funkcijų, kurias turi natūrali TDSL. Šios esminės funkcijos pateikiamos žemiau.
- j) DNR seka, koduojanti baltymus, nurodytus aukščiau a, b, c, d, e, f, h ir i.

k) DNR seka, nurodyta Fig. 2, apibrėžta sekančių nukleotidų numerių, nurodytų Fig. 2:

a) DNR seka 151-2316, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-722 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

b) DNR seka 151-1755 nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-533 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

c) DNR seka 151-985, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-278 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

d) DNR seka 151-1172, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-341 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

e) DNR seka 151-1376, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-409 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

f) DNR seka 151-1574, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 1-474 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

g) DNR seka 986-1172, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 279-341 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

h) DNR seka 986-1376, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 279-409 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

i) DNR seka 986-1574, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 279-474 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7,

j) DNR seka 1173-1376, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 342-409, nurodytų Fig. 7, aminorūgščių sekų,

k) DNR seka 1173-1574, nurodyta Fig. 2, koduojanti baltymą, apibrėžtą 342-474 aminorūgščių sekų, nurodytų Fig. 7.

Išradimo baltymų svarbiosios funkcijos yra:

a) tinkami peroraliniam vartojimui,

b) aktyvuojami specifinių tulžies druskų,

c) veikdami kaip ne-spezifinės lipazės, plonosios žarnos turinyje jie hidrolizuoja lipidus, nepriklausomai nuo pastarųjų cheminės sandaros bei fizinio būvio (emulsiniai, micelės, tirpūs),

- d) sugeba hidrolizuoti triacilglicerolius su riebiosiomis rūgštimis, skirtingo grandinių ilgio ir įvairaus nesotumo laipsnio,
- e) sugeba hidrolizuoti taip pat diacilglicerolį, monoacilglicerolį, cholesterol-esterius, lizofosfatidilacilglicerolį ir retenilą bei kitus riebaluose tirpius vitaminų esterius,
- f) sugeba hidrolizuoti ne tik sn - 1 (3) esterinius ryšius triacilglicerolyje, bet taip pat ir sn - 2 esterinius ryšius,
- g) sugeba sąveikauti ne tik su pirminėmis, bet taip pat ir su antrinėmis tulžies druskomis,
- h) optimalus aktyvumas priklauso nuo tulžies druskų,
- i) toks stabilumas, kad skrandžio turinys negali paveikti jokio jų kristalitinio aktyvumo,
- j) stabilumas kasos proteazių, pvz., tripsino, atžvilgiu, jeigu yra tulžies druskos,
- k) sugebėjimas jungtis prie heparino ir jo darinių, pvz., heparansulfato,
- l) sugebėjimas jungtis prie lipidų - vandens interfazės,
- m) stabilumas, leidžiantis atlikti liofilizaciją,
- n) stabilumas, esant mišinyje su tokiais maisto komponentais, kaip moters pienas arba pieno mišiniai.

Pagrindinės funkcijos, svarbios papildymui, pateikimui ir terapijai išvardintuose punktuose: a, c, d, e, f, i, j ir l. Kitiems vartojimo tikslams ne visos pagrindinės funkcijos yra būtinos.

Tam, kad būtų ekspresuoti aukščiau nurodyti baltymai, atitinkamos DNR sekos, nurodytos aukščiau, bus įterptos į tinkamus vektorius, kurie po to yra introdukuojami į tinkamo šeimininko organizmą. Minėtas vektorius turi turėti atitinkamą signalinę seką ir kitas sekas, reikalingas tam, kad po introdukcijos organizmas galėtų ekspresuoti norimą baltymą.

Tinkami organizmai ekspresijai:

Panaudojant rekombinantinius DNR metodus, galima klonuoti ir ekspresuoti norimą baltymą įvairuose prokariotiniuose ir eukariotiniuose organizmuose-šeimininkuose. Galimi ekspresijos organizmai yra bakterijos, primityvūs eukariotai (mielės), gyvūnų ląstelių kultūros, augalai ir transgeniniai gyvūnai. Kiekviena individuali sistema turi savo privalumus ir trūkumus. Paprasta išvada yra ta, kad norimo geno ekspresija kiekvienu atveju yra unikali problema ir nėra standartinių sprendimų.

Įprastinė naudojama bakterinė sistema *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*. Įprastinės naudojamos mielės yra *saccharomyces* ir *Pichia Pastoris*. Įprastinės naudojamos gyvūnų ląstelės yra CHO ir COS ląstelės. Įprastinės naudojamos vabzdžių ląstelių kultūros yra iš *Drosophila* kilusios ląstelės.

Įprastinai naudojami augalai yra tabakas. Galimi transgeniniai gyvūnai - ožka ir karvė.

Galimi bakteriniai vektoriai nukopijuojami nuo pUC ir proteino A - vektorių.

Galimas mielių vektorius nukopijuojamas nuo pMA 91.

Galimi vabzdžių vektoriai konstruojami panaudojant Baculo-virusą.

Galimi augalų vektoriai konstruojami panaudojant Ti - plazmidę.

Galimi gyvūnų ląstelių vektoriai konstruojami panaudojant SV/40.

Kiekvienoje sistemoje galima panaudoti tiek gamtinius, tiek sintetinius promotorius ir terminatorius.

Suprantama, kad priklausomai nuo pasirinktos ekspresijos sistemos, ekspresuotas baltymas gali turėti papildomą N - terminalinę aminorūgštį (metioniną), turėti kelias papildomas aminorūgštis, arba gali būti sulietas su heterologiniais baltymais (pvz., proteinu A), arba skirtis nuo gamtinio baltymo glikolizavimo charakteriu. Be to, vektoriai taip pat gali turėti ir signalines sekas tam, kad būtų galima eksportuoti baltymą į periplazmą arba kultūros terpę.

Tokiu būdu, sekantys išradimo aspektai yra šie:

- a) vektorius, turintis DNR seką, koduojančią baltymą, apibūdintą aukščiau,
- b) šeimininko organizmas, turintis DNR seką, apibūdintą aukščiau,
- c) apibūdinto aukščiau baltymo gamybos procesas, auginant šeimininko organizmą, turintį a punkte aukščiau apibūdintą vektorių, ir po to išskiriant baltymą.

Išskyrimo metodai priklauso nuo panaudotos ekspresijos sistemos (pvz., proteino A/IgG) ir/ar išskyrimo metodu, naudojamų gamtiniam fermentui išskirti, kaip tai aprašyta L. Bläckberg, O.Hernell (1981) Eur. J. Biochem., 116, 221-225.

Papildomi išradimo aspektai yra šie:

- farmacinė kompozicija, turinti savo sudėtyje aukščiau apibūdintą baltymą,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas, vartojamo pataloginės būklės, sukeltos egzokrininio kasos nepakankamumo, gydymui medikamento gamybai,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas medikamento, skirto cistinės fibrozės gydymui, gamybai,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas kūdikių maisto mišinių papildymui,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas medikamento, skirto letinio pankreatito gydymui, gamybai,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas medikamento, skirto bet kokios etiologijos blogos riebalų rezorbcijos gydymui, gamybai,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas medikamento, skirto riebaluose tirpiu vitaminų blogos rezorbcijos gydymui, gamybai,
- aukščiau apibūdinto baltymo panaudojimas medikamento, skirto fiziologinių priežasčių sukeltos (pvz., naujagimių) blogos riebalų rezorbcijos gydymui, gamybai.

Fig. 2 parodyta DNR seka, pradedant 151 pozicija iki ir įskaitant 2316 poziciją, yra seka, koduojanti visą baltymą. Seka, pradedant 2317 pozicija iki ir įskaitant 2415 poziciją, netransliuojama į baltymą, bet įeina į nurodyto 2 lentelėje žemiau egzono d sudėtį.

Vienoje iš išradimo realizacijų baltymas, apibūdintas a-i paragrafuose aukščiau, gaunamas izoliuotoje ir/arba grynoje formoje.

DNR sekos, apibūdintos a-k paragrafuose aukščiau, viename iš išradimo variantų gautos izoliuota ir/arba gryna forma.

EKSPERIMENTINĖ DALIS

Santrumpos

ar - aminorūgštis, bp - bazių pora, TDSL - tulžies druskos-stiluliuojama lipazė, c-AMF - ciklinis adenosinmonofosfatas, KEH - karboksilinė esterinė hidrolizė, Da - daltonas, c7GTF-7-deaza-2-dezoksiguanozin-5'-trifosfatas, EDTA - etilendiamintetraacetatas, kb - kilobazės, MOPS - 3-N-morfolinpropansulfon rūgštis, nt - nukleotidas, PAGE - elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje, SDS - natrio dodecilsulfatas, SSC - NaCl citratas, xGal-5-brom-4-chlor-3-indolil-B-D-galaktopiranozidas.

Fermentai

Tulžies druskos - stimuliuojama lipazė EC 3.1.1.3

Karboksilinė esterinė hidrolazė EC 3.1.1.1.

Medžiaga ir metodai

A. Fermento ir antikūnų paruošimas

TDSSL buvo išskirta iš moters pieno pagal metodą aprašytą [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225]. Tam, kad fermentas tiktų antikūnų gamybai, jis buvo išvalytas SDS-PAGE metodu. Baltymo juosta, atitinkanti lipazę, nudažius Kumasi brilliantinio melio dažais, buvo iš gelio elektroeliuota. 25 µg išvalyto fermento kartu su tokio pat kiekio Freindo adjuvanto panaudoti pirmai i.c. injekcijai, o vėliau tokio pat kiekio fermento ir nepilno adjuvanto injekcijos kartotos kas mėnesį. Praėjus 2 savaitėms po busterinės injekcijos, iš triušių buvo imamas kraujas, ir gautas serumas saugotas -20°C temperatūroje.

B. Tripsinizacijos fragmentų paruošimas ir aminorūgščių sekos analizė

3 mg išvalytos TDSSL ištirpinama 1 ml 0.1 M Tris-Cl buferio, pH 8.5, turinčio 6 M guanidinochlorido ir 2 mM EDTA. Pridedamas ditioeritritolis iki 5 mM. Inkubuojama 2 val. 37°C, po to pridedama 50 mM jodo acetato. Po 90 min. inkubacijos 25°C tamsoje redukuotas ir karboksimetilintas fermentas Sefades G-25 kolonėlėje supusiusvyrintoje 0.5 M amonio bikarbonatu, išvalomas nuo druskos. Prieš liofilizuojant pridedama 30 µg tozyl-L-fenilalanino chlormetanu paveikto jaučio tripsino (Worthington diagnostics system Inc., Freehold, NJ, USA). Liofilizuotas baltymas ištirpinamas 4 ml 0.1 M amonio bikarbonato ir papildomai pridedama 90 µg tripsino. Po 5 val. inkubacijos 37°C baltymas vėl liofilizuojamas. Po to tripsinizacijos produktas ištirpinamas 0.1% trifluoroacto rūgštyje (2mg/ml). 300 µg tripsinizuotos TDSSL chromatografuojama aukšto slėgio skysta chromatografija panaudojant C-18 atvirkščių fazių kolonėlę ir eliuojama 0-50% acetonitrilo gradientu 0.1% trifluoroacto rūgštyje. Peptidų surinkta kolekcija pastoviai tikrinta pagal absorbciją ties 215 m. Prieš sekų nustatymą (sekvenavimą) peptidai toliau valomi panaudojant

rechromatografiją toje pačioje kolonėlėje, eliuojant parinktu gradientu. Peptidų fragmentų pavyzdžiai džiovinami skystu azotu tam, kad būtų pašalintas acetonitrilas, ir po to talpinami į sekvenavimo aparatą. N-terminalinės sekos analizei natyvi TDSL ištirpinama 0.1% acto rūgšties. Sekų analizė atlikta panaudojant Applied Biosystems Inc. 477A pulsinį skystos-fazės sekvenserį ir prijungtą PTH 120A analizatorių su reguliaraus ciklo programomis ir reagentais iš gamintojo. Pradinės ir pakartotinės išeišgos, paskaičiuotos pagal standartinio baltymo, B-laktoglobulino sekos analizę, buvo 47 ir 97% atitinkamai.

C. RNR išskyrimas

Operacijų metu žmogaus kasos, riebalinio ir laktuojančios pieno liaukos audiniai tuoj pat patalpinami į guanidino tiocianatą (1-5g/50 ml). Totalinė RNR išskiriama pagal metodą, aprašytą Chirgwin [Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald R.J. a. Rutter, W.J. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299]. Poli (A)-RNR gaunama chromatografijos oligodezoksitimidilat (oligo/Dt)-celiuliozės kolonėlėje būdu [Aviv, H. a. Leder, P. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 5201-5205].

D. cDNR bibliotekų konstravimas ir skringas

Apie 15 µg poli-adenilintos RNR, išskirtos iš žmogaus kasos denatūruojama metilgyvsidabrio hidroksidu [Bailey, J.M. a. Davidson, N. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 75-85] ir nukreipiama oligo (dT) 12-18 praimeriais (Pharmacia, Uppsala, Švedija) ir atliekama atvirkštinė transkripcija pagal įprastą metodiką [Maniatis, T., Fritsch, E.F. a. Sambrook, J. (1982): Kn.: „Molekulinis klonavimas. Laboratorinis vadovas“. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York]. Antrasis siūlas susintetintas pagal Gubler ir Hoffman [Gubler, U. a. Hoffman, B.J. (1983) *Gene* 25, 263-269] metodiką, išskyrus tai, kad DNR ligazė ir β-NAD nepanaudotos ir reakcijos temperatūra buvo 15°C.

RNR perteklius pašalinamas paveikus RNaze (50 µg/ml), ir dvisiūlė cDNR paveikiama EcoRI metilaze [Maniatis T., Haldison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C. a. Qvon, D. (1978) Cell 15, 687-701]. Galai sutvarkomi paveikus Klenow fermentu. Po ligavimo su EcoRI linkeriai ir skaldymo EcoRI gauta cDNR frakcionuojama Sefarozės 4B-C1 kolonėlėje.

Frakcija precipituojama etanoliu ir cDNR liguojama į fosfatazę, paveiktą gtlI vektorių, EcoRI saitą [Young, R.A. a. Davis R.W. (1983) Science 222, 778-782]. Pakuojant *in vitro* gaunama daugiau negu 7×10^5 rekombinančių.

Moters pieno liaukos cDNR biblioteka, kilusi iš audinio, gauto iš moters su 8 mėnesių nėštumu, buvo nupirkta iš Clontech laboratories, Inc., Palo Alto, CA, JAV.

cDNR bibliotekų fagai išsėti po 5×10^4 lizės dėmės formuojančių vienetų į 120 mm lėkšteles. Antiserumas praskiestas santykiu 1:3200 ir pagal Young ir Davis metodiką [Young, R.A. a. Davis R.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 80, 1194-1198] atliktas skринingas. Ožkos-anti-triušiniai antikūnai, konjuguoti su šarmine fosfataze, naudoti kaip antriniai antikūnai (Bio-Rad, Richmond, CA JAV). Tam kad būtų išskirti klonai, atitinkantys mRNR 5' galą, atlikta nukleino rūgščių hibridizacija įprastoms sąlygomis [Maniatis, T., Fritsch, E.F. a. Sambrook, J. (1982): Kn.: „Molekulinis klonavimas. Laboratorinis vadovas“. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York], panaudojant kaip zondą subklonuotą fragmentą vieno iš imunopozityvių klonų.

E. RNR analizė

Elektroforezė atliekama 1% agarozės gelyje 40 mM MOPS buferyje pH 7.0 prieš tai denatūravus glioksaliu ir dimetilsulfoksidu [McMaster, G.K. a. Charnichael, G.G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 48 353-48 358]. Po to glioksilinta totalinė RNR pernešama ant nitroceliuliozės filtrų

[Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205]. Blotai hibridinami su TDSL ir KEH rekombinacijų subklonais, pažymėtais oligo-žymėjimo metodu [Feinberg, A.P. a. Vogelstein, B. (1983) Abalyt. Biochem. 132, 6-13].

Prehibridizacija ir hibridizacija atliekama 50% formamide 46°C [Maniatis, T., Fritsch, E.F. a. Sambrook, J. (1982): Kn.: „Molekulinis klonavimas. Laboratorinis vadovas“. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York]. Po hibridizacijos atplaunama labai stropiai (0.1% SDS ir 0.1 x SSC 60°C). (1 x SSC, 0.1 M NaCl, 0.0015 M Na₃ citrato, pH 7.6).

F. Nukleotidų sekos nustatymas

TDSL ir KEH rekombinančių kDNR intarpai buvo arba tiesiogiai klonuojami M3mp18 ir mp19, prieš tai suskaldžius ultragarsu ir išfrakcionavus pagal dydį, arba kai kurie jų buvo subklonuojami pTZ19R, prieš tai paveikus fermentais PstI, BstXI, NarI, SmaI ir AhaI. Nukleotidų seka nustatoma dideoksi grandinės - terminacijos metodu [Sanger, R., Niclen, S.A. Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467]. GC-turtingi pasikartojimai (žiūr. toliau) tai pat buvo sekvenuoti panaudojant TaqI polimerazę ir dc ⁷GTP. Sekvenuoti abu siūlai. Sekos analizuotos pagal autoradiogramas panaudojant programinę įrangą MS-EdSeg kaip aprašyta Sjöberg ir kt. metodikoje [Sjöberg, S., Carlsson, P., Enerbäck, S., a. Bjursell, G. (1989) CABIOS 5, 41-46].

G. Aminorūgščių sekų apskaičiavimas ir homologijos

Tam, kad būtų apskaičiuota aminorūgščių seka, atitinkanti cDNR intarpus, pagal Staden metodiką [Staden, R. (1984) Nucl. Acidus Res. 12, 551-567] palyginti skirtingi skaitymo rėmeliai ir pagal tai nustatytas atviras skaitymo rėmelis. Homologijų ieškoma panaudojant UWGCG programinį paketą [Devereux, J., Haeberli, P. a. Smithies, O. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 387-395].

REZULTATAI IR APTARIMAS

A. Tripsinizacijos fragmentų sekos ir TDSL N-terminalinis galas

Išvalytos TDSL tripsinizacija davė 50 fragmentų, kurie buvo nustatyti pagal pikų skaičių, gautą aukšto slėgio skysčiu chromatografijos metu (Fig. 1). Pikai surinkti ir tie pikai, kuriuos buvo galima išskirti grynus ir pakankamu kiekiu, buvo sekvenuoti. Gautos sekos parodytos 1 lentelėje. Be to, dar buvo sekvenuota 30 N-terminalinių liekanų (Fig. 2) ir jos atitiko anksčiau Abouaki ir kt. paskelbtas sekas [Abouakil, N., Rogalska, E., Bonicel, J. a. Lombardo, d. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 961, 299-388].

22 liekanų ilgio N-terminalinė seka, aprašyta Wang ir Johnson [Wang, C.-S. a. Johnson, k. (1983) *Anal. Biochem.* 133, 457-461], yra pagal mus glicinas, o pagal Wang ir Johnson - lizinas.

B. TDSL nukleotidų seka

λ gt11 cDNR bibliotekos konstravimui panaudota poliadenilinta RNR iš žmogaus kasos. Pradžioje išskirti 4 imunopozityvūs klonai ir po to ši kasos ekspresijos cDNR skrininguota panaudojant antiserumą anti-TDSL. 4 klonų nukleotidų sekos analizė parodė, kad jie puikiai atitinka mRNR 3'galą. Visi jie prasideda poli A uodega ir skiriasi tik ilgiu, ilgiausias intarpas, pažymėtas ACEH, turėjo 996 bp.

cDNR biblioteka iš moters pieno liaukos skrininguota antiserumu, o kasos klonas ACEH panaudotas kaip zondas. Skriningų metu išskirti pozityvūs klonai, kurie visi buvo kilę nuo 3'-galo. Ilgiausias pieno liaukos klonas, pažymėtas ABSSL, turi 21100 bp priešrovę. Jis talpina 4 iš sekvenuotų tripsinizacijos fragmentų (Fig. 2), tačiau neturi N-terminalinės aminorūgščių sekos. Tam, kad būtų pasiektos sekos už translacijos starto, pieno liaukos cDNR biblioteka reskrininguota panaudojant 118 bp ilgio zondą, kilusį iš ABSSL 5'-proksimalinės dalies. Išskirtas 1 klonas,

turintis tolimesnius 328 nukleotidus prieš srovę. Jis turėjo N-terminalinę rūgščių seką ir likusį tripsinizacijos fragmentą. Fig. 2 matyti, kad cDNR yra 2428 nukleotidų ilgio ir turi 81 bazę priešsrovę nuo pirmojo ATG kodono. Poliadenilinio signalas. AATAAA išsidėstęs 13 nukleotidų prieš srovę nuo poli A uodegos, o terminacijos kodonas TAG yra ties 2317 nukleotidu, o po jo seka 3'-netransliuojamas 112 bp rajonas. GC-turtingas rajonas, susidedantis iš 33 bazių 16-kos pasikartojimų, nustatytas sekos tarp 1756 ir 2283 bazių 3'-gale. Pasikartojimų nukleotidinė seka parodyta Fig. 3 ir susideda iš 6 indentiškų pasikartojimų, apsuptų 10 pasikartojimų, turinčių įvairius pakeitimų skaičius, kurie matomai atsitiko po keletos dublikacijų. Nedidelis pakeitimų skaičius leidžia prielaidą, kad šie pasikartojimai atsirado vėlai evoliucijos metu.

C. Ekspresija audiniuose

Northen blotingu išanalizuotos RNR iš moters laktuojančios pieno liaukos, kasos, riebalinio audinio ir žmogaus hepatomos ląstelių linijos HepG2. Nustatyta, kad mesendžerių dydis buvo apie 2.5 kb tiek laktuojančios pieno liaukos, tiek ir kasos. Jokio signalo neaptikta takeliuose su RNR, išskirta iš HepG2 ar riebalinio audinio (Fig. 4).

Kadangi mRNR, panaudota pieno liaukos bibliotekai gauti, buvo išskirta iš audinio moters, esančios 8 nėštumo mėnesyje, tai aišku, kad TDSL geno transkripcija, o gal transliacija yra perjungiamo dar prieš gimdymą, o tai atitinka ankstesnius pastebėjimus apie TDSL sekreciją dar prieš gimdymą [Hamosh, M. (1986) Kn.: „Kūdikių maitinimas moters pienu ir sveikata“ / Howell. R.R. Morriss, F.H. a. Pickering, L.K. red. /pp. 66-97, Charles, C Thomas, Springfield]. Žiūr. Fig. 4.

D. TDSL aminorūgščių seka

SDS-PAGE metodu nustatyta, kad molekulinė masė yra 107-125 kDa [Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a. Olivecrona, T. (1981)

FEBS Lett. 136, 284-288; Wang, C.-S. (1980) Anal. Biochem. 105, 398-402] ir analitiniu ultracentrifugavimu - 105 kDa [Wang, C.-S. a. Lee, D. M. (1983) J. Lipid. Res 26, 824-830]. Fermentas kaip galima spręsti iš cDNR, susideda iš 722 aminorūgščių liekanų (Fig. 2), kurios atitinka 76. 271 Da molekulinę masę, o pats fermentas turi 15-20% angliavandenių. Lyderinė seka yra 23 aminorūgščių liekanų ilgio. Aktyvaus saito serino liekana išsidėsčiusi serine-217 (Fig. 5). Sekos apie šį seriną atitinka sekoms, esančioms šalia serino hidrolazių aktyvaus saito [Brenner, S. (1988) Nature 334, 528-530]. Neseniai buvo pareikšta prielaida, kad bazinės liekanos, esančios arti aktyvaus saito serino, gali dalyvauti lipazėms skaldant acilglicerolių eterinius ryšius [Yang, Gu, C.-Y., Z.-W., Yang, H.-H., Rohde, M.F.Gotto. Jr., A. M. a. Pownall, H.J. (1989) J. Biol. Chem. 265, 16822-16827]. Įdomu pastebėti, kad šių liekanų nėra TDSL. Vienintelis N-glikozilinimo saitas išsidėstęs tik per 7 liekanas nuo serino. Glikozilinimo laipsnis [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225; Lombardo, D., Guy, O. a. Figarella, C. (1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 142-149] leidžia manyti, kad fermentas turi prie O prijungtą angliavandenį. Yra daug saitų, kur toks glikozilinimas galėtų vykti. Išvalyto fermento aminorūgščių sudėties tyrimai parodė didelį kiekį prolino liekanų [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225]. Aminorūgščių seka, nustatyta pagal cDNR, tai patvirtinta. Be to. dauguma prolino liekanų lokalizuota 16-oje pasikartojimų, kurių kiekvieną sudaro 11 liekanų, šie pasikartojimai sudaro fermento C-terminalinės pusės pagrindinę dalį.

E. Pieno liaukos (TDSL) ir kasos (KEH) fermentų palyginimas

Moters pieno TDSL ir žmogaus kasos KEH yra panašios, jeigu neidentiškos. Tai buvo parodyta jau anksčiau. Mūsų duomenys remia prielaidą, kad šie du fermentai yra vieno geno produktai. cDNR klonų nukleotidų seka rodo, kad kasos klonas ACEH yra identiškas pieno

liaukos klonui ABSSL, lyginant nuo poli A uodegos ir 996 bazės link 5' galo, įskaitant seką, koduojančią prolinu-turtingus pasikartojimus. Tiriant Northern blotu, RNR. išskirtoje tiek iš kasos, tiek ir iš pieno liaukos, gaunama viena 2.5 kb juosta (Fig. 4). Genominio Southern bloto rezultatai patvirtina mintį, kad vienas vienintelis genas koduoja tiek TDSL, tiek ir KEH. TDSL ir KEH judrumo SDS-PAGE skirtumas gali būti paaiškinamas skirtingu glikoziliniu ar splaisingu.

TDSL panašumas į žiurkės ir jaučio fermentus (žiūr. žemiau) ir genominio bloto rezultatai rodo, kad, matomai, skirtingi splaisingai nesąlygoja skirtingo mobilumo. Kadangi C-terminalinės sekos nebuvo patvirtintos baltymo lygyje, todėl atrodo, kad mažesnė tikimybė, kad procesingo metu KEH atskeliama C-terminaliniame gale.

Iki šiol kasos fermentai, kurie akivaizdžiai atitiko KEH, dažniausiai buvo vadinami pagal rūšį ir ypač pagal substratą, naudotą jų aktyvumui nustatyti, kaip antai: lizofosfolipazė, cholesterilesterazė, sterolesterhidrolazė, nespecifinė lipazė, karboksilinė esterinė lipazė ir cholesterilesterilesterhidrolazė. Gauti duomenys patvirtina prielaidą, kad visi šie aktyvumai kyla iš vieno ir to paties funkcinio vieneto [Bläckberg, L. (1981) Riebalų virškinimas pas naujagimį kūdikį. Umea Universiteto Medicininių disertacijų nauja serija Nr. 71; Rudd, E.A. a. Brockman, H.L. (1984) Kn.: „Lipazės /red. Borgstrom, B. a. Brockman, H.L. /pp. 184-204, Elsevier, Amsterdam]. Tai rodo platų substratinį specifiškumą ir apibūdina šiuos fermentus kaip nespecifines lipazes. Kuomet žmogaus TDSL/KEH sekos palyginamos su kasos fosfolipaze [Han, J.H., Stratowa, C., a. Rutter., W.J. (1987) Biochemistry, 26, 1617-1625] ir cholesterolesteraze iš jaučio kasos [Kyger, E., Wiegand, R., a. Lange, L. (1989) Biochem. Biophys. Res. Com. 164, 1302-1309], randamas didelis panašumas, kuris tęsiasi nuo N-terminalinio galo 530 liekanų (Fig. 5), tačiau jos labai skiriasi toje molekulės dalyje, kur aptinkami pasikartojimai. Žiurkės fermentas turi

4 pasikartojimus, o jaučio - 3. Tuo būdu žmogaus fermentas - žymiai ilgesnis peptidas.

Be to, dideli panašumai aptikti tarp TDSL ir tipiškų esterazių, pvz., keleto rūšių acetilcholinesterazių, įskaitant žmogaus ir *Drosophila*, ir karboksilesterazių (Fig. 6). Šie panašumai apima tik TDSL N-terminalinio galo 300 liekanų, kurio atkarpoje yra aktyvaus saito serino liekana. Apie panašumą į acetilcholinesterazę buvo nuspręsta iš to fakto, kad TDSL gali inhibituoti tipiški cholinesterazių inhibitoriai [Bläckberg, L. a. Hernell, O. (1981) Eur. J. Biochem 116, 221-225; Bläckberg, L. Lombardo, D., Hernell, O., Guy, O. a. Olivecrona, T. (1981) FEBS Lett. 136, 284-288; Lombardo, D., Guy, O. a. Figarella, C. (1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 142-149]. Gal būt tik išskyrus žiurkių kepenų karboksilesterazę [Cammulli, E.D., Linke M.J., Brockman, H.L. a. Hui, D.Y. (1989) Biochim. Biophys. Acta 1005, 177-182], niekas iš šių panašių fermentų neturi tokios priklausomybės nuo tulžies druskos kaip tai turi TDSL; tai leidžia daryti prielaidą, kad šios savybės struktūrinis pagrindas slypi baltymo C-terminalinėje dalyje. Be to, TDSL gali sąveikauti su emulsiniais substratais, o tai nebūtinga panašioms esterazėms. Šis aktyvumas taip pat priklauso nuo tulžies druskos.

Žmogaus TDSL sekos palygintos su kitų gerai apibūdintų žinduolių lipazių sekomis. Išskyrus sekas šalia aktyvaus saito serino (G-X-S-X-G), jokių akivaizdžių panašumų nerasta [Mickel, S., Weidenbach, F., Swarovsky, B., LaForge, S. a. Ssheele, G. (1989) J. Biol. Chem. 264, 12895-12901].

Be panašumų su kitais fermentais surasti žymūs panašumai ir su vienu, nuo c-AMF priklausomu baltymu, išskirtu iš *Dictyostelium discoideum* [Mann, S.K.O. a. Firtel, R.A. (1987) Mol. Cell Biol. 7, 458-469], o taip pat ir kelių gyvūnų rūšių tiroglobulinu (Fig. 4) [Mercken, L., Simons, M.J., Swillens, S., Masser, M. a. Vassart, G. (1985) Nature 316, 647-651; Lauro, R., Obici, S. Condliffe, D., Ursini, V.M., Musti, A., Moscatelli, C. a. Avvedimento, V.E. (1985) Eur.J.Biochem., 148, 7-11; Malthiery, Y. a.

Lissitzky, S. (1987) Eur. J. Biochem, 165, 491-498]. Panašumai tarp TDSL ir tiroglobulino, kurie apima tik aktyvaus saito rajoną, bet ne patį aktyvųjį saitą, rodo, kad šie labai konservatyvūs aminorūgščių pailginimai turi bendresnę reikšmę, negu vien tik esterazių fermentinio aktyvumo palaikymas.

Galima padaryti išvadą, kad moters pieno TDSL, susideda iš 722 aminorūgščių liekanų. Gauti duomenys patvirtina, kad jos peptidinė grandinė yra identiška kasos KEH ir kad jos abi yra koduojamos vieno ir to paties geno. Didžiausias įrodymas yra tai, kad jų tiek 3' galo, tiek N-terminalinio galo nukleotidinės sekos yra identiškos. Ryškios homologijos, aptiktos su žiurkių kasos lizofosfolipaze ir jaučio kasos cholesterol esteraze, palaiko prielaidą, kad ir šie fermentai yra funkciniai identiški. Tačiau, kaip tai ir buvo spėjama anksčiau, skirtingi molekuliniai dydžiai, randami tarp skirtingų gyvūnų rūšių šių fermentų, yra ne dėl glikozilinimo skirtumų, bet jie matomai atspindi 11 aminorūgščių pasikartojimų skirtingus skaičius. Aktyvaus saito sekų panašumas tarp šių esterazių leidžia prielaidą, kad šie baltymai kilo iš bendro protėvinio geno.

REKOMBINANTINIO BSSL EKSPRESIJA EUKARIOTŲ IR PROKARIOTŲ LASTELĖSE

1. EKSPERIMENTINĖ DALIS

Rekombinantinės plazmidės

pS146 plazmidė, turinti 2,3 kb žmogaus BSSL cDNR [Nilsson, J., Bläckberg, L., Carlsson, P., Enerbäck, S., Hernell, O. ir Bjursell, G. (1990): Eur. J. Biochem. 192, 543-550], kuri buvo klonuota su pUC19, skaidoma Hind III ir Sal I ir BSSL cDNR įterpta į jaučio papilomos viruso (BPV) ekspresijos vektorių pS147 (Fig. 1). Šis vektorius turi žmogaus BSSL cDNR, kurią kontroliuoja pelių metalotioneino 1 (mMT-1) enhanceris ir

promotoriaus elementas [Pavlakakis, G.N., ir Hamer, D.H. (1983): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 397-401]. iRNR procesingo signalai paimti iš triušio β -globino geno fragmento, apimančio dalį egzono II, introną II, egzoną III ir toliau einančius elementus. Šis transkripcinis vienetas klonuotas su vektoriumi, turinčiu visą BPV genomą. BPV ir BSSL transkripcinis vienetas transkribuojami ta pačia kryptimi. Kad vektorius galėtų daugintis *E. coli* viduje, jis taip pat turi pML2d, pBR322 darinį [Sarver, N., Byrne, J.C., ir Howell, P.M. (1982): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7147-7151].

Ekspresijos vektorius pS147 transfekuotas kartu su vektoriumi, koduojančiu atsparumo neomicinui geną, kurį reguliuoja Harvey sarkomos viruso 5'-galo ilgojo pasikartojimo ir beždžionių viruso su 40 poliadenilinio singalai [Lusky, M., ir Botchan, M.R. (1984): Cell 36, 391-401].

Tam, kad *E. coli* ekspresuotų BSSL, BSSL cDNR subklonuotas kaip NdeI-BamHI fragmentas iš pT7-7 plazmidės [Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J. G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.) in: Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York; edition of 1992)] pGEMEX-1 plazmidę (promega, Madison, WI, JAV) [Studier, F.W. ir Moffat, B.A. (1986): J. Mol. Biol. 189, 113-130]. Šioje klonavimo procedūroje T7 geno 10 koduojanti seka pakeičiama BSSL genu, koduojančiu subrendusį baltymą, ir startiniu kodonu. Galutinis ekspresijos vektorius, pGEMEX/BSSL, buvo patikrintas nustatant DNR seką, panaudojant specifinius BSSL vidinius pradmenis.

Žinduolio ląstelių kultūra ir transfekcijos

Vektoriai buvo drauge transfekuoti į pelių ląstelių liniją C127 (ATCC CRL 1616), pagal kalcio fosfato precipitacijos būdą [Graham, F.L., ir Van der Eb, A.J. (1973): Virology 52, 456-467].

C127 ląstelės augintos Ham'o F12-Dulbecco modifikuotoje Eagle'o terpėje (DMEM), (1:1) papildytoje 10% embrioninio veršiuko serumu.

Neomicinui atsparių ląstelių klonai atrinkti panaudojant $1,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ G418 ir po 10-15 dienų išaugę atsparių ląstelių klonai išskirti iš pagrindinių lėkštelių ir padauginti tyrimams.

Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos

Atliekant ekspresijos bandymus, vektorius pGEMEX/BSSL transformacijos būdu perneštas į *E. coli* JM109(DE3) ir BL21(DE3)pLysS kamienus. Ekspresijos bandymai atlikti pagal Studier ir kt. (1986) aprašymą. Surinkus bakterijų derlių, ląstelės nusodintos centrifūguojant ($5000 \times g$, 10 min prie 4°C). Ruošiant periplazmos ir citoplazmos frakcijas, centrifūgavimo nuosėdos pakartotinai suspenduotos panaudojant 4 ml 20 mM Tris-Cl/20% sacharozės, pH 8,0, 200 μl 0,1 M EDTA ir 40 μl lizocimo (15 mg/ml vandenyje) kiekvienam centrifūgavimo nuosėdų gramui. Suspensija laikyta 40 minučių ant ledo. Pridėta po 160 μl 0,5 M MgCl_2 kiekvienam centrifūgavimo nuosėdų gramui, po to suspensija centrifuguota 20 minučių prie $12000 \times g$. Gautas supernatante buvo periplazmos proteinai, o centrifūgavimo nuosėdose - citoplazmos frakcija. Ruošiant tirpiuosius baltymus, ląstelės suspenduotos 40 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluoride, pH 8,2, ir lizuojant keletą kartų šaldomos ir atšildomos bei paveikiamos ultragarsu. Ląstelių lizatas centrifuguotas ($30000 \times g$, 30 min prie 25°C).

2. REZULTATAI

BSSL iRNR ekspresija žinduolių ląstelėse

Rekombinantinių BSSL genų ekspresijos tyrimui RNR išskirta iš atskirų ląstelių linijų. Northern blotingo eksperimentai ir hibridizacija su ^{32}P -žymėtąja BSSL cDNR parodė, kad rekombinantinė iRNR aptinkama visose ląstelių linijose, priėmusiose BSSL vektorių. Kontroliniuose pavyzdžiuose, paimtuose iš ląstelių linijų, turinčių tą patį vektorių, bet be BSSL cDNR, hibridizacija nebuvo aptikta.

BSSL variantų produkavimas žinduolių ląstelėse

Surinkta terpė iš C127-ląstelių, transfekuotų pilno ilgio BSSL ir įvairiomis mutantinėmis formomis, atskirų klonų ir tirtas BSSL aktyvumas. Klonuose su didžiausia ekspresija pilno ilgio molekulės ir variantų N, B ir C aktyvumai svyravo nuo 0,7 iki 2,3 μmol riebiųjų rūgščių išlaisvinimo $\times \text{min}^{-1} \times \text{terpės ml}^{-1}$. Tai atitiko 7-23 $\mu\text{g} \times \text{terpės ml}^{-1}$ ekspresijos lygiams ir buvo artimas natyvaus pieno BSSL lyginamajam aktyvumui.

Pilno ilgio BSSL ekspresija ir biocheminis apibūdinimas *E.coli* ląstelėse

Du *E.coli* kamienai, JM109(DE3) ir BL21(DE3)pLysS (Studier ir kt., 1986), transformuoti ekspresijos vektoriumi pGEMEX/BSSL, turinčiu žmogaus BSSL cDNR, kontroliuojamą T7 promotoriaus. Transformantai iš abiejų kamienų identifikuoti, auginti ir indukuoti paveikus IPTG apie 90 min (Studier ir kt., 1986). Visos iRNR Northern blotingo analizė, naudojant BSSL cDNR kaip 32P-žymėtąjį zondą, parodė, kad ekspresija buvo produktyviai indukuota abiejuose kamienuose ir kad transkripcija buvo griežtai valdoma. Matomas rekombinantinės BSSL dydis, apytiksliai 2,4 kb, derinasi su lauktu ilgiu. Baltymo pavyzdžių atskyrimas su SDS-PAGE ir imunodetekcija su anti-BSSL antikūnais parodė, kad *E.coli* efektyviai gamina pilno ilgio BSSL. BL21(DE3)pLysS kamienas išskyrė į periplazmą daugiau proteino negu JM109(DE3).

Indukuotos su IPTG *E.coli* kultūros turėjo aktyvią tirpią BSSL, atitinkančią 0,5 - 4 μg BSSL proteino/kultūros ml. Western blotingas parodė, kad 20-60% reaguojančios medžiagos buvo netirpiose centrifūgavimo nuosėdose. Neindukuotos bakterijos nerodė jokio žymaus BSSL aktyvumo.

Užrašai, pateikiami po Fig. 1-7:

Fig. 1 TDSL tripsinizacijos produktų išskyrimas aukšto slėgio skysčių chromatografija

Išvalyta TDSL paveikta tripsinu ir chromatografuota aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodu, kaip tai aprašyta skyriuje „Medžiaga ir metodai“. Nurodyti pikai surinkti ir išvalyti rechromatografija ir nustatyta jų aminorūgščių seka.

Fig. 2 cDNR nukleotidų seka ir apskaičiuota žmogaus tulžies druskos stimuliuojamos lipazės aminorūgščių seka

cDNR yra 2428 bazių ilgio. N-terminalinė 23-kodono seka (nt82-150), prasidedanti ATG, laikoma lyderinio peptido, kadangi N-terminalinė aminorūgščių seka subrendusio baltymo prasideda 24 kodone (nt 151, Ala). Lyderinis peptidas pabrėžtas. * ženklas nurodo egzono starto tašką. # ženklas nurodo pasikartojančios dalies starto tašką.

Fig. 3 Tulžies druskos-stimuliuojamos lipazės C-terminalinio galo GC-turtingo pasikartojimų nukleotidų sekos

pakeitimai pažymėti ženklu a*

Fig. 4 Northern blot hibridizacija

Totalinės RNR, išskirtos iš moters laktuojančios pieno liaukos, kasos, riebalinio audinio ir žmogaus hepatomos ląstelių linijos (HepG2) Northern blot analizė. Totalinė RNR (10 µg) iš laktuojančios pieno liaukos (A takelis), kasos (B takelis), riebalinio audinio (C takelis) ir HepG2 (D takelis) elektroforezė 1% agarozės gelyje 40 mM MOPS buferyje, pH 7.0 po RNR denatūracijos 1 M glioksaliu, 50 % dimetilsulfoksidu ir 40 mM MOPS.

Glioksilinta RNR po to perneša ant nitroceliuliozės popieriaus hibridizacijai su (32 P) žymėta TDSL cDNR (ABSSL).

Fig. 5 Moters pieno TDSL, žiurkės kasos lizosfolipazės (Ratlpl) [Han, J.H., Stratowa, C., a. Rutter., W.J. (1987) Biochemistry, 26, 1617-1625] ir jaučio kasos cholesterolesterazės (Bovceh) [Kyger, E., Wiegand, R., a. Lange, L. (1989) Biochem. Biophys. Res. Com. 164, 1302-1309] paskaičiuotų aminorūgščių sekų palyginimas

Serino liekanos, įeinančios į aktyvaus saito sudėtį, pažymėtos a*, o # rodo vienintelį galimą baltymo glikozilinimo signalą.

Rėmeliais pažymėti tiesioginiai aminorūgščių pasikartojimai. Suderinto sekos pažymėtos didžiosiomis raidėmis, suderintos sekos tarp 2 fermentų pažymėtos mažomis raidėmis ir nesuderintos-taškeliais.

Fig. 6 TDSL pirminės struktūros palyginimas su kitu esterazių, tiroglobulino ir vieno c-AMF-priklausomo fermento, išskirto iš *Dictyostelium discoideum*, pirminėmis struktūromis

TDSL: žmogaus tulžies druskos-stimuliuojama lipazė, ChesHum: žmogaus vaisiaus audinių cholinesterazė [Prody, C., Zevin-Sonkin, D., Gnatt, A., Goldberg, O. a. Soreg, H. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3555-3559], Torpace: acetilcholinesterazė, išskirta iš *Torpedo marmorata* [Sikorav, J.L., Krejci, E. a. Massuolli, J. (1987) EMBO J. 6, 1865-1873], Droschen: karboksilinė esterinė hidrolazė, išskirta iš *Drosophila melaogaster* [Oakeshott, J.G. Collet, C., Phillis, R.W., Niolsen, K.M., Russel, R.J., Chambers, G.K. Ross, V. a. Richmond, R.C. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 84, 3359-3363], Ratlivce: karboksilinė esterazė iš žiurkės kepenų [Long, R., Satho, H., Martin, B., Kimura, S., Gonzaloz, F. a. Pohl, L. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 156, 866-873], Drosace: acetilcholinesterazė, išskirta iš *Drosophila melanogaster* [Hall, L.M.C. a.

Spierer, P. (1986) EMBO J. 5, 2949-2954], ThyrHum: žmogaus tiroglobulinas [Malthiery, Y. a. Lissitzky, S. (1987) Eur. J. Biochem, 165, 491-498] ir Dict. Di: nuo c-AMF- priklausomas fermentas, išskirtas iš *Dictyostelium discoideum* [Mann, S.K.O. a. Firtel, R.A. (1987) Mol. cell Biol. 7, 458-469]. Šių fermentų panašūs 7 skirtingi domenai. Rėmeliais pažymėtos identiškų liekanų ir mažosios raidės žymi suderintas sekas ir identišką liekaną visuose, išskyrus I, fermentuose. Taškeliu pažymėtos neatitinkančios molekulių vietos. Serino liekana, įeinanti į aktyvaus saito sandarą, pažymėta *. Dešinės pusės kampe esantis ženklas žymi kaip domenai orientuoti.

Fig. 7

rodo viso baltymo 1-722 aminorūgščių seką (vienos raidės kodas) ir nurodo a, b, c ir d egzonus. Ženklas # žymi pasikartojančios dalies pradžią.

1 lentelė TDSL peptidų aminorūgščių seka

Peptido Nr. 26 sekvenavimo metu (1 ir 2 ciklai) neidentifikuotos liekanos dėl gautų pikų interferacijos. Peptido numeris atitinka piko numerį, nurodytą Fig. 1.

TRIPSINIZACIJOS FRAGMENTAI	
TP16:	LysValThrGluGluAspPheTyrLys
TP19:	GlyIleProPheAlaAlaProThrLys
TP20:	LeuValSerGluPheThrIleThrLys
TP24:	ThrTyrAlaTyrLeuPheSerHisProSerArg
TP26:	PheAspValTyrThrGluSerTrpAlaGluAsp ProSerGlnGluAsnLys

2 lentelė a, b, c ir d egzonų identifikavimas
(numeravimas kaip Fig. 2 ir 7)

egzonas	lokalizacija	
	tarp nukleotidų nr.	tarp aminorūgščių nr.
a	986-1172	279-341
b	1173-1376	342-409
c	1377-1574	410-474
d	1575-2415	475-722
visas baltymas	151-2316	1-722
visas baltymas be pasikartojimų	151-1755	1-535

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 722 pozicijos.
2. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 535 pozicijos.
3. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 278 pozicijos.
4. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 341 pozicijos.
5. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 409 pozicijos.
6. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 474 pozicijos.
7. Baltymas, parodytas Fig. 7, nuo 1 iki 278 pozicijos, nuo 279 iki 341 pozicijos, nuo 279 iki 409 pozicijos, nuo 279 iki 474 pozicijos, nuo 342 iki 409 pozicijos, nuo 342 iki 474 pozicijos arba nuo 536 iki 722 pozicijos.
8. Baltymas pagal bet kurį iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra derinyje su vienu ar daugiau pasikartojimų, nurodytų Fig. 5.
9. Baltymas pagal bet kurį iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi metioniną kaip papildomą N-terminalinę aminorūgštį.
10. Baltymas pagal bet kurį iš 1-9 punktų b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasižymi viena ar keliomis esminėmis gamtinės tulžies druskos-stimuliuojamos lipazės funkcijomis.
11. Išskirta DNR molekulė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad koduoja baltymą su aminorūgščių seka pagal 1 punktą.
12. Išskirta DNR molekulė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad koduoja baltymą su aminorūgščių seka pagal 2 punktą.
13. Išskirta DNR molekulė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad koduoja baltymą su aminorūgščių seka pagal bet kurį iš 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ir 10 punktų.
14. Išskirta DNR molekulė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra apibrėžta sekančiais nukleotidų numeriais nurodytais Fig. 2:

151 - 2316

151 - 1755

151 - 985

151 - 1172

151 - 1376

151 - 1574

986-1172

986 - 1376

986 - 1574

1173 - 1376

1173 - 1574

15. Vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi DNR seką, koduojančią baltymą pagal 1-10 punktus.
16. Vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi DNR seką pagal 11-14 punktus.
17. Šeimininko organizmas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuotas vektoriumi pagal 15 ar 16 punktus.
18. Baltymo pagal 1-10 punktus gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad auginamas šeimininko organizmas turintis vektorių pagal 15 ar 16 punktą, ir išskiriamas baltymas.
19. Vaistinė sudėtis, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi baltymą pagal bet kurį iš 1-10 punktų.
20. Vaistinė sudėtis, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi baltymą pagal bet kurį iš 1-10 punktų derinyje su lipaze ar su preparatais, turinčiais lipazes.
21. Kūdikių maisto mišinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi baltymo pagal bet kurį iš 1-10 punktų priedą.
22. DNR seka pagal 11-14 punktus, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad naudojama grynu pavidalu.

23. DNR seka pagal 11-14 punktus, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra išskirtoje formoje.

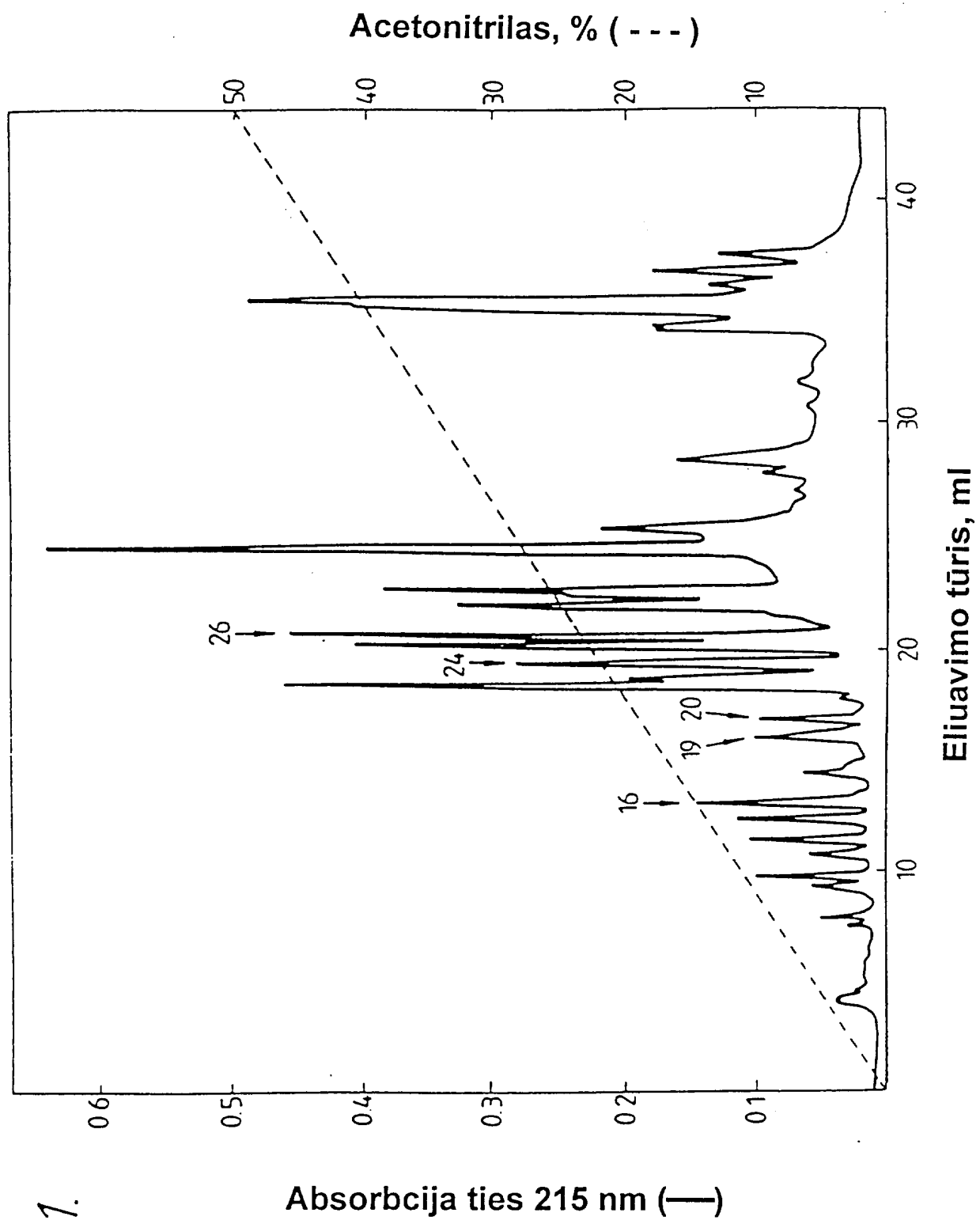


Fig. 2 (1/4)

ACCTTCTGTA TCAGTTAAGT GTCAAGATGG AAGGAACAGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG	60
AGTTTATTCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT	111
Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val	
1 5 10	
GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG	159
Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu	
15 20 25	
GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG	207
Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys	
30 35 40	
CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC	255
Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe	
45 50 55	
GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG	303
Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp	
60 65 70	
CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC	351
Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala	
75 80 85 90	
ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC	399
Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu	
95 100 105	
AAC ATT TGG GTG CCC CAG GGC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC	447
Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro	
110 115 120	
GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT	495
Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His	
125 130 135	
GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC	543
Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala	
140 145 150	
ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC	591
Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro	
155 160 165 170	
CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC	639
Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly	
175 180 185	

Fig. 2(2/4)

CTT	CGG	GAT	CAG	CAC	ATG	GCC	ATT	GCT	TGG	GTG	AAG	AGG	AAT	ATC	GCG	687
Leu	Arg	Asp	Gln	His	Met	Ala	Ile	Ala	Trp	Val	Lys	Arg	Asn	Ile	Ala	
			190					195					200			
GCC	TTC	GGG	GGG	GAC	CCC	AAC	AAC	ATC	ACG	CTC	TTC	GGG	GAG	TCT	GCT	735
Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	
		205					210					215				
GGA	GGT	GCC	AGC	GTC	TCT	CTG	CAG	ACC	CTC	TCC	CCC	TAC	AAC	AAG	GCC	783
Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Lys	Gly	
		220				225					230					
CTC	ATC	CGG	CGA	GCC	ATC	AGC	CAG	AGC	GGC	GTG	GCC	CTG	AGT	CCC	TGG	831
Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Pro	Trp	
235					240				245						250	
GTC	ATC	CAG	AAA	AAC	CCA	CTC	TTC	TGG	GCC	AAA	AAG	GTG	GCT	GAG	AAG	879
Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	
				255					260					265		
GTG	GGT	TGC	CCT	GTG	GGT	GAT	GCC	GCC	AGG	ATG	GCC	CAG	TGT	CTG	AAG	927
Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln	Cys	Leu	Lys	
			270					275					280			
GTT	ACT	CAT	CCC	CGA	GCC	CTG	ACG	CTG	GCC	TAT	AAG	GTG	CCG	CTG	GCA	975
Val	Thr	His	Pro	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	Pro	Leu	Ala	
		285					290					295				
			*													
GGC	CTG	GAG	TAC	CCC	ATG	CTG	CAC	TAT	GTG	GGC	TTC	GTC	CCT	GTC	ATT	1023
Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met	Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val	Pro	Val	Ile	
	300					305					310					
GAT	GGA	GAC	TTC	ATC	CCC	GCT	GAC	COG	ATC	AAC	CTG	TAC	GCC	AAC	GCC	1071
Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro	Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ala	
315					320					325				330		
GCC	GAC	ATC	GAC	TAT	ATA	GCA	GGC	ACC	AAC	AAC	ATG	GAC	GGC	CAC	ATC	1119
Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp	Gly	His	Ile	
				335				340					345			
TTC	GCC	AGC	ATC	GAC	ATG	CCT	GCC	ATC	AAC	AAG	GGC	AAC	AAG	AAA	GTC	1167
Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met	Pro	Ala	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	Lys	Lys	Val	
			350				355					360				
			*													
ACG	GAG	GAG	GAC	TTC	TAC	AAG	CTG	GTC	AGT	GAG	TTC	ACA	ATC	ACC	AAG	1215
Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Thr	Ile	Thr	Lys	
		365					370					375				
GGG	CTC	AGA	GGC	GCC	AAG	ACG	ACC	TTT	GAT	GTC	TAC	ACC	GAG	TCC	TGG	1263
Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr	Glu	Ser	Trp	
	380					385					390					

Fig. 2(3/4)

GCC CAG GAC CCA TCC CAG GAG AAT AAG AAG AAG ACT GTG GTG GAC TTT Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe 395 400 405 410	1311
GAG ACC GAT GTC CTC TTC CTG GTG CCC ACC GAG ATT GCC CTA GCC CAG Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln 415 420 425	1359
*	
CAC AGA GCC AAT GCC AAG AGT GCC AAG ACC TAC GCC TAC CTG TTT TCC His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser 430 435 440	1407
CAT CCC TCT CGG ATG CCC GTC TAC CCC AAA TGG GTG GGG GCC GAC CAT His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His 445 450 455	1455
GCA GAT GAC ATT CAG TAC GTT TTC GGG AAG CCC TTC GCC ACC CCC ACG Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr 460 465 470	1503
GGC TAC CGG CCC CAA GAC AGG ACA GTC TCT AAG GCC ATG ATC GCC TAC Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr 475 480 485 490	1551
*	
TGG ACC AAC TTT GCC AAA ACA GGG GAC CCC AAC ATG GGC GAC TCG GCT Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala 495 500 505	1599
GTG CCC ACA CAC TGG GAA CCC TAC ACT ACG GAA AAC AGC GGC TAC CTG Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu 510 515 520	1647
GAG ATC ACC AAG AAG ATG GGC AGC AGC TCC ATG AAG CGG AGC CTG AGA Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg 525 530 535	1695
ACC AAC TTC CTG CGC TAC TGG ACC CTC ACC TAT CTG GCG CTG CCC ACA Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr 540 545 550	1743
#	
GTG ACC GAC CAG GAG GCC ACC CCT GTG CCC CCC ACA GGG GAC TCC GAG Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu 555 560 565 570	1791
GCC ACT CCC GTG CCC CCC ACG GGT GAC TCC GAG ACC GCC CCC GTG CCG Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro 575 580 585	1839
CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser 590 595 600	1887

Fig. 2 (4/4)

GGG GCC CCC CCC TTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG Gly Ala Pro Pro Leu Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val 605 610 615	1935
CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp 620 625 630	1983
TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro 635 640 645 650	2031
GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGC GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly 655 660 665	2079
GAC GCC GGG CCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGC GCC CCC Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro 670 675 680	2127
CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG ACC CCC ACG Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr 685 690 695	2175
GGT GAC TCC GAG ACC GCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala 700 705 710	2223
CCC CCT GTG CCC CCC ACG GGT GAC TCT GAG GCT GCC CCT GTG CCC CCC Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro 715 720 725 730	2271
ACA GAT GAC TCC AAG GAA GCT CAG ATG CCT GCA GTC ATT AGG TTT Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe 735 740 745	2316
TAGCGTCCCA TGAGCCTTGG TATCAAGAGG CCACAAGAGT GGGACCCCAG GGGCTCCCCCT	2376
CCCATCTTGA GCTCTTCTG AATAAAGCCT CATACCCCTA AAAAAAAAAA AA	2428

Fig. 3.

		Pakeitimų skaičius
GAGGCCACCCCTGTGCCCCCACAGGGGACTCC	1	6
* * *		
GAGGCCACTCCCGTGCCCCCAGGGGTGACTCC	2	4
* * *		
GAGACCGCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	3	3
* * *		
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	4	0
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	5	0
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	6	0
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	7	0
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	8	0
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	9	0
GGCGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACGCC	10	2
* *		
GGGCCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	11	1
*		
GGCGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	12	1
*		
GGGGCCCCCCCCGTGACCCCCACGGGTGACTCC	13	2
* *		
GAGACCGCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	14	3
* * *		
GGGGCCCCCCTGTGCCCCCAGGGGTGACTCT	15	3
*		
GAGGCTGCCCCCTGTGCCCCCAGATGACTCC	16	7
* ** * * * *		
GGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCC	Suderinta seka	

Identiška
suderintai sekai

Fig. 4.

A B C D Kb



ϕ 3.0

ϕ 2.0

ϕ 1.5

Fig. 5 (1/3)

50
 Bssl MLTMGRLQLVVLGLTCCWAVASAAKLGAVYTEGGFVEGVNKKLGLLG.DS
 Ratlpl ...MGRLEVLFGLTCCLAACAAGALYTEGGFVEGVNKKLSLLGGDS
 BovcehMLGASRLGSPGCLAVASAAKLGSVYTEGGFVEGVNKKLSLFG.DS

Suderinta sekagrl....lgltcclaaaaAAKLGavYTEGGFVEGVNKKLSlLG.DS

100
 Bssl VDIFKGIPFAAPTKALENPQPHPGWQGTCLKAKNFKKRCLOATITQDSTYG
 Ratlpl VDIFKGIPFA.TAKTLENPQRHPGWQGTCLKATQFKKRCLOATITQDDTYG
 Bovech VDIFKGIPFAAAPKALEKPKRHPGWQGTCLKAKSFKKRCLOATLTQDSTYG

Suderinta seka VDIFKGIPFAa..KaLEnPqrHPGWQGTCLKak.FKKRCLOATiTQDsTYG

150
 Bssl DEDCLYLNIWVPQGRKQVSRDLPVMIWIYGGAFLMGSGBGANFLNNYLYD
 Ratlpl QEDCLYLNIWVPQGRKQVSHDLPVMVWIYGGAFLMGSGQGANFLKNYLYD
 Bovceh NEDCLYLNIWVPQGRKEVSHDLPVMIWIYGGAFLMGASQGANFLSNYLYD

Suderinta seka .EDCLYLNIWVPQGRKqVShDLPVMiWIYGGAFLMGsgqGANFL.NYLYD

200
 Bssl GKKIATRGNVIVVTFNYRVGPLGFLSTGDANLPGNYGLRDQHMAIAWVKR
 Ratlpl GKKIATRANVIVVTFNYRVGPLGFLSTGDANLPGNFGLRDQHMAIAWVKR
 Bovech GKKIATRGNVIVVTFNYRVGPLGFLSTGDSNLPGNYGLWDQHMAIAWVKR

Suderinta seka GKKIATRgNVIVVTFNYRVGPLGFLSTGDaNLPgNyGLrDQHMAIAWVKR

* 250
 Bssl NIAAFGGDPNNITLFGESAGGASVSLQTLSPYNKGLIRRAISQSGVALSP
 Ratlpl NIAAFGGDPNNITIFGESAGGAIVSLQTLSPYNKGLIRRAISQSGVALSP
 Bovceh NIEAFGGDPDNITLFGESAGGASVSLQTLSPYNKGLIKRGISQSGVGLCP

Suderinta seka NIaAFGCDPDNITLFGESAGGAsVSLQTLSPYNKGLIrRaISQSGVaLsP

300
 Bssl WVIQKNPLFWAKKVAKKVGCPCVGDARMAQCLKVTDPRALTLAYKVPLAG
 Ratlpl WAIQENPLFWAKTIAKKVGCPTEDTAKMAGCLKITDPRALTLAYRLPLKS
 Bovech WAIQQDPLFWAKRIAKKVGCPVDDTSKMAGCAKITDPRALTLAYKLPLGS

Suderinta seka WaIQ.nPLFWAK.iAKKVGCPv.DtakMAGClKiTDPRALTLAYklPL.s

350
 Bssl LEYPMLHYVGFVPVIDGDFIPADPINLYANAADIDYIAGTNNMDGHIFAS
 Ratlpl QEYPIVEYLAFIGVVDGDFIPDDPINLYDNAADIDYLAGINDMDGHLFAT
 Bovceh TEYPKLHYLSFVPVIDGDFIPDDPVNLYANAADVYIAGTNDMDGHLFVG

Suderinta seka .EYP.lHYl.FvPViDGDFIPdDPiNLYaNAADiDYiAGtNdMDGHlFa.

Fig. 5 (2/3)

400

Bssl	IDMPAINKGNKKVTEEDFYKLVSEFTITKGLRGAKTTFDVYTESWAQDPS
Ratlpl	VDVPAIDKAKQDVTEEDFYRLVSGHTVAKGLKGTQATFDIYTESWAQDPS
Bovech	MDVPAINSNKQDVTEEDFYKLVSGLTVTKGLRGANATYEVYTEPWAQDSS

Suderinta seka .DvPAInk.kqdVTEEDFYKLVsg.TvtKGLrGa.aTfdvYTESWAQDps

450

Bssl	QENKKKTVVDFETDVLFLVPTEIALAQHRANAKSAKTYAYLFSHPSRMPV
Ratlpl	QENMKKTVVAFETDILFLIPTEMALAQHRAHAKSAKTYSYLFSHPSRMPI
Bovceh	QETRKKTMVDLETDILFLIPTKIAVAQHKSHAKSANTYTYLFSQPSRMPi

Suderinta seka QEn.KKTvVdfETDiLFLiPTeiAlAQHrahAKSAKTY.YLFSHPSRMPi

500

Bssl	YPKWVGADHADDIQQYVFGKPFATPTGYRPQDRTVSKAMIAWNTNFAKTGD
Ratlpl	YPKWMGADHADDLQYVFGKPFATPLGYRAQDRTVSKAMIAWNTNFAKSGD
Bovech	YPKWMGADHADDLQYVFGKPFATPLGYRAQDRTVSKAMIAWNTNFARTGD

Suderinta seka YPKWmGADHADDlQYVFGKPFATPlGYRaQDRTVSKAMIAWNTNFAktGD

550

Bssl	PNMGDSAVPTHWEPTYTTENSGYLEITKKMGSSSMKRSRLTNFLRYWTLTY
Ratlpl	PNMGNSPVPTHWYPYTMENGNLYLDINKKITSTSMKEHLREKFLKFWAVTF
Bovceh	PNTGHSTVPANWDPYTLEDDNYLEINKQMDSNSMKLRTLNTNYLQFWTQTY

Suderinta seka PNnG.S.VPthW.PYT.Kn.nYleInKkm.S.SMK.hLRtnfL.fwt.Ty

596

Bssl	LALPTVTDQ	EATVPVPPTGDS	EATVPVPPTGDS	ETAPVPPTGDS	GAPP
Ratlpl	EMLPTV...	VGDHTPPKDDS	EAAPVPPTDDS	DGGVPVPPTDDS	QTPP
Bovech	QALPTVTSA	GASLLPPEDNS	QASPVPPADNS	GAPTEPSAGDS	

Suderinta seka .aLPTVt....a...PP.ddS.eA.PVPPTddS....pvPptgDS....p

642

Bssl	VPPTGDS	GAPPVPPTGDS	GAPPVPPTGDS	GAPPVPPTGDS	GAPPVP
Ratlpl	VPPTDNS	QA.....			
Bovceh					

Suderinta sekas..a.....

Fig.5 (3/3)

					689
Bssl	PTGDS	GAPPVPPTGDS	GAPPVPPTGDS	GPPPVTPTGDS	GAPPVPPTG
Rarlp1					
Bovech					
Suderinta seka					

					735
Bssl	DS	GAPPVTPTGDS	ETAPVPPTGDS	GAPPVPPTGD	SEAAPVPPTDDS
Ratlp1	..				GDS
Bovceh	..				
Suderinta seka					ds

Bssl	KE.AQMPAVIRF
Ratlp1	VE.AQMPGPIGF
Bovech	.EVAQMPVVIGF

Suderinta seka .e.AQMP.vIgF

1
 (76-90)
 BSSL
 (116-130)
 ChesHum
 (114-128)
 Torpace
 (101-115)
 Drosceh
 (103-117)
 Ratlivce
 (224-238)
 Drosace
 (2257-2270)
 ThryHum
 (90-114)
 Dict.Di

G	D	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	V	P	Q	G
L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	A	P
M	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	V	P	S	P
G	E	E	D	C	L	T	V	S	V	Y	K	P	K	N
F	S	E	D	C	L	Y	I	N	V	W	A	P	A	K
V	S	E	D	C	L	Y	L	N	V	W	A	P	A	K
V	S	E	D	C	L	Y	L	N	V	F	I	P	Q	.
A	Q	K	C	N	L	G	P	G	V	C	S	P	M	G

Fig.6(1/3)

Suderinta seka . s e d c L y l n v w . P . .

2
 (95-113)
 BSSL
 (134-150)
 ChesHum
 (132-150)
 Torpace
 (118-136)
 Drosceh
 (121-138)
 Ratlivce
 (273-291)
 Drosace
 (2270-2291)
 ThryHum
 Dict.Di

S	R	D	L	P	V	M	I	W	I	Y	G	G	A	F	L	M	G	S
P	K	D	A	T	V	L	I	W	I	Y	G	G	G	F	Q	T	G	T
P	K	S	A	T	V	M	L	W	I	Y	G	G	G	F	Y	S	G	S
R	N	S	F	P	V	V	A	H	I	H	G	G	A	F	M	F	G	A
N	S	R	L	P	V	M	V	W	I	H	G	G	G	L	I	I	G	G
T	N	G	L	P	I	L	I	W	I	Y	G	G	G	F	M	T	G	S
A	P	N	A	S	V	L	V	F	F	H	N	T	M	D	R	E	E	S

Suderinta seka . . . l p v . . w i y g g g f . . g s

3
 (135-156)
 BSSL
 (166-187)
 ChesHum
 (164-185)
 Torpace
 (150-171)
 Drosceh
 (153-174)
 Ratlivce
 (307-328)
 Drosace
 (2307-2328)
 ThryHum
 (118-136)
 Dict.Di

N	V	I	V	V	T	F	N	Y	R	V	G	P	L	G	F	L	S	T	G	D	A
R	V	I	V	V	S	M	N	Y	R	V	G	A	L	G	F	L	A	L	P	G	N
E	V	V	L	V	S	L	S	Y	R	V	G	A	F	G	F	L	A	L	H	G	S
K	F	I	L	V	K	I	S	Y	R	L	G	P	L	G	F	V	S	T	G	D	E
N	V	V	V	V	T	I	Q	Y	R	L	G	F	G	G	L	F	S	T	G	D	E
N	V	I	V	A	S	F	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	L	H	L	A	P	E
N	L	I	V	V	T	A	S	Y	R	V	G	V	F	G	F	L	S	S	G	S	G
S	V	I	V	V	T	I	N	Y	R	L	G	I	L	G	L	M	G	T	.	.	.

Suderinta seka n v i v v t f n Y R v g . . G f l s t g d .

Fig. 6 (2/3)

4

(157-182)

BSSL

(189-214)

ChesHum

(187-212)

Torpace

(172-197)

Drosceh

(175-200)

Ratlivce

(336-361)

Drosace

(2329-2354)

ThryHum

Dict.Di

N	L	P	G	N	Y	G	L	R	D	Q	H	M	A	I	A	W	V	K	R	N	I	A	A	F	G
E	A	P	G	N	M	G	L	F	D	Q	Q	L	A	L	Q	W	V	Q	K	N	I	A	A	F	G
E	A	P	G	N	M	G	L	L	D	Q	R	M	A	L	Q	W	V	H	D	N	I	Q	F	F	G
D	L	P	G	N	Y	G	L	K	D	Q	R	L	A	L	K	W	I	K	Q	N	I	A	S	F	G
H	S	R	G	N	W	A	H	L	D	Q	L	A	A	L	R	W	V	Q	D	N	I	A	N	F	G
E	A	P	G	N	V	G	L	W	D	Q	A	L	A	I	R	W	L	K	D	N	A	H	A	F	G
E	V	S	G	N	N	G	L	L	D	Q	V	A	A	L	T	W	V	O	T	H	I	R	G	F	G

Suderinta seka e l p G N w q l l D Q . . A l . W v . d n i a a F G

5

(183-207)

BSSL

(215-239)

ChesHum

(213-237)

Torpace

(198-222)

Drosceh

(201-225)

Ratlivce

(362-386)

Drosace

(2354-2379)

ThryHum

(137-149)

Dict.Di

G	D	P	N	N	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	A	S	V	S	L	Q	T	L	S	P
G	N	P	K	S	V	T	L	F	G	E	S	A	G	A	A	S	V	S	L	H	L	L	S	P
G	D	P	K	T	V	T	L	F	G	E	S	A	G	G	A	S	V	G	M	H	I	L	S	P
G	E	P	O	N	V	L	L	V	G	H	S	A	G	G	A	S	V	H	L	Q	M	L	R	E
G	N	P	D	S	V	T	I	F	G	E	S	A	G	G	V	S	V	S	A	L	V	L	S	P
G	N	P	E	W	M	T	L	F	G	E	S	A	G	S	S	S	V	N	A	Q	L	M	S	P
G	P	P	R	R	V	S	L	A	A	D	R	G	G	A	D	V	A	S	I	H	L	L	T	A
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	A	F	S	V	S	A	H	L	T

Suderinta seka G d P . n v t l f g e s a G g a s v s i . l l s p

Fig.6 (3/3)

6

(208-231)
BSSL
(240-263)
ChesHum
(238-261)
Torpace
(223-246)
Drosceh
(226-249)
Ratlivce
(387-410)
Drosace
(2382-2402)
ThryHum
(150-173)
Dict.Di

Y	N	K	G	L	I	R	R	A	I	S	Q	S	G	V	A	L	S	P	W	V	I	Q	K
G	S	H	S	L	F	T	R	A	I	L	Q	S	G	S	F	N	A	P	W	A	V	T	S
G	S	R	D	L	F	R	R	A	I	L	Q	S	G	S	P	N	C	P	W	A	S	V	S
D	F	G	Q	L	A	R	A	A	F	S	F	S	G	N	A	L	D	P	W	V	I	Q	K
L	A	K	N	L	F	H	R	A	I	S	E	S	G	V	V	L	T	T	N	L	D	K	K
V	T	R	G	L	V	K	R	G	M	M	Q	S	G	T	M	N	A	P	W	S	H	M	T
T	N	S	Q	L	F	R	R	A	V	L	M	G	G	S	A	L	S	P	A	A	V	I	S
Y	S	R	Q	Y	F	N	A	A	I	S	S	S	S	P	L	T	V	G	L	K	D	K	T

Suderinta seka

n k g L f r r a i . q s G s a l s p w a i q .

7

(285-297)
BSSL
(316-328)
ChesHum
(314-326)
Torpace
(298-310)
Drosceh
(298-306)
Ratlivce
(466-477)
Drosace
(2458-2468)
ThryHum
(224-236)
Dict.Di

V	G	F	V	P	V	I	D	G	D	F	I	P
V	N	F	G	P	T	V	D	G	D	F	L	T
F	S	F	V	P	V	I	D	G	E	F	F	P
A	P	F	S	P	V	L	E	P	S	D	A	P
.	.	.	.	T	V	I	D	G	V	V	L	P
P	S	.	A	P	T	I	D	G	A	F	L	P
.	.	W	G	P	V	I	D	G	H	F	L	R
T	I	W	S	P	V	I	D	G	D	A	F	I

Suderinta seka

. . f . p v . d g d f . p

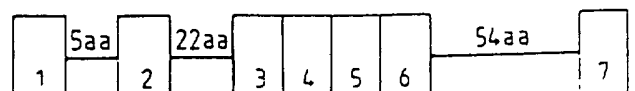


Fig. 7.

10	30	50
AKLGAVYTEGGFVEGVNKKLGLLGDSVDIFKGIPFAAPTKALENPQHPGWQGTILKAKNF		
70	90	110
KKRCLQATITQDSTYGDEDCLYLNIWVPQGRKQVSRDLPVMIWIYGGAFLMGSGHGANFL		
130	150	170
NNYLYDGEEIATRGNVIVVTFNYRVGPLGFLSTGDANLPGNYGLRDQHMAIAWVKRNIAA		
190	210	230
FGGDPNNITLFGESAGGASVSLQTLSPYNKGLIRRAISQSGVALSPWVIQKNPLFWAKKV		
250	270	290
AEKVGCPVGDAARMAQCLKVTDPRALTLAYKVPLAGLEYPMLHYVGFPVIDGDFIPADP		
310	330	350
INLYANAADIDYIAGTNNMDGHIFASIDMPAINKGNKKVTEEDFYKLVSEFTITKGLRGA		
370	390	410
KTTFDVYTESWAQDPSQENKKKTVDVFETDVLFLVPTEIALAQHRANAKSAKTYAYLFSH		
----- exon-b -----		
430	450	470
PSRMPVYPKWVGADHADDIQYVFGKPFATPTGYRPQDRTVSKAMIAWTFNAKTGDPNMG		
----- exon c -----		
490	510	530
DSAGPTHWEPTYTENS GYLEITKMGSSSMKRSRLRTNFLRYWTLTYLALPTVTDQEATPV		
----- exon d ----- # -----		
550	570	590
PPTGDSEATPV PPTGDSETAPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGD		
610	630	650
SGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDAGPPPVPPTGDSGAPP		
670	690	710
VPPTGDSGAPPVTPTGDSETAPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPPVPPTGDSGAPP		