

(11) Patent numeris: **4063**

(51) Int.Cl.⁵: **C12P 21/00,**
C12N 15/00,
C12Q 1/00,
C07H 15/12

(21) Paraiškos numeris: **IP1818**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 11 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 90/04916, 1990 08 29 SU 4895662, 1991 04 29**

(31,32,33) Prioritetas: **400591, 1989 08 30, US 490004, 1990 03 07, US**
570189, 1990 08 20, US

(72) Išradėjas:

Andreas Hohn, US
Joachim Leibrock, DE
Karen Bailey, DE
Yves-Alain Barde, DE
Hans Friedrich Erwin Thoenen, DE
Peter Maisonpierre, DE
Mark E. Furth, US
Ronald M. Lindsay, US
George D. Yancopoulos, US

(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 40763, ATCC 40764, ATCC 40765, ATCC 40766, US

- (54) Pavadinimas:
Neurotrofino-3 genas, jo produktai ir jų gavimo būdas

- (57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su neurotrofinu-3 (NT-3), nauju smegenų neurotrofinio faktoriaus (BDNF) genų šeimos nariu. Jis remiasi, dalinai, homologinių BDNF ir nervų augimo faktoriaus (NGF) sričių nukleino rūgščių sekose identifikavimu. Pagal šį išradimą, šios homologinės sritys gali būti panaudojamos naujų BDNF/NGF genų šeimos narių identifikavimui; tokia metodika buvo panaudota identifikuojant NT-3. Šio išradimo pagalba galima gauti naujų, giminingų BDNF/NGF, neurotrofinių faktorių, identifikuočių šiais metodais, genus ir genų produktus. Pagal šį išradimą NT-3 gali būti panaudotas diagnostikoje ir/arba neurologinių susirgimų gydymui, įskaitant Alchaimerio ir Parkinsono ligas. Kadangi buvo nustatytas naujas NT-3 aktyvumo spektras, skirtingai, nei BDNF ir NGF, tai NT-3 suteikia naujas vertingas galimybes atgaivinant ir regeneruojant centrinę nervų sistemą.

Šis išradimas yra apie neurotropiną-3 (NT-3), naują smegenų neurotrofinio faktoriaus/nervų augimo faktoriaus (BDNF/NGF) genų šeimos neurotrofinių faktorių. Genas, koduojantis NT-3, buvo klonuotas ir sekvenuotas; rekombinantinis NT-3 buvo ekspresuotas žinduolių ląstelėse. Buvo nustatyta, kad NT-3 turi įvairiapusį biologinį aktyvumą, jis skirtingas nei BDN ir NGF. Šio išradimo dėka gaunamos nukleino rūgščių sekos, koduojančios NT-3, kurių pagalba gaunami išgrynintas NT-3 baltymas, peptidų fragmentai arba dariniai; o taip pat antikūnai prieš NT-3 baltymą ir šių antikūnų dariniai. Geno, koduojančio NT-3 baltymą, produktai gali būti panaudojami diagnostikai, neurologinių sutrikimų gydymui, tame tarpe: periferinės neuropatijos, Alchaimeiro ligos ir Parkinsono ligos.

2. Išradimo ištakos

2.1. Neurotrofinių faktorių vaidmuo nervų sistemoje

Nervų sistemos vystymasis ir veikla priklauso nuo baltymų, žinomų kaip neurotrofiniai faktoriai. Normalų centrinės ir periferinės nervų sistemų vystymąsi lydi dideliu mastu vykstantis neuronų ląstelių žuvimas, akivaizdu, kad tai labai svarbus procesas, kurio pagalba reguliuojamas neuronų skaičius, kurie apsaugo taikinio sritį (Berg, D.K., 1982, Neuronal Development, 297-331; Couvant ir kt.; 1984, 225, 1258-65). Tiriant vystymosi metu periferinius taikinio audinius, juos ekstirpuojant ir transplantuojant, buvo nustatyta, kad neuronų ląstelės žūsta, konkuruojant neuronams dėl juos palaikančių faktorių ("neurotrofinių faktorių"), kurie yra sintetinami jų apsaugos srityse. Šių pastebėjimų dėka buvo identifikuotas nervų augimo faktorius (NGF), kuris geriausiai yra charakterizuotas (Levi-Montalcini ir Angeletti P., U., 1988, Physiol. Rev., 48, 534-69; Thanen H., ir Barole J., A., 1980, Physiol. Rev.,

60, 1284-335). Išsiaiškinti NGF vaidmenį ir veikimo mechanizmą žymiai palengvino tai, kad buvo surastas šiuo baltymu turtingas šaltinis - pelės patino pažandės liaukos. Tai įgalino išgryninti šį baltymą ir jį klonuoti (Ullrich ir kt., 1983, Nature, 303, 821-5, Scott ir kt., 1983, Nature, 302, 538-40), o taip pat gauti neutralizuojančius antikūnus prieš šį baltymą. NGF palaiko tik ribotą skaičių neuronų, todėl buvo postuliuota, kad egzistuoja ir kiti neurotrofiniai faktoriai (Varon S. ir Adler R., 1981, Adv. Cellular Neurobiol., 2, 115-63, Barde ir kt., 1987, Prog. Brain Res., 71, 185-9, Shide W.D. ir Johnson E.M., 1989, Ann. Neurol., 16, 489-506).

Dabar aišku, kad tokie faktoriai egzistuoja, bet dėl mažos jų koncentracijos sunku šiuos faktorius charakterizuoti molekuliniame lygyje. Vis dėlto, išgryninus nedidelį kiekį smegenų neurotrofinio faktoriaus (BDNF) ir ciliarinio neurotrofinio faktoriaus (CNTF), neseniai pasisekė juos dalinai sekvenuoti (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-52; Stockli ir kt., 1989, Nature, 342, 21-28 ir Lin ir kt., Science, 246, 1023-25). Nors konkrečios neuronų populiacijos pasižymi specifiškumu, BDNF ir NGF (bet ne CNTF) turi pakankamą struktūros homologiją, o tai įgalina juos traktuoti, kaip vienos genų šeimos atstovus (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 146-52).

2.2. Kiti neurotrofiniai faktoriai

Paskutini dešimtmetyje buvo daug pranešimų apie neurotrofinį aktyvumą įvairių audinių ekstraktuose ir įvairių ląstelių kultūriniame skystyje. Beveik visais atvejais šių baltymų išgryninimas ir charakterizavimas buvo apsunkintas dėl šių baltymų mažos koncentracijos - nuo pikogramo iki nonagramo viename audinio grame. Be to periferinių neuronų atveju buvo atlikti adekvatūs

biologiniai tyrimai, o atsikartojančių specifinių bandymų su centrinės nervų sistemos neuronais nepasisėkė atlikti. Atskiri periferinių neuronų tipai buvo aptikti diskretiškais, lengvai atskiriamais ganglijais, tuo metu centrinės nervų sistemos (CNS) neuronai yra labai heterogeniški. Identifikacijai reikalingi specifiniai markeriai, pavyzdžiui, antikūnai prieš ląstelės paviršių arba citostruktūriniai komponentai, arba specifiniai histologiniai dažai, o šių markerių pasirinkimas yra ribotas. Todėl labai sunku charakterizuoti neurotrofinius faktorius, nes: 1) jų labai nedidelė koncentracija, atvirkščiai nei NGF, 2) sunku atlikti su jais eksperimentus ir 3) jų kiekiai per maži, kad gauti prieš juos antikūnus.

2.2.1 Augimo faktoriaus, išskirto iš smegenų, ir nervų augimo faktoriaus palyginimas.

Neurotrofinis aktyvumas, kurio dėka palaikomas viščiukų embrionų dorsalinių bazinių ganglijų neuronų gyvybingumas, buvo identifikuotas "kondicionuotoje terpėje", kurioje buvo auginamos žiurkių gliomos C-6 ląstelės (Barde ir kt., 1978, Nature, 274, 818). Šis aktyvumas nebuvo neutralizuojamas antikūnais prieš pelės NGF, tai liudijo, kad yra kitas neurotrofinis faktorius šioje terpėje. Vėliau buvo aprašyti panašūs aktyvumai, kurie nebuvo neutralizuojami antikūnais prieš NGF, astrogeninėse normalių suaugusių žiurkių smegenų ląstelių kultūrose (Lindsay, 1979, Nature, 282, 80-82, Lindsay ir kt., 1982, Brain Res., 243, 329-343) ir besivystančių ir suaugusių žiurkių smegenų ekstraktuose (Barde ir kt., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1199-1203),, ir besivystančio ir subrendusio viščiuko nugaros smegenyse (Lindsay ir Peters, 1984, Neuroscience, 12, 45-51). Bet nei vienu atveju nebuvo išgrynintas arba identifikuotas aktyvumo faktorius (faktoriai) ir lieka neaišku, ar pastebėti

aktyvumai tai vienas ir tas pats faktorius, ar tai skirtingi faktoriai.

Panaudojus pradinio šaltinio kiaulės smegenis Barde ir
5 kt. (1982, EMBO, 1, 549-553) pranešė apie faktorių,
dabar vadinamą smegenų (išskirtu iš smegenų)
neurotrofiniu faktoriumi (BDNF), kuris matyt, palaikė
viščiukų embrionų E10/E11 dorsalinių bazinių ganglijų
neuronų gyvybingumą. Buvo nustatyta, kad neurotrofiniu
10 aktyvumu pasižymi labai šarminis baltymas
(izoelektrinis taškas $pI > 10.1$), SDS PAGE elektroforeze
nustatyta jo molekulinė masė yra 12.3 kD. Išgryninimo
faktorius buvo lygus 1.4×10^6 , bet išeiga labai žema-
apie 1 μ g BDNF iš 1.5 kg kiaulės smegenų. Be to
15 paskutinė gryninimo stadija buvo elektroforezė, todėl
BDNF aktyvumas pilnai neatsistato dėl liekamojo SDS
(natrio dodecilsulfato) kiekio (Barde ir Thanen, 1985,
"Hormons and Cell regulation" vol. 9, Damont ir kt.,
eds. Elservier Science Publishers, 385-390). Pažymėta,
20 kad pagal izotąšką ir molekulinę masę BDNF baltymas
artimas NGF monomerui. Bet BDNF pasižymi tokiomis
savybėmis, kurios yra skirtingos nuo žinomų NGF savybių
tuo, kad a) in vitro antikūnai prieš NGF nepakeisdavo
BDNF aktyvumo, b) BDNF efektai buvo papildantys NGF ir
25 c) skirtingai nei NGF, BDNF neturėjo jokio poveikio
viščiuko embriono E 12 simpatiniams neuronams.
Papildomai, tiriant smegenų ekstraktus buvo nustatyta,
kad neuroninis aktyvumas iš šio šaltinio veikia, matyt,
sensorinius neuronus vėlesnėse vystymosi stadijose, nei
30 NGF. Naudojant disocijuotą viščiukų embrionų neuronų
kultūrą, auginamą ant polikationitinio substrato -
polilizino arba poliornitino, buvo nustatyta, kad BDNF
palaiko daugiau, nei 30% E10/E11 (t.y., 10 arba 11
dienų išsivystymo embriono) dorsalinių bazinių ganglijų
35 neuronų gyvybingumą, bet, panašu, kad turi silpną
poveikį tų pačių neuronų gyvybingumui iš E6 (Barde ir
kt., 1980, proc. Natl. Acad. USA, 77, 1199-1203, žiūr.

aukščiau). panašiomis sąlygomis NGF palaiko 30-40% E6
DRG neuronų gyvybingumą. Įdomu tai, kad vėliau buvo
nustatyta, kad kultivuoiant ant substrato, padengto
nelasteliniu matriciniu glikoproteinu - lamininu, kaip
5 NGF, taip ir BDNF palaikė gyvybingumą 50% DRG neuronų
iš E6-E12 amžiaus viščiukų embrionų (Lindsay ir kt.,
1985, Develop Biol., 319-328). Vėlesniuose tyrimuose
buvo nustatyta, kad NGF ir BDNF poveikiai yra vienas
kita papildantys, kai jie yra didelėmis
10 koncentracijomis.

Ankstesniuose Levi-Montalcini (1966, "The Harvey
lectures" 60, 217-259) NGF neuronų specifiškumo
tyrimuose buvo manoma, kad NGF nėra visur esantis
15 neuroninis faktorius net ir sensoriniams neuronams, nes
NGF, kaip buvo nustatyta, neveikia tam tikrų sensorinių
ganglijų neuronų iš viščiuko galvos, ypatingai
nodozinio ganglijo 10 kaukolės nervo. Vėliau tyrimais
in vivo (Johnson ir kt., 1980, Science, 210, 916-918,
20 Pearson ir kt., 1983, Development Biol., 96, 32-36)
buvo parodyta, kad pašalinus embriogenezės metu,
nepakito neuronų gyvybingumas daugumoje žiurkės galvos
sensorinių ganglijų, tuo metu, kai tokia operacija
žymiai sumažindavo neuronų skaičių sensoriniuose
25 ganglijuose iš neuronų keteros. Detalesniais tyrimais
in vitro (Lindsay ir Rohrer, 1985, Develop., Biol.,
112, 30-48, Davies ir Lindsay, 1985, Develop. Biol.,
111., 62-72, Lindsay ir kt., 1985, J. Cell. Sci.
Suppl., 3, 115-129) buvo aiškiai nustatyta, kad NGF
30 palaiko daugumos neuronų, paimtų iš neuronų keteros,
gyvybingumą, bet neturi jokio žymaus efekto galvos
sensorinių neuronų plakodės gyvybingumui.

Pirma demonstracija BDNF neuroninio specifiškumo
35 skirtumo nuo NGF buvo bandymas in vitro, kurio metu
išgrynintas NGF palaikė 40-50% sensorinių neuronų,
disocijuotų iš nodozinio ganglijaus, paimto iš viščiuko

plakodės embriono E6, E9 arba E12 gyvybingumą (Lindsay ir kt., 1985 J. Cell. Sci. Supp., 3, 115-129). NGF neturėjo pastebimo efekto šiems neuronams kaip vienas, taip ir kartu su BDNF. Vėliau, tiriant eksplantantų kultūras, buvo parodyta, kad BDNF, matyt, palaiko neuritų iš kitų sensorinių ganglijų, paimtų iš plakodės, tame tarpe smilkinio, šoninio kūno ir lateralinių trišakių ganglijų gyvybingumą ir ataugimą (Davies ir kt., 1986, J. Neuro. Sci., 6, 1897-1904), nė vienas iš jų nebuvo jautrus NGF. Visuose aukščiau minėtuose tyrimuose neutralizuojantys antikūnai prieš NGF nepakeisdavo BDNF aktyvumo. Papildomi šiems poveikiams kultivuojamiems neuronams iš periferinių ganglijų buvo nustatyta, kad BDNF stimuliuoja gyvybingumą ir neuroninę ląstelių, paimtų iš putpelės neuronų keteros, diferencijaciją (Kalcheim ir Gendreau, 1988, Develop. Brain Res., 41, 79-86).

Iki šio išradimo nesugebėjimas gauti pakankamų BDNF kiekių imunizacijai trukdė antikūnų prieš BDNF gavimą, kurie reikalingi, norint palyginti juos su antikūnais prieš NGF pagal jų poveikį neuroninėms populiacijoms ir nebuvo galima atlikti BDNF/NGF kryžminio neutralizavimo eksperimentų. Du neseni tyrimai, atlikti su BDNF, (Kalcheim ir kt., 1987, EMBO, 6, 2871-2873, Hofer ir Barde, 1988, Nature, 331, 261-262) parodė, kad, vis dėlto, BDNF turi fiziologinį vaidmenį paukščių periferinės nervų sistemos (PNS) vystymesi. Jei in ovo (kiaušinyje) būdavo įterpiama mechaninė pertvara tarp E3/E4 DRG (3 arba 4 embrionalinė diena dorsalinių bazinių ganglijų) ir jų taikiniu nervų vamzdelyje centrinėje nervų sistemoje, tai būdavo stebimas daugumos DRG neuronų žuvimas (Kalcheim ir de Donarin, 1986, Develop. Biol., 116, 451-466). Buvo manoma, kad šis neuronų žuvimas gali būti susietas su iš CNS (nervų vamzdelio) neurotrofinio faktoriaus nepatekimu. Vėliau buvo pastebėta, kad BDNF, pritvirtinus prie lamininų

padengtos sialastikinės membranos, gali būti išvengiamas šis ląstelių žuvimas (Kalcheim ir kt., 1987, EMBO, 6, 2871-2873).

- 5 Buvo nustatyta, kad BDNF injekcijos į besivystančios putpelės kiaušinius sumažina nodoziniuose ganglijuose natūralų ląstelių žuvimą, šis efektas nepasireiškia naudojant NGF (Hofer ir Barde, 1988, Nature, 331, 261-262). Papildomai šiam poveikiui periferiniams
- 10 sensoriniams neuronams kaip iš neuroninio gūbrio, taip ir iš neuroninės plakadės, buvo nustatyta, kad BDNF palaiko besivystančių CNS neuronų gyvybingumą. Johnson ir kt. (1986, J. Neurosci., 6, 3031-3938) pateikė duomenis, kurie parodo, kad BDNF palaiko kultivuojamų
- 15 tinklainės ganglijaus ląstelių, paimtų iš E17 žiurkių embrionų, gyvybingumą. Tai pratesė ankstesnius tyrimus, kurių metu buvo nustatyta, kad kondicionuotoje terpėje ir smegenų ekstraktai iš taikinio srities tinklainės ganglijaus ląstelių, matyt, palaiko šių neuronų
- 20 gyvybingumą (Mc Caffery ir kt., 1982, Ex. Brain Res., 48, 37-386, Sarthy ir kt., 1983, J. Neurosci, 3, 2532-2544, Turner ir kt., 1983, Dev. Brain Res.).

- Papildomai jo poveikiui besivystančių kultūroje neuronų
- 25 gyvybingumui, buvo nustatyta, kad BDNF veikia periferinės ir centrinės nervų sistemos kultivuojamus subrendusius neuronus. Buvo nustatyta, kad BDNF, kaip ir NGF, stimuliuoja aksoninę regeneraciją kultivuojamų DRG neuronų, paimtų iš suaugusios žiurkės (Lindsay,
- 30 1988, J. Neurosci, 8, 2394-2405), tuo metu, kai subrendusiems sensoriniams neuronams nebūtinai neurotrofiniai faktoriai, norint juos išsaugoti in vitro ilgiau 3 arba 4 savaites. Be to, kultivuojant suaugusių žiurkių tinklainės ląsteles, buvo pastebėta,
- 35 kad BDNF palaiko ne tik gyvybingumą, bet ir pailgina aksonus paimtus iš tinklainės ganglijų ląstelių (Thanos ir kt., 1989, Eur. J. Neurosci, 1, 19-26).

NGF ir BDNF biologinio poveikio palyginimas pateiktas lentelėje 1.

5 Lentelė 1.

NGF ir BDNF biologinio poveikio palyginimas*

		Gyvybingumas**	
		BDNF	NGF
Periferinė	nervų sistema		
I.	E6 viščiuko DRG	-	++
	E10 viščiuko DRG	+	++
	E12 viščiuko simp. (Barde ir kt., 1980, žiūr. aukščiau)	-	++
II	E6-E12 viščiuko DRG	++	++
	E6-E12 viščiuko, stuburo	++	-
	E12-simpatinis, viščiuko	-	++
	E12-ciliarinis, viščiuko	-	-
III	E3-E14, viščiuko:		
	kaklo	+/++	++
	DM-trišakis	+/++	++
	smilkinio	+/++	-
	kelio	+/++	-
	VL-trišakis	++	-
	vestibuliarinis	-	-
	mezencefalinis	++	-

10 (Davies ir kt., 1986, žiūr. aukščiau)
(Barde ir kt., 1987, Prog. Brain Res., 71, 185-189)

Centrinė	nervų sistema		
I	E17 žiurkės tinklainės ganglijaus ląstelės (Johnson ir kt., 1986, J. Neurosci., 6, 3031-3038)	++	-

* - chronologinė tvarka pagal publikacijos datą;
poveikis tikrintas in vitro

5 ** - nepalaiko gyvybingumo - (-), vidutiniškas
gyvybingumo palaikymas - (+), geras gyvybingumo
palaikymas - (++).

10 2.2.2. Smegenų neurotrofinio faktoriaus neuroniniai
taikiniai

Periferinių nervų ganglijų sensoriniai neuronai kyla,
kaip buvo nustatyta, iš dviejų, besiskiriančių viena
nuo kitos, laikinų embrionalinių struktūrų, konkrečiai,
15 iš neuroninės keteros ir neuronų plakodžių. Neuronų
ketera yra neuronų, autonominių ganglijų satelitinių
ląstelių ir stuburo nervo sensorinių ganglijų, t.y.,
DRG, pradžia. Neuronų gūbrio ir neuronų plakodžių
indėlis formuojantis kaukolės nervo sensorinių ganglijų
20 buvo ištirtas naudojant chimerinę (putpelė/viščiukas)
transplantacijos sistemą, sukurtą Le Donarin (1973,
Develop. Biol., 20, 217-22, Noolen, 1978, Develop.
Biol., 67, 313-329, Narayanan ir Narayanan, 1980, Anat.
Rec., 196, 71-82, Ayer-LeZiev ir Le Denarin, 1982,
25 develop. Biol., 94, 291-310, D'Amico-Martel ir Soden,
1983, Am. J. Anat., 166, 445-468). Kaip pažymėta Lindsay
ir kt. (1985, J. Cell. Sci. Supp., 3, 115-129), dabar
manoma, kad mažų mažiausia paukščiams, VII, IX ir X
kaukolės nervo (kelio, smilkinio, nodozinis ganglijai,
30 atitinkamai) distalinių ganglijų neuronai ir neuronai
vestibuloakustinio komplekso VIII kaukolės nervo yra
plakodės prigimties. Trišakis ganglijus V kaukolės
nervo yra kaip šukinio ir plakodės prigimties (su
neuronais plakodės prigimties, dominuojantys
35 ventrolateraliniame poliuse maksilomandibuliarinėje
dalyje), bet buvo nustatyta, kad satelitinės visu

kaukolės ganglijų ląstelės - pilnai plakodės prigimties.

In vitro eksperimentuose, naudojant ir eksplantuotas
 5 ir disocijuotas, praturtintas neuronais, sensorinių
 stuburo ir kaukolės nervų neuronų kultūras, buvo
 nustatyta, kad sensoriniai neuronai, kilę iš neuronų
 gūbrio, reaguoja į NGF, priešingai, neuronai, kilę iš
 10 neuronų plakodės (įskaitant ir ventrolateralinės dalies
 trišakio ganglijaus neuronus ir visą vestibuliarinio,
 kelio, smilkinio ir nodozinio ganglijų neuronų
 populiaciją), pagrindinai neturi atsako NGF
 embrionalinio vystymosi metu. Tiriant skirtumus ir NGF
 būtinumą jiems, buvo nustatyta, kad (žiūr. lentelę 1.)
 15 ir sensoriniai neuronai iš plakodės taip ir sensoriniai
 neuronai šukinės prigimties, yra jautrūs BDNF, jis turi
 įtakos jų gyvybingumui ir neuritų vystymuisi (Lindsay
 ir kt., 1985, J. Cell. Sci. Supp., 3, 115-129, Lindsay
 ir kt., 1985, Develop. Biol., 112, 319-328, Kalcheim ir
 20 Gendreau, 1988, Develop. Brain Res., 41, 79-86).

Lentelė 2.

Neuronų, reaguojančių ir nereaguojančių į BDNF, sąrašas

25

A. Reaguojantys neuronai

I. Viščiuko sensoriniai neuronai, kilę iš nervų gūbrio,

30

- a) nugaros baziniam gangliuje,
- b) kaklo gangliuje,
- c) dorsomedialiniame trišakiame gangliuje,
- d) mezencefaliniame trigubame branduolyje**.

35

II. Viščiuko sensoriniai neuronai, kilę iš
 ektodermalinės plakodės,

- a) nodoziniam gangliuje
- b) vestibuliariniam gangliuje
- c) smilkinio gangliuje
- d) kelio gangliuje
- 5 e) ventrolateraliniame trišakiame gangliuje.

III. Žiurkės tinklainės ganglijaus ląstelės

10 IV. Viščiuko tinklainės ganglijaus ląstelės

B. Nereaguojujantys neuronai

I. Viščiuko ir žiurkės simpatiniai neuronai

15 II. Viščiuko parasimpatiniai ciliariniai neuronai

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

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

20

*** - Rodriguez-Tebar ir kt., 1989, Dev. Biol., 136, 296-303

25 Tebar ir Barde (1988, J. Neurosci., 8, 3337-3342)
ištyrė žymėto radioaktyviu izotopu BDNF surišimo
parametrus su viščiuko embriono dorsalinio bazinio
ganglijaus neuronais; šie rezultatai patvirtina, kad
egzistuoja dvi BDNF receptorių klasės, viena - su
aukštu afiniškumu, kita su žemu afiniškumu BDNF.
30 Simpatiniuose neuronuose neaptikta aukšto afiniškumo
receptorių.

35 Barde ir kt. (1987, Prog. Brain Res., 185-189) toliau
ištyrė žinomus BDNF neuronų taikinius. Iki šio išradimo
nebuvo galima identifikuoti ląsteles, kurios sintetina
BDNF, todėl kad nebuvo nei antikūnų, nei nukleino
rūgščių, specifinių BDNF. Bandymai gauti monokloninius

arba polikloninius antikūnus buvo nesėkmingi. Tai trukdė BDNF klonavimui, fiziologinio efekto nustatymui in vivo, izoliuojant besivystančius neuronus nuo BDNF, kiekybiniam BDNF nustatymui audiniuose, naudojant imunologinius tyrimus, nustatyti BDNF lokalizaciją, naudojant imunocitochemiją.

2.2.3. Geno, koduojančio smegenų neurotrofinį faktorių, klonavimas

10

BDNF geno klonavimas pirmą kartą atliktas ir aprašytas JAV paraiškoje patentui No 07/400591, 1989.08.30, šis patentas pilnai įjungtas į šį išradimą kaip nuoroda. Šio patento trumpas aprašymas: iš kiaulės smegenų buvo išskirti labai maži BDNF baltymo kiekiai, buvo nustatyti šio baltymo aminorūgščių liekanų sekų fragmentai, kurie buvo naudojami atitinkančių oligonukleotidų sintezei. Šie sintetiniai oligonukleotidai buvo naudojami pradmenimis grandininėje polimerazinėje reakcijoje (PGR) su kDNR, kaip matrica, gauta iš ląstelių, produkujančių BDNF. PGR produktai buvo naudojami zondais, klonuojant pilną kDNR ir/arba genominius BDNF įvairių gyvūnų (žmogaus, kiaulės, žiurkės, pelės) genus ir buvo nustatoma šių genų seka. Rekombinantinių BDNF ekspresija buvo atliekama COS ląstelėse.

25

3. Trumpas išradimo aprašymas

30

Šis išradimas yra apie neurotropiną-3 (NT-3), neseniai atrastą BDNF genų šeimos narį. Šis išradimas grindžiamas, dalinai, BDNF ir NGF nukleino rūgščių sekų homologijos identifikavimu (JAV patentas 07/400591, žiūr. aukščiau). Pagal šį išradimą, šios homologijos sritys gali būti panaudotos naujų BDNF/NGF šeimos narių identifikavimui, tokia metodika ir buvo panaudota identifikuojant NT-3. Pagal šį išradimą galima gauti

35

susietus su BDNF/NGF neurotrofiniais faktoriais genus ir jų produktus, kurie identifikuojami šiuo metodu.

Šis išradimas, iš dalies, tai rekombinantinės DNR molekulės, koduojančios NT-3. Konkrečiai, šio išradimo viename variante galima gauti DNR, koduojančią NT-3, išskiriant iš žmogaus DNR, arba jūros kiaulytės DNR arba žiurkės DNR. Pagal šį išradimą galima gauti rekombinantinės DNR ekspresijos vektorius, kuriuose yra bent dalis nukleino rūgščių sekų, pagrindine tokių, kaip aprašyta Fig. 2 (jūros kiaulytės NT-3), Fig. 7 (žiurkės NT-3). Pagal šį išradimą galima gauti rekombinantinės DNR ekspresijos vektorius, kurie gali būti naudojami gaminant rekombinantinį NT-3 baltymą ir šio baltymo peptidus.

Alternatyviu šio išradimo variantu galima gauti NT-3 baltymus ir atitinkamus peptidus ir taip pat pagal šio išradimo būdus galima sintetinti ir išgryninti šiuos junginius. Šis išradimas apima ir antikūnus prieš NT-3 baltymus ir peptidus.

Pagal šį išradimą NT-3 gali būti naudojami diagnostikoje ir/arba neurologinių pakenkimų gydymui, tokių kaip, bet jais neapsiribojant, periferinė neuropatija, kaip diabetinė neuropatija, toksinės ir maistinės neuropatijos, paveldimos neuropatijos ir neuropatijos, susietos su AIDS, o taip pat degeneratyviniai susirgimai, tokie kaip, Alchaimeiro liga. Buvo nustatyta, kad NT-3 palaiko dopaminergetinių neuronų gyvybingumą; atitinkamai, palankiausiame išradimo pritaikyme, NT-3 gali būti naudojamas Parkinsono ligos gydymui. Kadangi buvo nustatyta, kad NT-3 pasižymi aktyvumų spektru, skirtingu nei BDNF arba NGF specifiškumas, tai NT-3 galima panaudoti centrinės nervų sistemos augimo stimuliavimui ir "remontui".

Taigi, išradime aprašomas neurotrofino-3 baltymas (NT-3), turintis amino rūgščių seką:

5 Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys
 Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile
 Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys
 Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg
 Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile
 Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr
 10 Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly
 Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala
 Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

15 arba funkciškai aktyvus baltymas, iš esmės homologiškas
 minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo subseka
 arba jo homologas, apimantis funkciškai aktyvų peptidą,
 skirtas panaudoti žmonių arba gyvulių nervų sistemos
 ligos arba sutrikimo gydymui.

20 Išradime taip pat aprašoma farmacinė kompozicija, į
 kurią įeina neurotrofino-3 baltymo, turinčio
 aminorūgščių seką:

25 Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys
 Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile
 Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys
 Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg
 Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile
 Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr
 30 Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly
 Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
 Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

35 arba funkciškai aktyvaus baltymo, iš esmės homologiško
 minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo
 subsekos, arba jo homologo, apimančio funkciškai aktyvų
 peptidą, terapiškai efektyvus kiekis, bei antrasis

citokino agentas, geriausiai NGF arba BDNF, kartu su farmaciškai priimtu nešikliu.

5 Išradime taip pat aprašomas antikūnas, antikūno fragmentas arba jų darinys, kurie atpažįsta neurotrofino-3 baltymą (NT-3), turintį aukščiau parodytą aminorūgščių seką, arba šio peptido fragmentą, arba jų darinį.

10 Išradime taip pat aprašomas aukščiau aprašyto antikūno gavimo būdas, susidedantis iš šių stadijų:

(a) gyvūno (ne žmogaus) imunizavimo neurotrofinu-3 arba peptidu, turinčiu neurotrofino-3 antigeninę
15 determinantę, norint pagaminti antikūną, reaguojantį su neurotrofinu-3;

(b) antikūno, pasigaminusio (a) stadijoje, išskyrimo iš gyvūno.

20

Išradime taip pat aprašomas nervų sistemos ligos arba sutrikimo diagnozavimo in vitro būdas, į kuriį įeina:

(a) audinio sąlytis su žymėta detektuojama žyme
25 antikūno molekule, kuri gali susijungti su neurotrofino-3 baltymu, turinčiu aukščiau duotą seką, arba šio peptido fragmentu arba jo dariniu, tokiomis sąlygomis, kuriose yra galimas toks susijungimas; ir

30 (b) nustatymas, ar įvyko toks susijungimas.

Išradime taip pat aprašyta žymėta detektuojama žyme antikūno molekulė, galinti susijungti su neurotrofino-3 baltymu, turinčiu aukščiau duotą aminorūgščių, šio
35 peptido fragmentu arba jų dariniu, skirta panaudoti diagnozuojant in vivo nervų sistemos ligą arba sutrikimą.

Išradime taip pat aprašoma farmacinė kompozicija, i kuria įeina terapiškai efektyvus kiekis neurotrofino-3 baltymo, arba jo subsekos, apimančios funkciškai aktyvų peptidą, kur minėtas neurotrofino-3 baltymas turi tokia aminorūgščių seką:

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly GLu Tyr Ser Val Cys
 Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile
 10 Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys
 Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg
 Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile
 Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr
 Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly
 15 Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
 Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

arba funkciškai aktyvaus baltymo, iš esmės homologiško minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo subsekos, arba jo homologo, apimančio funkciškai aktyvų peptidą, kartu su farmaciškai priimtinu nešikliu, pritaikyta intraderminiam, intraraumeniniam, intraperitoniniam, intraveniniam, poodiniam, intraventrikuliariniam arba intratekaliniam vartojimui, arba įleidimui per implantuotą įtaisą arba kateterį.

4. Figūrų aprašymas

Fig. 1. Įvairių gyvūnų BDNF ir NGF nukleino rūgščių sekų palyginimas. Geno, koduojančio BDNF, sekos analizė ir aminorūgščių liekanų sekos analizė parodė, kad šis baltymas turi daug struktūrinių panašumų su NGF. Pagal pirminę subrendusio BDNF seką, taip pat kaip ir bendrą struktūrą ir panašų procesingą, patikimai galima teigti, kad NGF ir BDNF genai gali būti gaunami iš vieno bendro pirminio geno. Viduje subrendusių polipeptidų, jeigu NGF sekoje tapatumo optimizavimui

įvesti tik trys tarpai, tai tada yra 51 aminorūgšties
liekana ta pati visuose iki šiol žinomuose įvairių
rūšių NGF ir kiaulės, žmogaus BDNF. Šiose homologinėse
srityse yra visos 6 cisteino liekanos, sprendžiant, kad
5 NGF ir BDNF turi panašią antrinę struktūrą. Be to,
keturi segmentai iš šešių arba daugiau aminorūgščių
liekanų taip pat matomi šiame piešinyje, kuriuose
visų rūšių NGF ir kiaulės BDNF yra identiški, arba
skiriasi ne daugiau nei viena konservatyvia
10 aminorūgšties liekana. Tokiu būdu, galima teigti, kad
NGF ir BDNF yra artimi genų šeimos nariai.

Fig. 2. Jūrų kiaulytės NT-3 geno ir aminorūgščių
liekanų seka. Aminorūgščių seka prasideda nuo pirmo ATG
15 kodono, kuris yra po 3' rėmelio stop kodonų. Pabrauktos
sekos nurodo naudojamų PGR pradmenų išsidėstymą.
Vienintelė N-glikozilinio konsensusinė seka pabraukta
du kart, o rodykle parodyta spėjama subrendusio NT-3
transkripcijos pradžia.

20 Fig. 3. Subrendusios pelės NT-3, NGF (Scot ir kt.,
1983, Nature, 302, 538-540) ir BDNF (Leibrock ir kt.,
1989, Nature, 341, 149-152) aminorūgščių liekanų sekų
palyginimas. Čia pateikta subrendusios pelės BDNF seka
25 100% identiška kiaulės BDNF sekai. Storesniu šriftu ir
šešėliais nurodytos aminorūgščių liekanos, identiškos
visiems trims baltymams, rodyklės nurodo cisteino
liekanas. Žvaigždutėmis nurodomi tarpai, padaryti
struktūros optimizavimui. V1-V4 nurodyti kintantys
30 domenai, kurių sudėtyje yra daugiau nei trys artimos
aminorūgščių liekanos.

Fig. 4. NT-3 iRNR pasiskirstymas pelės audiniuose.
Dvidešimt mikrogramų totalinės RNR buvo įnešta į
35 kiekvieną takelį ir hibridizuojama su žymėta 32P
dvispirale DNR. (A) Visuose audiniuose matoma
vienintelė juosta, kurios dydis apytikriai - 1.4 kb

(tūkstančių bazių), silpniausias signalas stebimas plaučiuose, stipriausias - širdyje. Skeleto raumuo buvo paimtas iš šlaunies. (B) Tiriant smegenis, stipriausias signalas buvo gautas Amono rage ir smegenėlėse.

5

Fig. 5. Sensorinių neuronų, išskirtų iš nodozinių ganglijų, gautų iš 8 dienų viščiuko embriono, gyvybingumas. 5 tūkstančiai ląstelių buvo patalpinti į lėkštelę su poliornitinu-laminino substratu, gyvi
10 neuronai buvo skaičiuojami po 24 valandų. Naudojama BDNF koncentracija buvo du kart didesnė už minimalią koncentraciją, reikalingą maksimaliam gyvybingumui. Neliko nė vieno gyvo neurono, kai nebuvo pridėta BDNF, arba kondicionuotoje terpėje, naudojamoje praskiedus 1
15 : 50 su netransfekuotomis ląstelėmis, arba ląstelėmis, transfekuotomis kontroline DNR.

Fig. 6. (A) PGR produktas, gautas naudojant 1B ir 2C
20 pradmenis (pažymėti R1B/2C), kurio pagalba galima nustatyti naują geną, NT-3, taip pat ir NGF ir BDNF genus genominiėje žiurkės DNR. (B) Restrikcinis žiurkės NT-3 genomio klonų žemėlapis. Buvo išskirti iš
25 genominės žiurkės bibliotekos du nepriklausomi bakteriofago klonai, specifiskai hibridizuojantys su R1B/2C zondais. Schematiškai pateikiamas restrikcinis vieno klonų žemėlapis, kuriame yra 19.5 kb tarpas. Pastorinta linija pažymėta NT-3 atviras skaitymo
30 rėmelis (ORF) (žiūr. Fig. 7A). Parodyta R1B/2C vieta.

Fig. 7. Žiurkės NT-3 seka ir jo homologiškumas žiurkės NGF ir žiurkės BDNF. (A) NT-3 nukleotidų ir
35 aminorūgščių liekanų seka. ORF, apimanti DNR seka koduojanti NT-3 geną su transliavimu į aminorūgščių liekanų seką, kuri yra virš DNR sekos, žvaigždutėmis pažymėta atviro skaitymo rėmelio pradžia ir pabaiga. Aminorūgščių liekanos sunumeruotos nuo +1 pozicijos -

pirmos aminorūgšties liekanos subrendusiame NT-3 baltyme (119 amino rūgščių liekanų). Subrendusio NT-3 baltymo atskėlimo sritis apibrėžta rėmeliu, taip pat pažymėta glikozilinimo sritis, kuri yra prieš šią

5 atskėlimo sritį. Kita potenciali atskėlimo sritis, panašiai išdėstyta prie tarpinio procesingo srities NGF (Darling ir kt., 1987, Cold Spring Harb. Spring Quant Bio, 1, 427-34), bet kuri nėra pasyvuota BDNF baltyme, apibrėžta rėmeliu ir "?Cleave". Šešios cisteino

10 liekanos subrendusiame NT-3 baltyme yra pabrauktos. Probaltymo NT-3 transkripcijos inicijavimo metionino kodonas (pozicija-139) yra starto sritis "B" taip pat yra pabraukta. Šiame piešinėlyje nurodyta sait-

akceptorinė menamo intarpo riba (intronas, esantis

15 prieš nuo startinio kodono "B"). B) Palyginamoji žiurkės NT-3 su žiurkės NGF ir žiurkės BDNF analizė. MacVektor sekvenavimo kompiuterinė programa (programa nupirktą iš International Biotechnologies Inc.) buvo panaudota analizuojant žiurkės NT-3 ORF su NGF ir BDNF

20 genų ORF (naudojant lango dydį 20, maksimalų sutapimą 20%). Žymūs sutapimai matomi pagal šios matricos diagonale, apačioje pateikiamos produkto - NT-3 baltymo - schematinis vaizdas; dvi homologijos sritys yra prieš subrendusį NT-3 baltymą, jos matomos sulyginant su NGF

25 ir BDNF, pažymėtos I ir II. Kaip parodyta šiame piešinėlyje, I sritis yra prieš "B" starto sritį, nuo kurios sintetinamas trumpas NT-3 probaltymas, tai patvirtina, kad sintetinamas ir ilgesnis probaltymas. C) NT-3, NGF ir BDNF homologijos įvertinimas srityse I

30 ir II. Sekos šiose srityse taip sudėliotos, kad būtų maksimali homologija, su trūkiais jie pažymėti "-". BDNF arba NGF sritys, sutampančios su NT-3 nurodytos žvaigždėmis, sutapimai tarp NGF ir BDNF pažymėti taškais NGF sekoje. "+" viršuje sekos nurodo liekanas,

35 kurios yra pilnai konservatyvios tarp žiurkių NT-3, NGF ir BDNF sekų ir kitų ištirtų gyvūnų. Parodyti NGF sekoje nustatyti, anksčiau numatyti BDNF sekoje, čia

pateikiami NT-3 sekoje, sekantys saitai: signalinės sekos skėlimo sritis (Edwards ir kt., 1988, Mol. Cell Biol., 8, 2456-64); tarpinė NGF skėlimo sritis, kurios nėra BDNF sekoje, bet yra NT-3 sekoje; glikozilavimo sritis; proteinolizės vieta, kurios pagalba atskeliami subrendusieji faktoriai. D) Subrendusių NT-3, NGF ir BDNF baltymų sekų palyginimas. Konservatyvios cisteino liekanos pažymėtos storu kvadratu. Simbolių: "***", ":" ir "-" reikšmės tokios pat kaip ir C). Nurodytas taip pat ir C gale esantis skėlimo saitas, kuris yra tik NGF sekoje.

Fig. 8. NGF, BDNF ir NT-3 aktyvumų palyginimas eksplantuotuose viščiuko embriono (8 diena) ganglijuose. Mikrofotografijos dorsalinių bazinių ganglijų (DRG) (nuotraukos A-D), nodozinių ganglijų (nuotraukos E-H), ir ganglijų simpatinės grandinės (SG) (nuotraukos I-L), kultivavimas buvo atliekamas 24 valandas (DRG ir NG) arba 48 valandas. (SG) be jokio neurotrofinio faktoriaus (Kontrolės: A, E, I) ir esant COS ląstelių supernatantui, kuriuose yra NGF (B, F, J), arba BDNF (C, G, K) arba NT-3 (D, H, L). Beveik nepastebimas neuritų ataugimas kontrolinėse kultūrose (500 μ l ląstelių supernatanto iš mocL-transfekuotų ląstelių). NGF (10 μ l COS ląstelių supernatanto) sukeldavo stiprų ataugų ataugimą nuo DRG ir SG, bet ne NG. Padidinus NGF COS ląstelių supernatanto kiekį nuo 20 iki 500 μ l, nebuvo pastebimas joks poveikis NG. BDNF (10 μ l COS ląstelių supernatanto) sukeldavo ataugų ataugimą DRG ir NG, bet ne SG, padidinus kiekį (nuo 20 iki 500 μ l) neturėjo jokios įtakos SG. NT-3 (20 μ l COS ląstelių supernatanto) DRG ir NG, ir 200 μ l SG) iššaukdavo ataugų ataugimą visuose trijuose ganglijų tipuose, nors ataugimo inicijavimas buvo lėtesnis ir silpnesnis, nei SG. Ganglijai buvo kultivuojami kaip eksplantantai halogeno gelyje (Lindsay R.M. ir Rohrer M., 1985 Dev. Biol., 112, 30-48) terpėje F14, pridėjus

5% arklio serumo, kaip aprašyta (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112, 319-28). Padalos dydis - 200 μ m.

Fig. 9. NT-3 palaiko gyvybingumą ir stimuliuoja neuritų
 5 ataugimą didelės koncentracijos DRG neuronų kultūrose. Fotografijos viščiuko embriono (8 dienos) disocijuotų DRG kultūrų, praturtintų neuronais (daugiau 95% neuronų), paveiktos 48 valandas arba (A) mock-transfekuotų COS ląstelių supernatantu (500 μ l), arba
 10 (B, C) NT-3 transfekuotų ląstelių supernatantu (50 μ l). A ir B - mikrofotografijos tamsiame lauke; A (kontrolinė kultūra) išgyveno mažiau 5% neuronų vienoje lėkštelėje; B - neuronų kiekis išlikęs po šio proceso buvo apie 60% nuo įneštų į lėkštelę neuronų kiekio. Iš
 15 reakcijos dydžio nuo kiekio kreivės buvo nustatyta, kad maksimalus NT-3 efektas pasiekiamas naudojant viščiuko E8 DRG neuronus. (C) Tos pačios kultūros kaip ir (B) fazių kontrastinė mikrofotografija, bet didesniu padidininimu. Atkreipkite dėmesį į didelį skaičių ryškių
 20 neuronų ląstelių ir kad nėra jokių kitų ne neuroninių ląstelių. Kultūros buvo gaunamos kaip aprašyta (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112, 319-28). Padalos dydis - 150 μ m. (C)

Fig. 10. NT-3, NGF ir BDNF ekspresijos palyginimas
 25 graužikų audiniuose, įvertinant Northern blotavimu. Iš nurodytų žiurkių audinių (kairiosios fotografijos) arba pelių audinių (dešinėsios fotografijos) buvo išskirta RNR (Auffray C. ir Rrougeon T., 1980, Eur. J. Biochem.,
 30 107, 303-14). Dešimt mikrogramų RNR iš nurodytų šaltinių buvo frakcionuojama 1% agarozės gelyje ir pernešama ant nailoninės membranos 10x SSC; trigubas blotavimas ir hibridizavimas buvo atliekamas (Mahmond M. ir Lin V. H., 1989, Biotechniques, 7, 331-3) 68°C su
 35 32P žymėtais (Fleingerg A. P. ir Vogelstein, 1984, Anal. Biochem., 137, 266-7) žiurkės NT-3, žiurkės BDNF ir žiurkės NGF DNR fragmentais, po to praplaunama 68°C

su 2x SCC, 0,1% SDS. NT-3, BDNF ir NGF DNR fragmentai buvo gaunami iš ekspresijos sistemų, kuriose buvo šių baltymų genai plazmidėje pCDM18, XhoI insertai, kurių dydis apie 775 bp buvo atskirti gėlyje prieš žymėjimą radioaktyviu fosforu. Taip pat šiame pieš. idėta nuotrauka gėlio, ryškinto etidio bromidu, tai įgalina įvertinti bendrą DNR kiekį pavyzdžiuose.

Fig. 11. Žmogaus ir žiurkės NT-3 geno DNR sekų palyginimas. Prognozuojamas transliacijos pradžios saitas pažymėtas "MATURE". Subrendę žmogaus ir žiurkės NT-3 baltymai turi identišką aminorūgščių liekanų seką, tuo metu "prepro" sritys skiriasi 11 pozicijų, jos pabrauktos.

Fig. 12. Žmogaus NT-3 ekspresija, naudojant metabolitinį žymės įvedimą. Po 5×10^5 COS-M5 ląstelių išsėta 60 mm Petri lėkštelėse ir auginamos per naktį 37°C pilnoje DMEM terpėje su 10% fetalinio jaučio serumo (FBS). Šios ląstelės buvo transfekuojamos (naudojant kalcio fosfatinį metodą, aprašytą Chen ir Okayama, 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-52) su 20 µg plazmidės pC8-hN3 (P1), kurioje yra žmogaus NT-3 genas su citomegalo viruso reguliuojamu promotoriumi, arba mocktransfekuojamos (be plazmidinės DNR). Po 48 valandų ląstelės buvo praplaunamos ir inkubuojamos 1 valandą 1 ml DMEM terpėje be metionino ir cisteino, pridėjus 1% jaučio serumo. Į kiekvieną kultūrą buvo įdedama 35S-metionino ir 35S-cisteino mišinio (po 100 µCi kiekvieno, New England Nuclear), po to ląstelės buvo inkubuojamos 4 valandas 37°C šioje terpėje. Po 50 µl pavyzdžių buvo sumaišoma su 25 µl dvigubos koncentracijos pavyzdžio buferiniu tirpalu, kuriame buvo natrio dodecilsulfatas (SDS), virinami 5 minutes ir atliekama elektroforezė 15% poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS PAGE) Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685). Šie baltymai iš

- poliakrilamidinio gelio po elektroforezės buvo pernešami (3 valandas, 100 mA) ant nailoninės membranos ("Immobilon", Millipore), naudojant buferinius tirpalus aprašytus Tavbin ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354. Membranos buvo džiovinamos ore, žymėti baltymai buvo nustatomi autoradiografijos pagalba (16 valandų, kambario temperatūroje, naudojant fotojuostą Kodak X-AR ir sustiprinimo ekraną Cronex, Du Pont).
- Fig. 13. Diagrama, kurioje parodyta likusių gyvų tirozin-hidroksilazinių ląstelių be NT-3 supernatanto (0) ir su NT-3 supernatantu, esant jo praskiedimams 1:300, 1:100, 1:50 ir 1:25.
- Fig. 14. Diagrama, analogiška aprašytai Fig. 13, išskyrus tai, kad ląstelių koncentracija buvo 9000000 vienoje lėkštelėje.
- Fig. 15-A. NT-3, BDNF ir NGF sintetinių transkriptų palyginimas. Douthibridizacija, naudojant radioaktyvius oligonukleotidus, homologiškus atvirkštinei sekai 5 galo, visi trys transkriptai buvo kontroliuojami, kad būtų lygios sintetinių NT-3, BDNF ir NGF transkriptų koncentracijos (2ng), įvertinus jų koncentraciją spektrofotometriškai.
- Fig. 15-B. NT-3, BDNF ir NGF iRNR lygių įvertinimas bendroje RNR, išskirtoje iš subrendusios žiurkės galvos smegenų, palyginant su RNR standartais. 10μ totalinės RNR, išskirtos iš subrendusios žiurkės galvos smegenų, ir 4, 10 ir 20 pg sintetinių transkriptų, atitinkančių kiekvienam neurotrofinui, buvo blotuojami su specifiniais kiekvienam neurotrofinui, radioaktyviais zondais.

Fig. 16. NT-3, BDNF ir NGF genų ekspresija ir totalinė RNR (po 10 µg takelyje), išskirta iš žiurkių embrionų (A), iš besivystančių žiurkės galvos smegenų (B) ir iš perinatalinių ir suaugusių gyvūnų audinių (C).
 Audiniai: A - BR: suaugusio gyvūno galvos smegenys, standartizuotos, Fig. 1B; Plac: placenta, EMB: visas embrionas, SPC: nugaros smegenys; THY: timusas, LTV: kepenys; HRT: širdis; BR: galvos smegenys. Transkriptų dydis nurodytas tūstančiais bazių (kb) dešinėje.

Fig. 17. NT-3, BDNF ir NGF genų ekspresija ir totalinė RNR (po 10 µg takelyje), išskirta iš naujagimių diskretinių nervų sistemos sričių (A) ir suaugusių gyvūnų.

Sritys: BR: suaugusio gyvūno galvos smegenys, standartizuota kaip Fig. 1B; CBL: smegenėlės; HBR: užpakalinės smegenys; MBR: vidurinės smegenys; DIEN: tarpinės smegenys; STR: stralum ragas; HIP: amono ragas; CTX: neokorteksas; ADR: antinksčiai; RET: tinklainė; SCN: sėdmenų nervas; SPC: nugaros smegenys.

Fig. 18. Kiekybinis NT-3, BDNF ir NGF transkriptų įvertinimas CNS srityse ir periferiniuose audiniuose, naujagimių ir suaugusiųjų. Buvo naudojamas gautų blotavimo produktų, įskaitant ir gautus Fig. 16,17,19 ir Mezhopjero (Maisorpierre ir kt., 1990, Science, 247, 1446-1451), densitometrinis skenavimas. Visi lygiai buvo normalizuoti pagal neurotrofino lygį suaugusiųjų galvos smegenyse; suaugusiųjų galvos smegenyse tie patys visiems neurotrofinams (žiūr. tekstą) ir priimti už vieną vienetą kiekvienam neurotrofinui. Reikšmės, didesnės nei mastelis, užrašytos virš histogramų su trūkiais. Neuraliniai ir neneuraliniai mėginiai pažymėti piešinėliuose. Mėginiai: BRN galvos smegenys, be smegenėlių; CBL: smegenėlės; HBR: užpakalinės smegenys; MBR: vidurinės smegenys; DIEN: tarpinės

smegenys; STR: stralum; HIP: amono ragas; CTX: neokorteksas; OLF: uodžiamosios duobelės; SPC: nugaros smegenys; SCN sėdmenų nervas; RET: tinklainė; ADR: antinksčiai; HRT: širdis LTV: kepenys; THY: timusas, SKN: oda; MUS: skeleto raumenys; LNG: plaučiai, INT: žarnynas; KID: inkstai; SPL: blužnis.

Fig. 19. NT-3, BDNF, NGF ir NGFR genų ekspresija vystantis nugaros smegenims (A, E) smegenėlėms (B, F) ir amono ragui (C, G). 10 ?g totalinės RNR, išskirtos iš skirtingu nurodytu vystymosi laiku, buvo palyginta su įvairių transkriptų ekspresija. Kiekybiniai neurotrofinių transkriptų densitometrijos duomenys pateikti E, F, G.

5. Detalus išradimo aprašymas.

Šis išradimas susijęs su neurotrofinu-3, nauju BDNF/NGF šeimos neurotrofiniu junginiu, o taip pat su kitais BDNF/NGF šeimos nariais, kurie gali būti identifikuoti, naudojant analogiškus metodus. Aiškesniam aprašymui, bet ne apribojimui, detalus išradimo aprašymas suskirstytas į sekančias dalis:

1. papildomų BDNF/NGF šeimos narių identifikacija,
2. neurotrofino-3 klonavimas,
3. neurotrofino-3 ekspresija,
4. biologinio aktyvumo tyrimas,
5. neurotrofino-3 genai ir baltymai,
6. antikūnų prieš neurotrofiną-3 gavimas ir
7. išradimo pritaikymas.

5.1. Papildomų BDNF/NGF šeimos narių identifikavimas

NGF ir BDNF yra šarminiai baltymai, kurie sudaryti iš 120 aminorūgščių liekanų, tarp kurių yra 50% homologija, tarp jų yra ir 6 absoliučiai konservatyvios

cisteino liekanos, kurios aktyviame NGF sudaro tris disulfidinius tiltelius, tai buvo parodyta Bradshaw A., 1978, Ann. Rev. Biochem., 191-216; Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-52. Lyginant evoliuciškai divergentinių NGF sekas, nustatyta, kad aminorūgščių liekanos, flankuojančios cisteino liekanas, sudaro labiausiai konservatyvias molekules sritis (Meier ir kt., 1986, EMBO, 5, 1489-93; Selby ir kt., 1987, J. Neurosci. Res., 18, 293-8). Stebėtina tai, kad šios sritys labiausiai panašios tarp BDNF ir NGF (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-52).

Racionali papildomų BDNF/NGF šeimos narių paieška gali būti atlikta pagal konservatyvius segmentus homologinėse NGF ir BDNF sekose. Pavyzdžiui, papildomi BDNF/NGF šeimos nariai gali būti identifikuoti selekcijos būdu, atrenkant iš nukleino rūgščių sekų tas sekas, kurios yra homologinės BDNF ir NGF, ir toliau identifikuojant atrinktas sekas, kurios nehomologinės BDNF ir NGF. Terminas "nehomologinės" gali būti naudojamas toms sritims, kuriose yra bent šeši nukleotidai, kuriuose bent du nukleotidai skirtingi nei NGF ir BDNF sekose.

Šis išradimas yra rekombinantinės DNR, kurios homologinės BDNF ir NT-3, arba, alternatyviai, NGF ir NT-3, bet kuriose yra sritys, atitinkamai, nehomologinės BDNF ir NT-3, arba NGF ir NT-3. Šie papildomi BDNF/NGF genų šeimos nariai gali būti identifikuoti naudojant zondus, kurie atitinka homologinėms sritims. Tolesnėje analizėje buvo nustatyta, kad šių BDNF/NGF/NT-3 genų šeimos narių sekos skiriasi nuo žinomų BDNF/NGF/NT-3 genų šeimos narių sekų. Pavyzdžiui, palankiausias šio išradimo įgyvendinimas atliekamas sekančiu būdu. Kiekvienam iš keturių konservatyviems segmentams (rėmeliai), nurodytiems lentelėje 3 (žiūr. žemiau), galima

susintetinti oligonukleotidus, kurių dydis - 10 - 20 nukleotidai, kurie koduotų visas įmanomas aminorūgščių liekanų sekas, sutinkamas NGF arba BDNF su trimis arba septyniais gretutiniais kodonais. Sunumeravus nuo N subrendusių polipeptidų galo (taip, kad His(134) baltyme preproBDNF tampa His(1) subrendusiame baltyme), šie keturi rėmeliai gali būti charakterizuojami sekančiai (aminorūgščių liekanų numeracija pagal subrendusius žmogaus baltymus):

10

Lentelė 3.

Rėmelis 1:	NGF	Gly(10) - Ser(19)
	BDNF	Gly(8) - Ser (17)
Rėmelis 2:	NGF	Lys(50) - Cys(58)
	BDNF	Lys(50) - Cys(58)
Rėmelis 3:	NGF	Gly(67) - Asp(72)
	BDNF	Gly(67) - Asp(72)
Rėmelis 4:NGF	NGF	Trp(99) - Cys(110)
	BDNF	Trp(100) - Cys(111)

Oligonukleotidai, susintetinti pagal rėmelių sekų poras (lentelė 3.), gali būti naudojami pradmenimis amplifikavimui PGR pagalba, matrica naudojant RNR arba DNR, išskirtą iš dominančių šaltinių. Šiame šaltinyje gali būti iRNR arba kDNR arba genomine DNR bet kokių eukariotų, kuriuose galima polipeptido, giminingo BDNF arba NGF, ekspresija. Atlikus tik šešias PGR (1 ir 2 rėmelių pradmenys; 1 ir 3 rėmelių pradmenys; 1 ir 4 rėmelių pradmenys; 2 ir 3 rėmelių pradmenys; 2 ir 4 rėmelių pradmenys; 3 ir 4 rėmelių pradmenys) galima surasti geną arba genų produktą, kuriuose yra du iš keturių konservatyvios NGF ir BDNF nurodytų segmentų sekos. Susintetinus kelis skirtingus kiekvienam rėmeliui pradmenis, galima atlikti pilną paiešką, naudojant mažiau PGR. Taip pat galima keisti PGR metu hibridizavimo griežtumą, kad būtų galima varijuoti

nukleotidų sekas, palyginus su nežinomu NGF arba BDNF genu. Jeigu gaunamas segmentas yra anksčiau nežinomas BDNF/NGF genų šeimos segmentas, tai šis segmentas gali būti klonuotas ir sekvenuojamas, ir panaudotas zondų, išskiriant pilną kDNR arba genominių kloną. Po to galima nustatyti nežinomo geno seką, analizuoti jo ekspresiją ir galima sudaryti geno produktą, kuris panaudojamas funkciniai analizei.

Papildant, šio išradimo pagalba galima, panaudojus BDNF/NGF homologines sekas, sukonstruoti naujas rekombinantines molekules, kurios yra BDNF/NGF genų šeimos, bet nesutinkamos gamtoje. Pavyzdžiui, bet ne apribojimui, pagal šį išradimą galima sukonstruoti rekombinantinę molekulę, apjungiant NGF ir BDNF genų dalis. Tokia molekulė gali turėti ir NGF ir BDNF, ir pasižymėti nauju biologiniu aktyvumu, įskaitant agonistinių ir antagonistinių aktyvumus. Pirminės BDNF ir NGF sekos taip pat gali būti panaudotos prognozuojant molekulių tretinę struktūrą, naudojant kompiuterinį modeliavimą (Hopp ir Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824-28); BDNF/NGF chimeriniai rekombinantiniai genai gali būti sukonstruoti iš tretinės struktūros ir biologinio aktyvumo koreliacijos, taip pat gali būti sukonstruoti chimeriniai genai, kuriuose būtų bet kurio vieno arba kelių BDNF/NGF šeimos narių dalys.

5.2 Neurotrofino-3 klonavimas

Iš bet kokio organizmo NT-3 genas gali būti identifikuojamas naudojant homologines tarp BDNF ir NGF sritis, naudojant aukščiau aprašytus metodus. Dvejuose palankiausiuose, specifiniuose šio išradimo įgyvendinimuose šis genas gali būti identifikuotas ir klonuotas sekančiai:

Pirmu atveju, vienas prasminis (arba 5') pradmuo, kurio seka (naudojant IUPAC nomenklatūrą) yra - GGGGATCCGC GG1 TGU MG1 GG1 ATH GA, (pradmuo 1, kuriame yra BamHI ir SacII restriktazių skėlimo sritys) ir antiprasminis (arba 3') pradmuo, kurio nukleotidų seka - TCGAATTCTAG AT 1CK 1AT RAA 1CK CCA (pradmuo 2, kuriame yra EcoRI ir XbaI skėlimo sritys), gali būti naudojami PGR (Saiki ir kt., 1985, Science, 230, 1350-1354), ji atliekama, panaudojant prekybinį termociklerį (pavyzdžiui, "Perkin-Elmer Cetus") ir termostabilią DNR-polimerazę iš Thermus aquaticus (Taq-polimerazė). Apytikriai po keturių renatūracijos ciklų 45°C temperatūroje, likusieji 36 ciklai gali būti atliekami 49°C temperatūroje. Gauti DNR amplifikacijos produktai išgryninami elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje pagalba, ir produktas, atitinkantis numatytą dydį (apie 137 bazių porų) eliuojamas iš gelio, reamplifikuojamas ir po to dviem restriktazėmis suskaldomas, viena skelianti NGF geną, to organizmo, kuris buvo naudojamas segmento amplifikacijai, kita skelianti BDNF geną, amplifikuoto segmento viduje. Nesuskaldyta DNR (ta, kuri, spėjama, kad nekoduoja nei NGF, nei BDNF) gali būti išskirta DNR elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje, eliuojama ir asimetriškai amplifikuojama (Innis ir kt., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9436-9440) ir sekvenuojama (Sanger ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3918-3921), naudojant, pavyzdžiui, pradmenis 1 ir 2.

Pagal tokiu būdu gautą seką gali būti sukonstruoti papildomi prasminiai ir antiprasminiai pradmenys, kurie tiksliau atspindi naujo geno seką. Pavyzdžiui, gali būti naudojami papildomi prasminiai pradmenys, tokie kaip GGGATTGATGACAAA (pradmuo 3), ir ACT CTC AGT GCA AAA CTT CGC (pradmuo 4), ir antprasminis (5') - pradmuo CGG ATC CGA ATT CTG CAG (T) 12V (pradmuo 5). RNR, išskirta iš audinių, sugebančių produkuoti neurotrofinį

aktyvumą, tokie kaip galvos smegenys (naudojant bet kuri standartinį metodą, pavyzdžiui aprašytą Okajama 1987, Meth. Enzymol., 154, 3-28), gali būti transkribuojama atvirkštine tvarka, naudojant, 5 pavyzdžiui, pradmenį 5, kuris yra sukonstruotas sutapimui su 3' poli(A) galais ir kuriame yra restriktazių BamHI, EcoRI ir PstI skėlimo sritys (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). Gauta kDNR gali būti PGR pagalba amplifikuojama, naudojant 10 pradmenis 4 ir 5. Po to gali būti atliekamas Southern blotavimas, naudojant paskutiniosios reakcijos produktus ir hibridizuojama su oligonukleotidų seka žymėta 32P, kuri sutampa su seka žemyn nuo 3 ir 4 pradmenų sekų. Tokiu būdu identifikuoti DNR fragmentai 15 gali būti klonuojami į tinkamą vektorių ir gaunamas ilgesnis intarpas gali būti naudojamas tiriamo organizmo genomines bibliotekos atrankai. Tokiu būdu identifikuoti teigiami klonai gali būti analizuojami standartiniais restrikcines analizės metodais ir 20 nustatoma nukleotidų seka.

Kitu šio išradimo palankiausiu įgyvendinimu gali būti sintetinami oligonukleotidai, atitinkantys keturis baltymo segmentus, kurie yra konservatyvūs tarp NGF ir 25 BDNF. Pavyzdžiui, šios aminorūgščių liekanų sekos (pateiktos Fig. 7D) gali būti:

1. Gly-Gly-(Tyr/Phe)-Ser-Val-Cys-Asp-Ser,
2. Lys-Gly-Tyr-Phe-(Tyr/Phe)-Glu-Thr-Lys-Cys,
- 30 3. Glu-Cys-Arg-Ile-Asp,
4. Trp-Arg-Phe-Ile-Arg-Ile-Asp-Thr-(Ser/Ala)-Cys-Val-Cys.

PG reakcijose gali būti naudojami prasminiai ir 35 antiprasminiai oligonukleotidai (15-26 nukleotidų ilgio, atitinkantys 5-9 aukščiau minėtų sekų aminorūgščių liekanoms kaip prasminės taip ir

antiprasminės krypties, o taip pat nedegeneruoti "galiniai" restriktazių atpažinimo .sritys). Amplifikavimo reakcijos tarp porų, esančių virš prasminių ir žemiau antiprasminių pradmenų gali būti atliekamos standartinėmis sąlygomis arba, pageidautina, optimaliomis sąlygomis kiekvienai pradmenų porai, kurios parenkamos eksperimentiškai. Pavyzdžiui, prasminis pradmuo (atitinkantis 1 amino rūgščių liekanų sekai, žiūr. aukščiau) 5'-CAC TCG ACT CGA CAT CC-GTN-TGY-GAY-WST-RTN-WS-3' ir antiprasminis pradmuo (atitinkantis 2 aminorūgščių liekanų sekai, žiūr. aukščiau) 5'-CCA AGC TTC TAG AAT TC-CA-YTT-NGT-YTC-RWA-RAA-RTA-YTC-3' gali būti naudojami amplifikacijos reakcijoje, naudojant matrica genomine DNR arba kDNR iš tinkamo šaltinio. Amplifikacijos reakcijos produktai, gauti naudojant pradmenų poras į viršų prasminius ir žemyn einančius antiprasminius, gali būti naudojami zondais Southern blotavime hibridizuojant su genomine DNR tam, kad identifikuoti PGR produktą, kuris hibridizuojasi su genomine DNR, kurioje yra sekos, homologinės zondams, taip pat ir sritys, nehomologinės zondams (pavyzdžiui, ne-NGF ir ne-BDNF sekos). PGR produktas, kuriuo identifikuojama nauja genomines DNR seka, gali būti naudojamas genomines bibliotekos DNR arba kDNR atrankai, taip pat klonų, koduojančių naujus NGF/BDNF šeimos narius, selekcijai.

5.3. Neurotrofino-3 ekspresija

Nukleotidų seka, koduojanti NT-3 baltymą, arba jo dalį, gali būti įterpta į atitinkamą ekspresijos vektorių, t.y., į vektorių, kuriame yra būtini transkripcijos ir transliacijos elementai, reikalingi įterptos sekos ekspresijai. Reikalingi transkripcijos ir transliacijos elementai gali būti paimti iš natyvaus NT-3 geno ir/arba iš jo flankuojančių sričių. Įvairios šeimininkų-vektorių sistemos gali būti naudojamos

baltymus koduojančių sekų ekspresijai. Šios sistemos gali būti (bet neapsiribojant tik jomis) žinduolių ląstelių, infekuotų virusais (pavyzdžiui, karvės raupais, adenovirusu ir kt.) sistemos; vabzdžių ląstelių, užkrėstų virusais (pavyzdžiui, bakulovirusu) sistemos; mikroorganizmai - mielės su mielių vektoriais, arba bakterijos, transformuotos DNR bakteriofagais, plazmidine DNR arba kosmidine DNR. Palankiausiame šio išradimo įgyvendinime ekspresijos vektoriuje gali būti promotorius CMV (Stephens ir Cocket, 1989, Nucl. Acids Res., 17, 7110) ir SV40 replikacijos šaltinis. Šių vektorių ekspresijos elementai skiriasi pagal stiprumą ir specifiškumą. Priklausomai nuo naudojamos vektoriaus-šeimininko sistemos, gali būti naudojami bet kokie tinkami transkripcijos ir transliacijos elementai.

Bet kuris anksčiau aprašytų DNR fragmentų įterpimo metodų gali būti naudojamas konstruojant ekspresijos vektorių, kuriuose yra chimerinis genas, kuriame yra atitinkami transkripcijos/transliacijos kontrolės elementai ir seka, koduojanti baltymą. Šie metodai gali būti in vitro ir in vivo rekombinacijos (genetinės rekombinacijos). Nukleino rūgščių sekos, koduojančios NT-3 baltymą arba peptidinį fragmentą, ekspresija gali būti valdoma kita nukleotidine seka taip, kad NT-3 baltymas arba peptidas būtų ekspresuojamas šeimininke, transformuotame rekombinantine DNR. Pavyzdžiui, NT-3 ekspresija gali būti kontroliuojama žinomu elementu - promotoriumi/ekshanseriu. Promotoriai, kuriuos galima naudoti NT-3 baltymo ekspresijos valdymui, bet jais neapsiribojant, gali būti: promotoriaus SV40 sritis (Bernoist ir Chambon, 1981, Nature, 290, 304-310), promotorius, esantis ilgajame 3' terminaliniam pasikartojime Sarkomos viruse Rous (Tamamoto ir kt., 1980, Cell, 22, 787-797), herpes viruso timidin-kinazės promotorius (Wagner ir kt., 1981, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 78, 1444-1445), metalotionino geno reguliatorinės sekos (Birnstler ir kt., 1982, Nature, 296, 39-42), prokariotų ekspresijos vektoriai, tokie kaip β -laktamazės promotorius (Willa-Kamaroff ir kt., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3727-3731), arba
5 tac-promotorius (DeBar ir kt., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21-25), žiūr.. taip pat "Useful proteins from recombinant bacteria" - Scientific American, 1980, 242, 74-94; augalinės kilmės ekspresijos
10 vektoriai, kuriuose yra nopalin-sintetazės sritis (Herrera-Eqtrella ir kt., Nature, 303, 209-213) arba promotorius 35S RNR žiedinių kopūstų mozaikos viruso (Gardner ir kt., 1981, Nucl. Acids Res., 9, 2871), ir fotosintetinio fermento ribulozo-difosfat-karboksilazės
15 promotorius (Herrera ir kt., Nature, 310, 115-120), promotorių elementai iš mielių arba kitų grybų, tokie kaip: promotorius Gal 4, ADC (alkoholdehidrogenazės) promotorius, PGK (fosfoglicerinkinazės) promotorius, šarminės fosfatazės promotorius, ir gyvulinės kilmės
20 transkripcijos kontrolės sritys, kurios pasižymi specifiškumu audiniams ir buvo naudojamos transgeniniuose gyvūnuose: valdymo sritis elastazės I geno, kuris yra aktyvus pankreatinėse acinarinėse ląstelėse (Swiff ir kt., 1984, Cell, 38, 639-646, Ornitz
25 ir kt., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 50, 399-409; MacDonanld, 1987, Hepatology, 7, 425-515), insulino geno valdymo sritis, aktyvi kasos β -ląstelėse (Hanalan, 1985, Nature, 315, 115-122), imunoglobulino geno valdymo sritis, aktyvi limfoidinėse ląstelėse
30 (Grosschedl ir kt., 1984, Cel, 38, 647-658, Adanus ir kt., 1985, Nature, 318, 533-538, Alexander ir kt., 1987, Mol. Cell Biol., 7, 1436-1444), pelių pieno liaukų auglio viruso valdymo sritis, aktyvi sėklidėse, krūties, limfoidinėse ir lytinėse ląstelėse (Zeder ir
35 kt., 1986, Cell, 45, 485-495), albumino geno valdymo sritis, aktyvi kepenyse (Pinkert ir kt., 1987, Genes and Devel., 1, 268-276), α 1-fetoproteino geno valdymo

sritis, aktyvi kepenyse (Krumlauf ir kt., 1985, Mol. Cell. Biol., 5, 1639-1648, Hammer ir kt., 1987, Hammer, 235, 235, 53-58), α 1-antitripsino geno valdymo sritis, aktyvi kepenyse (Kelsey ir kt., 1987, Genes and Devel., 1, 161-171), β -globino geno valdymo sritis, aktyvi mieloidinėse ląstelėse (Mogram ir kt., 1985, Nature, 315, 228-340;; Kollias ir kt., 1986, Cell, 46, 89-94), šarminio baltymo - mieino -geno valdymo sritis, aktyvi galvos smegenų oligodendracitinėse ląstelėse (Readhead ir kt., 1987, Cell, 48, 703-712), miozino lengvos grandinės-2 geno valdymo sritis, aktyvi skeleto raumenyse (Sani, 1985, Nature, 314, 283-286), ir gonadotropinio hormono geno valdymo sritis, aktyvi hipotalame (Mason ir kt., 1986, Science, 234, 1372-1378).

Ekspresijos vektoriai, kuriuose yra NT-3 genas, gali būti identifikuoti trimis bendrais būdais: a) hibridizacija DNR - DNR, b) markerinio geno funkcijos buvimas arba nebuvimas ir c) įterptų sekų ekspresija. Pirmuoju būdu įterptą į ekspresijos vektorių svetimą geną galima nustatyti DNR - DNR hibridizacija, naudojant sekas, kurios yra homologiškos įterptam NT-3 genui. Antruoju atveju sistema rekombinantinis vektorius/šeimininkas gali būti identifikuojama ir atrenkama pagal markerinio geno funkciją (pavyzdžiui, timidinkinazinis aktyvumas, atsparumas antibiotikams, transformacijos fenotipas, akliuzinio intarpo susidarymas bakuloviruse ir kt.). Pavyzdžiui, jei NT-3 genas įterptas į vidų markerio sekos, tai rekombinantai, kuriuose yra NT-3 genas, gali būti identifikuoti pagal markerinio geno funkcijos nebuvimą. Trečiuoju atveju, rekombinantiniai ekspresijos vektoriai gali būti identifikuoti tiriant įterpto svetimo geno produktą. Tokie tyrimai gali būti pagrįsti, pavyzdžiui, fizikinėmis arba funkcinėmis NT-3 geno produkto savybėmis bioeksperimentinėse sistemose.

Kai konkreti rekombinantinė DNR molekulė identifikuota ir išskirta, tai jos padauginimui gali būti naudojami keli žinomi metodai. Kai nustatytos auginimo sąlygos ir tinkamas recipientas, rekombinantiniai ekspresijos vektoriai gali būti padauginti. Kaip buvo aiškinama aukščiau, galima naudoti ekspresijos vektorius arba jų darinius, bet tuo neapsiribojant, : žmogaus ir gyvūnų virusus, tokius kaip karvės raupų arba adenovirusas, vabzdžių virusus, tokius kaip bakulovirusas, mielių vektorius, bakterofago vektorius (pavyzdžiui, lambda), ir plazmidinius ir kosmidinius vektorius, ir kt.

Papildant, recipiento kamienai gali būti pasirenkami taip, kad jis moduluotų įterptų sekų ekspresiją, arba moduluotų ir gamintų geno produktą, norimu specifiniu būdu. Naudojant tam tikrus promotorius, galima padidinti ekspresiją induktorių pagalba; tokiu būdu galima valdyti genų inžinerijos būdu sukonstruoto NT-3 baltymo ekspresiją. Be to, įvairūs recipientai pasižymi charakteringais ir specifiniais transliacijos ir post-transliacinio procesingo ir modifikacijos mechanizmais (pavyzdžiui, baltymų glikozilinimas, skaldymas). Gali būti pasirenkamos ląstelių linijos arba sistemos recipientų tokios, kad gaunamos norimos ekspresuojamo baltymo modifikacijos ir pageidaujamas jo procesingas. Pavyzdžiui, ekspresija bakterijose gali būti naudojama norint gauti neglikozilintą produktą. Ekspresuojant mielėse, galima gauti glikozilintą produktą. Ekspresuojant žinduolių ląstelėse, galima gauti "natyvų" glikozilintą heterologinį NT-3 baltymą. Be to, įvairios sistemos vektorius/šeimininkas gali įtakoti tokias reakcijas, kaip įvairi proteinolizė.

Specifiniame šio išradimo įgyvendinime DNR, koduojanti prepro-NT-3 gali būti klonuota į plazmidę pCMV, amplifikuota, o po to panaudojama COS ląstelių

transfekcijai kalcio fosfatiniu metodu (Chen ir Okayama, 1987, Mol. Cell Biol., 7, 2745-2752), ir NT-3 baltymas išskiriamas iš kultūrinio skysčio (žiūr. Pavyzdžius 6 ir 7, žemiau).

5

Buvo padaryta išvada, kad MGF sintetinamas kaip dvi skirtingos probaltymų formos - ilga ir trumpa (Darling ir kt., 1983, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 48, 427-483). Trumpa forma analogiška "prepro" BDNF ir NT-3 formom. Pagal šią išradimą gali būti naudinga naudoti ekspresines sistemas, kuriose yra DNR, koduojanti analogišką ilgąją BDNF arba NT-3 formą. DNR, koduojanti šias ilgąsias probaltymų formas, gali būti identifikuojama sekvenuojant kDNR genomines DNR sritis, esančias prieš sritis, kurios koduoja subrendusius BDNF arba NT-3, ir nustatant atviro skaitymo rėmelius. Lyginant NT-3 geno seką su NGF ir BDNF sekomis buvo nuspėtas ilgų ir trumpų NT-3 baltymo probaltymų egzistavimas (Fig. 7B). Subrendusių BDNF arba NT-3 baltymų ekspresijos efektyvumas iš ilgos arba trumpos jų probaltymo formos gali priklausyti nuo naudojamos ekspresijos sistemos ir gali skirtis įvairiose ląstelių linijose.

25 5.3.1. Geno ekspresijos produkto identifikacija ir gryninimas

Kai identifikuojamas rekombinantas, kuris ekspresuoja NT-3 geną, geno produktas gali būti analizuojamas. Analizė atliekama remiantis produkto fizikinėmis ir aktyvumo savybėmis, žymint produktą radioaktyviu izotopu ir po to sekančia elektroforeze.

Kai NT-3 baltymas identifikuotas, tai jį galima išgryninti standartiniais metodais: chromatografija (pavyzdžiui, jonų mainų, afinine, gelchromatografija), centrifnuojant, frakcionuojant išsodinimu, arba kitu

standartiniu baltymų gryninimo metodu. Produkto aktyvumas gali būti nustatomas naudojant (bet tuo neapsiribojant) tinkamus viščiuko embriono dorsalinių bazinių neuronų tyrimus, simpatinių ganglijų arba ganglijų kilusių iš neuralinės plakodės.

5.4. Neurotrofino-3 biologinio aktyvumo tyrimas

Pagal šią išradimą galima naudoti bet kokią sistemą, kurios pagalba galima kiekybiškai arba kokybiškai nustatyti NT-3 aktyvumą. Kadangi NT-3, skirtingai nei BDNF ir NGF, itakoja neuritų, kaip iš nodozinių ganglijų, taip ir simpatinių ganglijų, ataugimui, tai bet kuri iš šių sistemų, papildant dorsalinių bazinių ganglijų kultūra (DRG), gali būti naudojama nustatant NT-3 biologinį aktyvumą. DRG tyrimai gali būti atliekami kaip aprašyta Barte ir kt. (1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1199-1203). Nodozinių ganglijų sistema tyrimams gali būti naudojama kaip aprašyta Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112, 319-328). Simpatinių ganglijų sistema tyrimams gali būti naudojama kaip aprašyta Barde ir kt., 1982, EMBO, 1, 549-553).

25 5.5. Neurotrofino-3 genai ir baltymai.

Naudojant aukščiau aprašytus metodus (žiūr. taip pat skyrius 6 ir 7) buvo nustatytos nukleotidų sekos ir iš jų išvestos aminorūgščių liekanų sekos. Buvo nustatyta pelės genomio NT-3 seka, kuri pateikta Fig. 7. Buvo nustatyta žmogaus genomio NT-3 seka, kuri pateikta Fig. 11, tame piešinėlyje taip pat pateikiama ir žiurkės DNR seka. Kiekviena seka arba jų funkciniai ekvivalentai gali būti naudojami šiame išradime. Papildomai, išradimas susijęs su genais ir baltymais, kurie gali būti išskirti iš kiaulės, jaučio, katės, paukščių, arklio arba triušio, o taip pat iš primatų ir

iš kitų gyvūnų, kuriuose yra NT-3 aktyvumas. Išradimas susietas su NT-3 aminorūgščių liekanų sekomis, kurios sudarytos bent iš 10 nukleotidų, taip pat su subsekomis, kurios hibridizuojasi su NT-3 sekomis, 5 kurios naudojamos, pavyzdžiui, hibridizuojant, Southern ir Northern blotavimuose; ir kt. Šiuo išradimu galima gauti NT-3 baltymą, jo fragmentus, darinius, kurių aminorūgščių liekanų sekos pateikiamos Fig. 2, 7 ir 11, arba šių junginių funkcinius darinius. Šio išradimo 10 pagalba gauti NT-3 baltymo fragmentus arba darinius, kuriuose yra antigeninė determinantė (arba determinantės), arba darinius, kurie pasižymi funkciniu aktyvumu. Aprašymo tekste terminas "funkciškai aktyvus" reiškia turintis teigiamą NT-3 baltymo aktyvumą pagal 15 tyrimus, pavyzdžiui, tiriant viščiukų embrionų DRG, nodozinius arba simpatinius ganglijus.

Pavyzdžiui, nukleino rūgščių sekos, pateiktos Fig. 2, 7 ir 11, gali būti pakeistos aminorūgštis pakeičiant, 20 papildant arba pašalinant, bet šie pakeitimai išsaugo funkciškai ekvivalentes molekules. Koduojančių nukleotidų sekos degeneracijos dėka, kitos DNR sekos, koduojančios iš pagrindų tas pačias aminorūgščių liekanų sekas, pateiktas Fig. 2, 7 ir 11, gali būti 25 naudojamos praktikoje sutinkamai su šiuo išradimu. Jos apima, bet tuo neapsiribojant, nukleotidų sekas, kuriose yra visa arba NT-3 geno dalis, pateikta Fig. 2, 7 ir 11, kuriose yra įvairių kodonų pakeitimai, kurie koduoja funkciškai ekvivalentes aminorūgščių liekanas 30 šiose sekose, ir produkuojant "tylias" mutacijas. Analogiškai kaip NT-3 baltymams, arba jų fragmentams arba dariniams šiam išradimui priklauso, bet tuo neapsiribojant, tokie baltymai, kurių pirminė aminorūgščių liekanų seka visa arba dalis pateikta Fig. 35 2, 7 ir 11, apimant pakeistas aminorūgščių liekanų sekas, kur aminorūgščių liekanos pakeistos funkciškai ekvivalentiškomis, atsirandant tyliai mutacijai.

Pavyzdžiui, viena arba kelios aminorūgščių liekanos vidury sekos gali būti pakeistos kitomis panašiomis savo poliariškumu, kuri yra funkcinis ekvivalentas, sudarydama tyliuosius sekos pakeitimus. Pakeitimai gali būti atlikti tipų, kuriems priklauso pakeičiama aminorūgšties liekana, viduje. Pavyzdžiui, nepolinės (hidrofobinės) aminorūgščių liekanos yra alaninas, leucinas, valinas, prolinas, fenilalaninas, triptofanas ir metioninas. Polinės neutralios aminorūgščių liekanos yra glicinas, serinas, treoninas, cisteinas, tirozinas, asparaginas ir glutaminas. Teigiamos aminorūgščių liekanos (šarminės) - argininas, lizinas ir histidinas. Neigiamos (rūgštinės) - asparagino ir gliutamino rūgštys. Šis išradimas apima NT-3 baltymus arba jų fragmentus arba jų darinius, kurie diferentiškai modifikuoja transliacijos metu arba po jos, pavyzdžiui, glikozilinant, vykstant proteinolizei, jungiantis su antikūnais arba su kitais ląstelių ligandais, ir kt.

Papildomai, šis NT-3 baltymas gali būti papildomai mutuotas in vitro arba in vivo, norint sukurti ir/arba suardyti transliavimo, iniciavimo ir/arba terminavimo seką, arba sudarant koduojančios srities variacijas ir/arba sudarant naujas restriktazių skėlimo sritis arba pašalinant esančias tam, kad palengvinti tolesnį in vitro modifikavimą. Gali būti naudojama bet kurie mutagenizės metodai, apimantys, bet neapsiribojant, kryptinga mutageneze in vitro (Hutchinsen ir kt., 1978, J. Biol. Chem., 253, 6551), naudojant TAB® linkerius (Pharmacia) ir kt.

5.6. Anti-neurotropinas-3 antikūnų generavimas

Pagal šį išradimą NT-3 baltymas, taip pat jo fragmentai arba dariniai gali būti naudojami kaip antigenai generuojant anti-NT-3 antikūnus.

Tam kad sustiprinti imuninį atsaką NT-3, NT-3 aminorūgščių liekanų seka gali būti analizuojama tam, kad nustatyti imunogenines molekulės sritis. Pavyzdžiui, aminorūgščių seka gali būti analizuojama kompiuteriu, nustatant paviršinius epitopus pagal aprašytą metodą Weals, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824-3828, kuris buvo sėkmingai pritaikytas identifikuojant antigeninius peptidus Hepatito B paviršiniame antigene. Alternatyviai įvairių gyvūnų NT-3 baltymų sekos gali būti analizuojamos, nustatant santykinai nehomologines sekos sritis; šios nehomologinės sekos su didesne tykimybe bus imunogeniškos skirtingoms gyvūnų rūšims.

Norint gauti monokloninius antikūnus prieš NT-3, gali būti naudojamas bet kuris metodas, kurio pagalba galima gauti stabilias ląsteles, produkuojančias monokloninius antikūnus. Pavyzdžiui, hibridominė technologija, sukurta Kohler ir Milstein (1975, Nature, 256, (495-487), taip pat triominė technologija - žmogaus B-ląstelių hibridoma (Kozbor ir kt., 1983, Immunology today, 4, 72), EBV - hibridominė technologija žmogaus monokloninių antikūnų sintetinimui (Cole ir kt., 1985, Kn. "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R., Ziss Inc., p. 77-96) ir kiti panašūs metodai, kurie apima šį išradimą.

Monokloniniai antikūnai terapijai gali būti žmogaus monokloniniai antikūnai arba chimeriniai žmogaus-pelės (arba kitų gyvūnų rūšių) monokloniniai antikūnai. Žmogaus polikloniniai antikūnai gali būti gaunami bet kuriais žinomais metodais (pavyzdžiui, Teng ir kt., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7308-7312; Kozbor ir kt., 1983, Immunology today, 4, 72-79; Olsson ir kt., 1982, Meth. Enzymology, 92, 3-16).

Chimerinių antikūnų molekulės gali būti iš pelės antigeną surišančio domeno ir žmogaus konservatyviosios dalies (Morrison ir kt., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851, Takeda ir kt., Nature, 314-452).

5

Įvairios žinomos procedūros gali būti naudojamos polikloninių antikūnų su NT-3 baltymų epitopais generavimui. Antikūnų gavimui įvairūs gyvūnai gali būti imunizuojami NT-3 baltymo arba jo fragmentų, arba 10 darinių injekcijomis tokiems gyvūnams, bet tuo neapsiribojant, kaip: triušiai, pelės, žiurkės ir kt. Įvairūs adjuvantai gali būti naudojami imuninio atsako sustiprinimui, jų pasirinkimas priklauso nuo gyvūnų rūšies, adjuvantai gali būti, bet tuo neapsiribojant, 15 Freido mineralinės alyvos (pilnas ir nepilnas adjuvantas), aliuminio hidroksidas, paviršiaus aktyvios medžiagos tokios, kaip lizolecitinas, pluroniniai polioliai, polianijonitai, peptidai, alyvos emulsijos, sraigės limfos hemocianinai, dinitrofenolis ir 20 potencialiai naudingi žmogui adjuvantai - BBC (Bacille Calmette Guerin) ir Corynebacterium parvum.

Molekulinis antikūnų klonas NT-3 baltymo epitopui gali būti atrenkamas žinomų metodų pagalba. DNR 25 rekombinantinės technologijos (žiūr. pavyzdžiui Maniatis "Laboratorinis molekulinio klonavimo vadovas", 1982, Cold Spring Harbor, N-J) pagalba galima sukonstruoti nukleines sekas, kurios koduotų monokloninių antikūnų molekules arba antigeną 30 surišančias šių molekulių sritis.

Antikūnų molekulės gali būti išgrynintos žinomais metodais, pavyzdžiui, imunoafinine arba imunoadsorbcine 35 chromatografija, kitomis chromatografijos rūšimis tokiomis, kaip HPLC (efektyvi skysčių chromatografija), arba derinant įvairias chromatografijų rūšis ir kt.

Antikūnų fragmentai, kuriuose yra molekulės epitopas, gali būti generuojami žinomais metodais. Pavyzdžiui, tokie fragmentai gali būti, bet tuo neapsiribojant, F(ab')₂ fragmentas, kuris gali būti gaunamas skaldant antikūno molekulę pepsinu; Fab' fragmentas, kuris gali būti generuojamas suardant disulfidinius tiltelius F(ab')₂ fragmente, ir 2Fab arba Fab fragmentas, kuris gaunamas antikūno molekulę suskaldžius papainu ir suardžius reduktoriumi.

5.7. Išradimo pritaikymas.

Šis išradimas susietas su NT-3 nukleino rūgščių sekomis, su išgrynintu NT-3 baltymu, peptidiniais fragmentais arba dariniais. NT-3 gali būti gaunamas pakankamais kiekiais diagnostikai ir terapiniam naudojimui. Analogiškai, anti-NT-3 antikūnai ir NT-3 nukleotidiniais zondais gali būti naudojami diagnostikai ir terapijai. Daugumoje atvejų pageidautina naudoti NT-3 3 genus arba genų produktus tų pačių gyvūnų rūšių diagnostikai ir terapijai, nors specifiniais atvejais gali būti naudingas kryžminis NT-3 panaudojimas.

5.7.1. Panaudojimas diagnostikoje.

Šis išradimas, kuris susietas su nukleino rūgščių sekomis, koduojančiomis NT-3 baltymą, NT-3 baltymu, peptidų fragmentais arba NT-3 dariniais, o taip pat su antikūnais prieš NT-3 baltymą, peptidus arba darinius, gali būti panaudotas susirgimų arba nervų sistemos sutrikimų, kurie surišti su NT-3 ekspresijos pakitimais, diagnostikai.

Įvairiuose išradimo įgyvendinimuose NT-3 genai ir jiems atitinkančios nukleino rūgščių sekos ir subsekos, apimant ir komplementarias sekas, gali būti naudojami diagnostinei hibridizacijai. NT-3 nukleino rūgščių

sekos ir subsekos, kurios sudarytos apytikriai 15 nukleotidų, gali būti naudojamos zondais hibridizuojant. Hibridizacija gali būti naudojama būklės įvertinimui, prognozei, diagnostikai arba 5 stebėjimui pakitimų arba ligų, susietų su NT-3 ekspresijos pakitimais, apimant, konkrečiai būklės, dėl kurių įvyksta sensorinių neuronų pakenkimai. Tokios ligos ir būklės yra, bet tuo neapsiribojama, CNS traumos, infarkcija, infekcija, degeneratyvinė nervų 10 liga, augliai arba pooperaciniai pakitimai, apimantys, bet tuo neapsiribojama, Alchaimerio ligą, Parkinsono ligą, Chantingtono chorėją. Pavyzdžiui, totalinė RNR iš paciento audinio gali būti ištirta ir nustatyta, ar yra NT-3 baltymo iRNR, NT-3 iRNR kiekio pakitimas nurodys 15 neuronų degeneraciją.

Alternatyviame šio išradimo įgyvendinime antikūnai prieš NT-3 baltymą, peptidinius fragmentus arba darinius gali būti panaudoti nervų sistemos sutrikimų 20 ir ligų diagnostikai, konkrečiai, sensoriniai pakitimai ir tinklainės degeneratyviniai susirgimai, o taip pat pakenkimai ir ligos, išvardintos anksčiau. Antikūnai, pagal šį išradimą, gali būti panaudojami, pavyzdžiui, hibridizacijai "in situ" (vietoje), naudojant paciento 25 audinius, jei toks tyrimas reikalingas. Kitame pavyzdyje antikūnai pagal šį išradimą gali būti naudojami ELISA, nustatant ir/arba įvertinant NT-3 kiekius, esančius tirpaluose; panašiu būdu antikūnai pagal šį išradimą gali būti naudojami Western 30 blotavimui nustatant ir/arba įvertinant NT-3, esančius audiniuose arba tirpaluose.

Tolesniame šio išradimo įgyvendinime NT-3 baltymas, peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti 35 naudojami nervų sistemos pakenkimų ir ligų diagnostikai. Konkrečiu atveju, bet ne apsiribojant, žymėti NT-3 baltymai arba peptidiniai fragmentai gali

būti naudojami audinių arba ląstelių, turinčių NT-3 receptorių, identifikacijai tam, kad identifikuoti NT-3 receptorių ekspresijos aberacijas ir po to įvertinant potencialius nukrypimus nuo normos audiniuose arba ląstelių reakciją į NT-3.

5.7.2. Pritaikymas terapijoje.

Šis išradimas, susijęs su nukleino rūgščių sekomis, koduojančiomis NT-3 baltymus, su baltymais, peptidiniais fragmentais arba dariniais, taip pat antikūnais prieš NT-3 baltymą, peptidus arba darinius, gali būti panaudotas nervų sistemos ligų ir pakenkimų, kurie susiję su NT-3 baltymo ekspresija arba kurie gali pasireikšti dėl NT-3 poveikio organizmui arba su NT-3 antikūnais, gydymui.

Įvairiuose šio išradimo įgyvendinimuose NT-3 baltymas, peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti įvedami pacientams, kurių nervų sistema pakenkta traumų, chirurgijos, išemijos, infekcijos, medžiagų apykaitos susirgimų, bado (maisto trūkumo), esant augliams arba apsinuodijus. Įvairiuose specifiniuose šio išradimo įgyvendinimuose NT-3 gali būti įvedamas lokaliai prie sensorinių neuronų, kurie buvo išpjauti, apimant, bet neapsiribojant, dorsalinius bazinius ganglijų neuronus arba bet kuriuose audiniuose: kelio, smilkinio arba nodoziniame ganglijuje; vestibuloakustiniame komplekse VIII kaukolės nervo, ventrolateraliniame poliuse maksilomandibularinės dalies trišakiame gangliuje, mezencefaliniame trigubam branduolyje 1 ir simpatiniuose ganglijuose. Gali būti pageidautina įvesti NT-3 peptidus arba NT-3 baltymą sorbuotus ant membranos, pavyzdžiui, silastiko membranos, kuri gali būti implantuojama arti pažeisto nervo. Šis išradimas taip pat gali būti panaudojamas, pavyzdžiui, pacientų, sergančių diabetine neuropatija, pavyzdžiui,

multipleksine mononeuropatija ir diabetine periferine neuropatija, greitesniam atsistatymui.

5 Papildant, diabetinės neuropatijos atveju NT-3 peptidai
arba NT-3 baltymai taip pat gali būti naudojami kitų
periferinių neuropatijų gydymui, įskaitant, bet
neapsiribojant, sekančias: neuropatija, susijusi su
virusine infekcija, įskaitant įgyto imunodeficito
10 sindromą (AIDS), infekcinė mononukleozė su polineuritu,
virusinis hepatitas su polineuritu, Geine-Bare
sindromas (polineuritas); neuropatija, susieta su
botulizmu, toksinės polineuropatijos, įskaitant
neuropatijas, susijusias apsinuodijimu švinu arba
alkoholiu: maistinės neuropatijos, įskaitant subaštrią
15 kombinuotą degeneraciją; angiopatinės neuropatijos,
įskaitant neuropatijos, susietas su sisteminė raudonąja
vilklige (lupus erythematosus); neuropatijos, susietos
su sarkoidinėmis ligomis; karcinomatozinė neuropatija;
kompresinė neuropatija (pavyzdžiui, riešo tunelio
20 sindromas) ir paveldimos neuropatijos. Paveldimos
neuropatijos, kurios gali būti gydomos NT-3 arba
susietais su NT-3 baltymais, gali būti šeivikaulio
muskulatūros atrofija, "familial disntonia" ir
progresuojanti hipertoninė neuropatija.

25 Kituose šio išradimo įgyvendinimuose NT-3 baltymas arba
peptidiniai fragmentai arba dariniai gali būti
panaudoti įgytų būsenų gydymui arba
neurodegeneraciniais pažeidimams, įskaitant, bet
30 neapsiribojant, Alchaimerio ligą, Parkinsono ligą,
išsėtinę sklerozę, amiotrofinę lateralinę sklerozę ir
Chantingtono choreją.

35 Specifiniame šio išradimo įgyvendinime NT-3 baltymo
arba šio baltymo peptidinių fragmentų arba darinių
įvedimas gali būti atliekamas su chirurgine audinio
implantacija, gydant Alchaimerio ligą ir/arba

Parkinsono ligą. Kaip parodyta 11 dalyje, žiūr. žemiau, NT-3 palaiko dopaminergetinių neuronų gyvybingumą; dopaminergetiniai neuronai žūsta sergant Parkinsono liga, NT-3 gali būti naudojami gydant Parkinsono ligą, šio gydymo metu, jei tai būtina, įvedamas pacientui 5 terapiškai efektyvus NT-3 kiekis. Parodyta, kad apie 35 % pacientų, sergančių Parkinsono liga, pasireiškia Alchaimerio tipo demencija; NT-3, gautas pagal šią išradimą, gali būti naudojamas terapiniam Alchaimerio ligos su Dauno sindromu gydymui. Papildant, kaip 10 pademonstruota 12 dalyje, (žiūr. žemiau) dideli NT-3 kiekiai eksperimentuojami nervų sistemai vystantis ir diferencijuojant; atitinkamai, NT-3 gali būti naudojamas nervų sistemos vystymosi nukrypimams gydyti, 15 tokiems kaip Dauno sindromas, o taip pat gydant nukrypimus, susietus su ląstelių dediferenciacija, tokių kaip augliai arba esant pažeidimams, kurie atsiranda regeneruojantis nervų sistemai. NT-3, gautas pagal šią išradimą, gali būti naudojamas įvairių 20 demencijų gydymui, o taip pat įgimtų komutacijos pažeidimų gydymui.

Tolesniame šio išradimo įgyvendinime NT-3 baltymas, jo fragmentai ir dariniai gali būti naudojami kartu su 25 kitais citokinais tam, kad pasiektų norimą neurotropinį efektą. Pavyzdžiui, bet ne apsiribojimui, NT-3 pagal šią išradimą, gali būti naudojamas su kitu agentu, pavyzdžiui su BDNF arba NGF, norint pasiekti sinergetinį stimuliuojantį poveikį neuronų augimui 30 ir/arba palaikyti gyvybingumą ir arba funkcijos išsaugojimui arba sustiprinimui, "sinergetinis" poveikis čia paminėtas ta prasme, kad kombinacijos NT-3 baltymo arba peptidinio fragmento arba darinio su kitu agentu duoda efektą, kuris yra stipresnis, nei 35 naudojant šiuos agentus atskirai. NT-3 gali veikti sinergetiškai su kitais peptidiniais faktoriais, kilusiais iš CNS ir kurie nėra pilnai charakterizuoti

5 augant, vystantis, palaikant diferencijuotas funkcijas ir įvairių neuronų subpopuliacijų centrinėje nervų sistemoje gyvybingumo palaikymui. Alternatyviai NT-3 ir antro neurotropinio agento poveikis gali būti papildantis.

10 Remiantis pilna NT-3 molekulės charakteristika pagal šią išradimą gali būti sukonstruoti nauji peptidiniai fragmentai, dariniai arba NT-3 baltymo mutantai, kurių poveikis gali būti kaip antagonistų visoms arba kai kurioms NT-3 funkcijoms. Tokie NT-3 antagonistai gali būti naudojami selektyviam sensorinių neuronų pašalinimui, pavyzdžiui, gydant chronišką skausmų sindromą. Kitame šio išradimo įgyvendinime antikūnai 15 prieš NT-3 baltymą arba peptidinį fragmentą arba jo darinius gali būti įvedami pacientams, sergantiems įvairiais neurologiniais susirgimais. Pavyzdžiui, toks gydymas gali būti taikomas pacientams, kurių organizme 20 produkuojamas per didelis NT-3 kiekis. Anti-NT-3 antikūnai gali būti naudojami, norint išvengti aberatinės sensorinių neuronų regeneracijos (pavyzdžiui, po operacijos), arba kaip buvo minėta aukščiau, gydant chroniško skausmo sindromą.

25 NT-3 pasiskirstymas audiniuose, kaip aprašyta 6 ir 7 dalyse, žemiau, rodo, kad didesni NT-3 irNR kiekiai yra ekspresuojami galvos smegenyse, inkstuose, širdyje ir blužnyje, lyginant su kitais audiniais. NT-3 baltymas, produkuojamas ne nervų audiniuose, gali būti identiškas 30 arba neidentiškas ekspresuojamam galvos smegenyse. Atskiros NT-3 formos gali funkcionuoti kaip nervų audiniuose, taip ir ne nervų audiniuose; NT-3 ekspresijos pakitimai gali liudyti apie ligas, kurios veikia nervų sistemą, ir kitas organų sistemas. 35 Alternatyviai, giminingos NT-3 šeimos molekulėms gali atlikti įvairias funkcijas nervų ir ne nervų audiniuose. Todėl NT-3 pagal šią išradimą gali būti

naudojamos gydymui ligų, susietų su nervų sistema, o taip pat nervų reguliuojančių ne nervų audinių ligas, įskaitant širdį, hemopoetinę, inkstų ir retikuloendotelines sistemas.

5

Be to, kaip nurodyta 6 dalyje, žemiau, NT-3 ekspresija sustiprėjusi nesubrendusiuose gyvūnuose, lyginant su suaugusiais. Pagal šią išradimą NT-3 gali būti naudingas gydant vystymosi nukrypimus arba, alternatyviai, stimuliuojant nervų sistemos atsinaujinimą po CNS pakenkimų.

10

5.8. Vaistinės formos.

Pagal šią išradimą aktyvių kompozicijų sudėtyje gali būti visas NT-3 geno produktas arba tik jo dalis (dalys), apimant baltymą, peptidinius fragmentus arba jo darinius, arba antikūnus (arba antikūnų fragmentus) prieš NT-3 baltymą, peptidinius fragmentus arba jo darinius, arba derinyje su bent vienu kitu agentu, tokiu kaip NGF arba BDNF; šios kompozicijos gali būti įvedamos su bet koku steriliu biosuderinamu farmaciniu nešikliu, įskaitant, bet neapsiribojant, fiziologinį tirpalą, buferinį fiziologinį tirpalą, dekstrozę ir vandenį.

25

NT-3 baltymo, peptidinio fragmento arba darinio aminorūgščių liekanų seka arba subseka gali būti pagrinde tokia, kaip pateikiama Fig. 2, 7 ir 11; gali būti pageidautina naudoti NT-3 baltymą, nuo 140 iki apytikriai 258 aminorūgšties liekanos, kaip pavaizduota Fig. 2, nuo 1 iki apytikriai 119 aminorūgšties liekanos, kaip pavaizduota Fig. 7, arba nuo 1 aminorūgšties liekanos, pažymėtos "subrendęs" (mature) Fig. 11 iki peptidinės grandinės galo, pavaizduotos Fig. 11, arba kurio sudėtyje yra funkciškai ekvivalenti seka, kadangi ši subseka, kaip spėjama, funkcionali NT-

35

3 molekulės dalis. NT-3 seka gali būti bet kurių tinkamų gyvūnų NT-3 geno seka, įskaitant, bet tuo neapsiribojant, žmogaus, kiaulės, žiurkės, viščiuko, karvės, šuns, avies, ožkos, katės, triušio ir kt.

5 Naudojami NT-3 baltymo, peptidinio fragmento, darinio arba antikūnų kiekiai, kurie efektyvūs gydant ligas arba būsenas, priklauso nuo pakenkimų ir būsenų prigimtės, šie kiekiai gali būti nustatyti standartinių klinikinių tyrimų metu. Kai įmanoma,

10 pageidautina nustatyti atsako priklausomybę nuo preparato kiekio pradžioje in vitro, pavyzdžiui biologiniuose NT-3 tyrimuose, aprašytais aukščiau, po to modelinėse sistemose su gyvūnais, o tik po šių tyrimų atlikti tyrimus žmonėms. Remiantis duomenimis,

15 gautais in vitro, specialiame šio išradimo įgyvendinime, vaistinė forma, pagal šį išradimą, efektyviai palaikanti sensorinių neuronų gyvybingumą, gali palaikyti vietinę NT-3 baltymo koncentraciją apie 0.1-10 µg/ml.

20 Vaistinio preparato įvedimo būdai gali būti, bet neapsiribojant tik jais, intrakutaninis, intramuskulinis, intraabdominalinis, į veną, po oda, oralinis ir intranazalinis. Papildomai, gali būti

25 naudinga vaistinių preparatų, pagal šį išradimą, įvesti į centrinę nervų sistemą bet koku tinkamu būdu, įskaitant intragastrinį ir intrarektalinį; intragastrinis įvedimas gali būti atliekamas kateterio pagalba, pavyzdžiui, pritvirtinto prie rezervuaro,

30 tokio, kaip Ommaya.

Gali būti naudinga šio išradimo vaistines formas įvesti lokaliai į tas sritis, kuriose reikalingas gydymas, tai gali būti pasiekama, pavyzdžiui, bet tuo

35 neapsiribojant, vietine infuzija chirurginės operacijos metu, injekcija kateterio pagalba arba implantuojant, implantantas gali būti poringas arba neporingas, arba

gėlinis, įskaitant membranas, tokias, kaip sialastinės membranos arba plaušai.

Pagal šį išradimą farmacinės kompozicijos, kurių sudėtyje yra NT-3 baltymai, peptidiniai fragmentai arba dariniai, gali būti įvedamos liposomų forma, mikrodalelėmis arba mikrokapsulėmis. Įvairiuose šio išradimo įgyvendinimuose gali būti naudinga naudoti tokias vaistines formas tam, kad pasiektų pastovų NT-3 arba jam giminingų produktų išsiskyrimą.

Šiuo išradimu numatomas ląstelių, aktyviai produkuojančių NT-3, giminingas NT-3 substancijas, NT-3 antagonistus arba anti-NT-3 antikūnus įvedimas į tas sritis, kuriose reikalinga padidinta arba sumažinta NT-3 koncentracija.

6. Pavyzdys. Pelės neurotrofino-3 geno klonavimas ir charakterizavimas

6.1. Medžiagos ir metodai

6.1.1. Polimerizacinė grandininė reakcija

Pagal dvi aminorūgščių liekanų sekas, kurios yra konservatyvios BDNF ir visuose žinomuose NGF, buvo susintetinti du oligonukleotidiniai pradmenys (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). Prasminio (arba 5') pradmens seka: GGG GAT CCG C GG1 TGY MGY GG1 ATH GA (Pradmuo 1, UPAC nomenklatūra, 1=Inozinas), šiame pradmenyje yra BamHI ir SacII skėlimo sritys; antiprasminio (3') pradmens seka: TCG AAT TCT AG AT 1CK 1AT PAA 1CK CCA (pradmuo 2), šiame pradmenyje yra EcoRI ir XbaI skėlimo sritys.

PG reakcija (Saiki ir kt., 1985, Science, 230, 1350-54) buvo atliekama naudojant 1µg pelės genominės DNR,

atliekant reakciją "Perkin-Elmer Cetus" termocikleryje su Ta-polimeraze (Gene AmpTM). Po 4 ciklų, kai renatūravimo temperatūra buvo 45°C, likusieji 36 ciklai buvo atliekami esant renatūracijos temperatūrai 49°C.

5 Gauti amplifikacijos produktai buvo laukiamo dydžio - 137 bazių porų, buvo eliuojami iš poliakrilamidinio gelio, atlikta pakartotinė amplifikacija ir suskaldyti HindIII ir AraI, pirmoji restriktazė perskelia pelės NGF, o antroji - pelės BDNF. Nesuskaldyta DNR buvo

10 eliuuojama ir asimetriškai amplifikuojama (Janis ir kt., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9436-9440) ir sekvenuojama (Sanger ir kt. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3918-3921), naudojant pradmenis 1 ir 2. Remiantis tokiu būdu gauta seka, buvo susintetinta du

15 papildomi prasminiai pradmenys, atitinkantys nukleotidams 808-822 (pradmuo 3) ir 824-844 (pradmuo 4) prie jų buvo prijungta SalI ir PstI skėlimo sekos. RNR buvo ekstrahuojama suaugusios pelės galvos smegenų, kepenų ir raumenų (Okayama ir kt., 1987, Meth.

20 Enzymology, 154, 3-28) ir atvirkštinės transkriptazės pagalba buvo transkribuojama, naudojant atiprasmini (3') pradmenį: CGG ATC CGA ATT CGT CAC (T)12V (pradmuo 5), sukonstruotas kad sutaptų su 3' poli(A) galu, turintis BamHI, EcoRI ir PstI skėlimo sritis,

25 reikalingas klonavimui (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). Šios iRNR buvo PGR amplifikuojamos, naudojant pradmenis 3 ir 5, reamplifikuojamos, naudojant pradmenis 4 ir 5. Southern blotavimas buvo atliekamas su paskutiniosios reakcijos produktais ir

30 hibridinama su 32P pažymėtu gale oligonukleotidu, atitinkančiu fragmentą nuo 879 iki 893 nukleotido. Tokiu būdu identifikuoti DNR fragmentai buvo klonuoti į Bluescript® SK⁺ vektorių ("Stratagene") ir ilgesnysis gautas insertas (460 bazių porų) buvo naudojamas EMBL3

35 pelių genominės bibliotekos (Klontex) skryningui. Buvo nustatyti du teigiami klonai, ir vieno klono DNR buvo suskaldyta įvairiomis restriktazėmis. Restriktiniai

fragmentai buvo zonduojami 460 bazių porų insertais: 700 bp HindIII ir 4000 bp PstI buvo subklonuoti į Bluescript® SK⁺ vektorių. Pademonstruota pilna HindIII seka 3' ir 5' galuose pratęsta naudojant PstI fragmentą.

6.1.2. Northern blotavimas.

Totalinė RNR buvo ekstrahuojama iš suaugusios moters (Okayama ir kt., 1987, Meth. Enzym., 154, 3-2), atliekama elektroforezė 1.3% formaldehidu susiūtime agarozės gėlyje (Hetrach ir kt., 1977, Biochem., 16, 4743-4751). RNR buvo pernešama ant nailoninės membranos (Hydond-N, Amersham) ir hibridizuojama per naktį 42°C 1 ml 200 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7.2), kuriame buvo 40 % formamido, 5x Denhardtto tirpalo ir 200 µg/ml lašišos spermos DNR. Naudojamas atsitiktinis dvispiralis zondas buvo žymėtas 32P (Feinberg ir kt., 1979, Anal. Biochem., 137, 266-267) atitinkantis sekai nuo nukleotido 319 iki 1093 (Pieš. 2). Specifinis aktyvumas buvo 1.3×10^8 cpm/µg, 10^7 cpm buvo pridėta į hibridizacijos buferinį tirpalą. Praplaunama buvo 60 min. su 0.1xSSC buferiniu tirpalu su 0.5 % SDS. Filtrai buvo eksponuojami 5 dienas - 70°C su sustiprinančiu ekranu.

6.1.3. Neurotrofino-3 ekspresija

Oligonukleotidiniai pradmenys buvo sintetinami pagal pirmuosius 19 nukleotidus (plius EcoRI skėlimo sritis) ir paskutiniuosius 19 nukleotidus (plius BamHI skėlimo sritis atviro skaitymo rėmelyje, pateiktoje Fig. 2). Po PGR amplifikacijos, naudojant matrica pateiktą Fig. 2 PstI genominių fragmentą, gautas produktas buvo klonuojamas į EcoRI - BamHI skėlimo sritį ekspresijos vektoriuje pCMV (Anderson ir kt., 1989, J. Biol. Chem. 264, 8222-8229). Buvo nustatyta

NT-3 intarpo seka vektoriuje pCMV. Ląstelės COS-1 buvo transfekuojamos naudojant kalcio fosfatinį būdą (Chen ir Okayama, 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2752), kultivavimo terpė buvo surenkama, kaip aprašyta aukščiau (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). Kontrolinė terpė buvo gaunama paveikus COS-1 ląsteles kalcio fosfatu, arba pCMV/NT-3 konstruktu iš kurio buvo pašalintas NT-3 geno stop kodonas. Abiejose terpėse nebuvo biologinio aktyvumo, kai praskiedimas - 1:50. Disocijuoti nodoziniai ganglijai ir neuronai buvo kultivuojami 24 šulinėlių lėkštelėse (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol. 112, 319-328), BDNF buvo išskirtas iš kiaulės galvos smegenų (Hofer ir Barde, 1988, Nature, 331, 261-262).

6.2. Rezultatai ir jų aptarimas.

Pagrindinė problema, norint charakterizuoti neurotrofinius faktorius, yra mažas jų kiekis. Kaip NGF, taip ir BDNF buvo charakterizuojami, naudojant baltymų gryninimo metodus (Cohen ir kt., 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, 302-311, Barde ir kt., 1982, EMBO, J1, 549-553). Toks metodas yra tinkamas NGF, nes jo kiekiai suaugusios pelės pažandės liaukoje yra labai dideli, taip ir BDNF, nes galima pakankamai daug kiaulės smegenų panaudoti eksperimentams. Pagal NGF ir BDNF nustatytą sekų homologiją galima teigti, kad įvairi strategija gali būti taikoma, charakterizuojant kitus šios genų šeimos narius (Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). Detalios pelių NGF ir BDNF aminorūgščių sekų (a.s.) analizės metu buvo nustatytos dvi a.s. sritys po 6 aminorūgščių liekanas (a.r.l.), jos pabrauktos Fig. 2, šios sritys labai patogios kaip pradmenys, atliekant PGR (Saiki ir kt., 1985, Science, 230, 1350-1354). Pelių genomine matrica buvo naudojama, nes NGF ir BDNF genuose nėra intronų, pertraukiančių egzoninį biologiškai aktyvių baltymų kodavimą. Šio būdo

dėka buvo amplifikuojamos NGF ir BDNF sekos, kurios po to buvo suskaldomos restriktazėmis. Buvo sekvenuotas likęs nesuskaldytas DNR fragmentas ir nustatyta seka, kuri nėra nei BDNF, nei NGF. Du specifiniai prasminiai (5') pradmenys buvo susintetinti tolimesnėms PG reakcijoms, naudojama matrica buvo komplementari DNR, susintetinta atvirkštine RNR, ekstrahuota iš pelių galvos smegenų, raumenų ir kepenų, transkripcija; 3' pradmuis buvo sukonstruotas taip, kad sutaptų su poli(A) sekomis Fig. 2). Amplifikuojant pavyzdžius iš trijų audinių buvo gauti panašaus dydžio produktai, kurie buvo klonuojami ir panaudoti pelės genomines bibliotekos skryningui. Tokiu būdu nustatytas vienas genominis klonas buvo sekvenuojamas Fig. 2). Pagal atvirą skaitymo rėmelį buvo nustatyta, kad galimas baltymas, kurio sudėtyje yra 258 a.r.l. (pradedant nuo pirmosios liekanos metionino, surasto po 3' stop kodonų rėmelyje), šis baltymas buvo pavadintas neurotrofinu-3 (NT-3). Visais atžvilgiais bendra spėjamo baltymo struktūra yra panaši NGF ir BDNF, spėjama signalinė grandinė yra 18 a.r.l. (iš kurių 5 ir 9 a.r.l. yra identiškos BDNF ir NGF, atitinkamai) pratesiama pro-seka iš 121 a.r.l. Tokios pro-sekos, spėjama, kad dalyvauja baltymo struktūrizavimesi ir taisyklingų disulfidinių tiltelių susidaryme (Edwards ir kt., J. Biol. Chem. 263, 6810-6815), taip pat buvo nustatytos ir pelių NGF (103 a.r.l.) ir pelių BDNF (112 a.r.l.). Vienintelė potenciali N-glikozilinio sritis yra 9 a.r.l. (BDNF ir NGF8 a.r.l.) prieš proteinazės labilų sritį, sudarytą iš bazinių aminorūgščių liekanų, kuria prasideda subrendęs NT-3 baltymas (Fig. 2, rodyklė). Subrendęs NT-3 baltymas, spėjama, kad sudarytas iš 119 aminorūgščių liekanų (santykinė molekulinė masė 13.625 D, pI - 9.3). Lyginant pelių NGF, BDNF ir NT-3 buvo nustatyta 54 a.r.l. homologija (Fig. 2). Visos šešios cisteino liekanos, žinoma kad NGF ir BDNF visos jos sudaro disulfidinius tiltelius (Leibrock ir kt., 1989,

Nature. 341, 149-152, Angeletti 1973. Biochem., 12, 100-115), ir jos yra konservatyvioje molekulės dalyje (Fig. 3, rodyklė). Reikia pažymėti, kad lyginant NT-3 seką su NGF ir BDNF sekomis, joje mažiau tik 7
 5 identiškoms aminorūgščių liekanomis (lyginant pelių NGF su BDHF, jose yra 61 identiška aminorūgščių liekana). Tokiu būdu, beveik 50% baltymo pirminės struktūros yra konservatyvi, tai matyt reikalinga bazinės tretinės struktūros susidarymui, bendros
 10 visiems trims baltymams. Papildant, šiose trijose sekose yra 4 variabilūs domenai, nuo 7 iki 11 aminorūgščių liekanų (pažymėti YI-Y4 Fig. 3), jie, matyt, apsprendžia specifiškumą neuronams.

15 Tiriant NT-3 geno ekspresiją, RNR buvo ekstrahuojama iš įvairių pelės audinių ir analizuojama NT-3 specifiniu zonu (Fig. 4). Visuose ištirtuose audiniuose buvo nustatyta vienintelė 1.4 tūkst. bazių dydžio juosta. Bet iRNR ekspresijos dydis buvo labai įvairus. Galvos
 20 smegenyse (Fig. 4B) ekspresija buvo nevienoda, didžiausia iRNR ekspresija buvo smegenėlėse ir amono rage. Šie rezultatai demonstruoja, kad NT-3 iRNR pasiskirstymas audiniuose skirtingas, nei BDNF ir NGF iRNR pasiskirstymas. Iš tikrųjų, NGF iRNR sutinkama
 25 pagrindinai tik galvos smegenyse, o NGF iRNR vos pastebima tokiuose audiniuose, kaip kepenys arba skeleto raumenys (Heumann ir kt., 1984, EMBO, 3, 3183-3189). Įdomu, kad amono rage, kur ekspresuojama NGF iRNR (Korshing ir kt., 1985, EMBO, 4, 1389-1393), taip
 30 pat ekspresuojama BDNF ir NT-3 iRNR, ir didesniais kiekiais, nei kitose galvos smegenų srityse (Fig. 4B).

Tam, kad įsitikinti ar NT-3 baltymas yra biologiškai aktyvus ir sekretuojamas, seka, koduojanti visą
 35 baltymą, buvo klonuojama į ekspresijos vektorių (pCMV), kuris buvo naudojamas COS ląstelių (beždžionių inkstų ląstelės) transfekcijai (Fig. 5). Žinant, kad NT-3 iRNR

yra periferiniuose audiniuose, buvo kultivuojami įvairūs viščiuko embriono neuronai, kurie prasitiesia į šiuos audinius ir jų gyvybingumui reikalingi trofiniai faktoriai. Judesio neuronai, išskirti iš kiaulės 6 5 dienų embriono (E6) galvos smegenų (Dohrman ir kt., 1986, Dev. Biol., 118, 209-221), ciliariniai neuronai (E8) ir disocijuoti simpatiniai neuronai (E11) neišlikdavo, esant NT-3. Bet buvo pastebėta sensorinių neuronų, išskirtų iš E8 pirminių sensorinių ganglijų, 10 reakcija. Kaip pavaizduota (Fig. 5), NT-3 palaiko 30% neuronų, išskirtų iš nodozinio ganglijaus, gyvybingumą. Be to, šis efektas, papildantis BDNF, sintezuojančio centrinėse projekcinėse srityse, ir žinomo savo poveikiu nodozinių neuronų subpopuliacijai, veikimą 15 (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112, 319-328), ir šie abu faktoriai kartu palaiko daugumą neuronų (90%), žiūr. Fig. 5. Svarbu paminėti, kad NT-3 irNRN sutinkama visceraliniuose šio ganglijaus taikiniuose, įskaitant širdį, kepenis ir plaučius (Fig. 4A). Sensorinių 20 neuronų populiacijos, reaguojančios į NT-3, buvo aptiktos E8 disocijuotoje dorsaliniuose baziniuose ir trišakiuose ganglijuose, o taip pat E8 simpatinių ganglijų eksplantantuose. Tokiu būdu, NT-3 pasižymi iki šiol necharakterizuotu biologiniu aktyvumu, 25 pasireiškiančiu kai kuriuose periferiniuose audiniuose, įskaitant kepenis (Lindsay ir Tarbit, 1979, Neuro. Sci. Lett., 12, 195-200) ir skeleto raumenis (Davies, 1986, Dev. Biol., 115, 56-67) ir palaiko visceralinių ir propriorecetyvinių sensorinių neuronų, neturinčių 30 atsako NGF, gyvybingumą (apžvalgai žiūr. Davies, 1987, Development, 101, 185-208).

Kartu šie faktai liudija, kad NT-3 yra neurotrofinis faktorius, giminingas pagal savo struktūrą ir funkcijas 35 NGF ir BDNF, pirmiems dviem neurotrofinams. Siūlomas pavadinimas "neurotrofinas" (NT) šios klasės baltymams

ir pagal analogiją interleukinams, numeruojami jų atradimo seka.

5 7 Pavyzdys: Žiurkių neurotrofino-3 klonavimas ir charakterizavimas.

10 Homologija tarp NGF ir BDNF buvo panaudota klonavimo strategijai, norint surasti papildomus šios šeimos narius. Čia aprašoma geno, koduojančio trečią BDNF/NGF šeimos narį, kuris pavadintas neurotrofinas-3, klonavimas. Šis naujas faktorius pasižymi apibrėžtu biologiniu aktyvumu ir speciotemporaline ekspresija, lyginant su NGF ir BDNF.

15 7.1. Medžiagos ir metodai

7.1.1. Polimerizacinė grandininė reakcija (PGR)

20 Buvo susintetinti degeneruoti oligonukleotidai, atitinkantys keturiems baltymų sekų segmentams, kurie yra konservatyvūs NGF ir BDNF; šie baltymų sekų fragmentai, kurie gali būti sutinkami ir NGF ir BDNF sekose, pateiktose (Fig. 7D) yra šie:

25 1. Gly-Glu-(Tyr/Pe)-Ser-Val-Cys-Asp-Ser;

2. Lys-Glu-Tyr-Phe(Tyr/Phe)-Glu-Thr-Lys-Cys;

30 3. Gly-Cys-Arg-Ile-Asp;

4. Trp-Arg-Phe-Ile-Arg-Ile-Asp-Thr-(Ser/Ala)-Cys-Val-Cys.

35 PG reakcijose buvo naudojamos serijos degeneruotų prasminių ir antiprasminių oligonukleotidų (degeneruota sritis - 15-26 nukleotidai, atitinkantys 5-9 aminorūgščių liekanoms nurodyto baltymo kaip prasmine,

taip ir antiprasmine kryptimi, o taip pat nedegeneruota
 "uodega", koduojanti restriktazių skėlimo sritis).
 Amplifikacijos reakcija tarp viršutinių porų ir
 apatinių antiprasminių pradmenų buvo atliekama
 5 sąlygomis, rekomenduojamomis Perkin-Elmer-Cetus,
 išskyrus tai, kad renatūravimo temperatūra, Mo^{++}
 koncentracija ir trukmė buvo keičiami, norint
 optimizuoti amplifikacijos sąlygas kiekvienai pradmenų
 porai. Tiksliai 1B prasminio pradmens (koduojančio
 10 baltymo sekos nuo "1" ir aukščiau sritį) seka buvo: 5'-
 GAC TCG AGT CGA CAT CG-GTN-TGY-GAY-WSN-RTN-WS-3' ir 2C
 antiprasminis pradmuo (atitinkantis atiprasminiams
 kodonams baltymo sekai nuo "2" ir aukščiau) seka buvo:
 5'-CCA AGC TTC TAG AAT TC-CA-YTT-NGT-YTC-RWA-RAA-RTA-
 15 YTG-3' (sutrumpinimai pagal IUPAC kodus). Analizuojant
 seką buvo nustatyta, kad 1B oligonukleotide buvo du
 neatitinkantys nukleotidai, palyginus su NT-3 seka, kai
 2C oligonukleotide buvo vienas nesutampantis
 nukleotidas. Radioaktyviosios žymės įvedimas buvo
 20 atliekamas amplifikacijos pagalba Perkin-Elmer/Cetus,
 įvedant sekančius pakeitimus: 1-10 ng matricos DNR
 žemos lydimosi temperatūros agarozėje buvo įdedama į
 reakcijos mišinį, kuriame buvo nežymėti dATP, aGTP ir
 DTTP kurių galutinė koncentracija - 50 μM ; buvo
 25 pridedama 50 μCi $\alpha^{32}P$ -dGTP (3000 Ci/mol) 50 μl reakcijos
 mišinio ir atliekami 7 amplifikacijos ciklai.
 Amplifikacijoje naudojami pradmenys buvo identiškai
 degeneruotiems pradmenims, naudojamiems pradinėje PGR.

30 7.1.2. Žiurkės genominės DNR bibliotekos Southern
btolingas, naudojant NT-3 zondą.

PG reakcijos produktas R1B/2C buvo gautas
 amplifikuojant nuo matricos genominės žiurkės DNR,
 35 naudojant degeneruotus pradmenis 1B ir 2C, tai aprašyta
 skyriuje 7.1.1. Gautas PGR produktas, naudojant
 degeneruotus pradmenis 1B ir 2C (pažymėtas R1B/2C), yra

naujas genas, NT-3, o taip pat NGF ir BDNF genai žiurkės genomine DNR. Genominė DNR buvo gauta iš Fišerio žiurkių kepenų (Maniatis ir kt., 1982, Molekulinis klonavimas, Laboratorinis vadovas), suskaldyta EcoRI ir 10 µg jos buvo frakcionuojama 1% agarozės gelyje. Ši DNR buvo pernešta ant nitroceliuliozės, naudojant 10xSSC buferinį tirpalą (Maniatis ir kt., 1982, Molekulinis klonavimas, Laboratorinis vadovas) ir hibridizuojama (Mahmoud ir Lin, 1989, Biotechniques, 7, 331-3) su žymėtu 32P R1B/2C PGR produktu 60C ir atplauta 2xSSC/0.1 % SDS 65°C temperatūroje. Buvo nustatytos NT-3, NGF ir BDNF juostos, NGF ir BDNF juostų padėtis buvo iš anksto nustatyta, naudojant specifinius zondus. Dydis nurodytas tūkstančiais bazių iš kairės pusės.

7.1.3. Neurotrofino-3 ekspresija

Ekspresinė žiurkės NT-3 sistema buvo sukonstruota naudojant PGR, amplifikuojant koduojančią trumpą NT-3 probaltymą sritį, kurios dydis 3.2. kb, žiurkės PstI genominis fragmentas (Fig. 6B), kuris pratesia NT-3 geną; naudojamų PGR sintetinių oligonukleotidų galuose buvo XhoI skėlimo sritys tam, kad būtų galima amplifikuotą koduojančią sritį įterpti į XhoI skėlimo sritį polilinkeryje ekspresijos vektoriuje pCDM81 (Seed, 1987, Nature, 329, 840-42). Konkretūs nukleotidai, naudoti amplifikacijai žiurkės NT-3 koduojančiai sričiai, buvo: viršutinis prasminis pradmuo - 5'-CGG TAC CCT CGA GCC ACC ATG TCC ATC TTG TTT TAT GAG-3' (pabrauktas ATG atitinka kodonui "B" startinėje srityje, su seka žemyn nuo ATG, kuri sutampa su NT-3 seka; į viršų nuo ATG yra sintetinė XhoI skėlimo sritis), ir apatinis antiprasminis pradmuo - 5'-CGG TAC CCT CGA GAT GCC AAT TCA TGT TCT TCC G-3' (pabrauktas tripletas yra komplementarus terminavimo kodonui NT-3 gene; šis tripletas flankuotas tikslia

antiprasmine NT-3 seka, o 5' šio pradmens gale yra XhoI skėlimo sritis). Žiurkės NT-3 ekspresijos plazmidė buvo pažymėta pC8-N3 (P1). Panaši strategija buvo naudojama įterpiant NGF ir BDNF koduojančias sekas į XhoI skėlimo sritį į tą patį vektorių pCDM8, NT-3, NGF ir BDNF ekspresinėmis konstrukcijomis buvo transfekuojamos, kaip aprašyta Okayama ir Berg (1982, Mol. Cell. Biol., 5, 1136-42) COS-M5 ląstelės, 5×10^5 ląstelių 60 mm lėkštelėje ir kultivuojamos 2.5. ml Dulbecco Modified Eagle terpėje su daug gliukozės (4500 mg/ml) ir 10% stambių raguočių fetalinio serumo; supernatantai buvo surenkami po 72 valandų.

7.2. Rezultatai

7.2.1. Neurotrofino-3 geno klonavimas

Laukiamo dydžio (kaip buvo prognozuojama iš NGF ir BDNF sekų) amplifikacijos produktai buvo gauti, naudojant įvairias degeneruotų pradmenų poras. Šiems produktams pradžioje buvo atlikta restrikcinė analizė tam, kad nustatyti NGF, BDNF arba naujų sekų kiekius. Visais atvejais, dažant etidio bromidu, buvo gauti restrikciniai fragmentai, atitinkantys tik NGF ir BDNF sekoms. Bet naudojant tuos pačius PGR produktus kaip zondus, hibridizuojant Southern blotavimu žiurkės genomine DNR, buvo nustatyta, kad vienas produktas (pažymėtas R1B/2C, žiūr. (Fig. 6A) identifikavimo naują genominės DNR seką be NGF ir BDNF (Fig. 6A); tokiu būdu, atliekant PGR produktų skryningą Southern blotavimu, buvo galima identifikuoti retai amplifikuojamas sekas, kurios nebuvo nustatytos kitais metodais. R1B/2C zonu taip pat buvo nustatytos naujos sekos evoliuciškai diverguojančių rūšių genominėje DNR (įskaitant žmogų, pelę, viščiuką ir xenopsus), spėjama, kad šiuo zonu buvo identifikuotas funkcionalus genas.

Šio geno išskyrimui ir skryningui buvo naudojamas R1B/2C zondas, o taip pat specifiniai NGF ir BDNF zondai (Maniatis ir kt., 1982, Molekulinis klonavimas, Laboratorinis vadovas), buvo skryninguojama žiurkės DNR genominė biblioteka (gauta iš "Clontex laboratories, Inc", Palo Alto, CA), paruošta iš Sprague-Dawley žiurkių DNR (dalinai suskaldyta Sau3A restriktaze ir klonuota į EMBL3/SP6/T7 bakteriofago vektorių). Buvo nustatyti du nepriklausomi bakteriofagų klonai, kurie hibridizavosi su R1B/2C zonu, bet nesihibridino su dviem kitais zondais. Analizuojant žiurkių genominių intarpų restrikcinius žemėlapius, buvo nustatyta, kad jie yra vieno ir to paties geno (Fig. 6B). Bakteriofago klonas su ilgiausiu intarpu buvo pažymėtas ϕ rN3 (G1). Sekvenuojant geną, identifikuoatą R1B/2C zonu, buvo nustatyta, kad jis koduoja naują NGF/BDNF šeimos narį (Fig. 7), jis buvo pavadintas Neurotrofinu-3.

20 7.2.2. Subrendusio neurotrofino sekvenavimas.

DNR sekvenavimas buvo atliekamas dvigubos dezoksinukleotidinės sekos nutraukimo metodu (Sanger ir kt., 1977. Proc. Natl. Akad. Sci. USA, 74, 5463-7), naudojant rinkinį "Sequenase" version 2.0, gaminamą Biochemical Company USA, naudojant procedūras, rekomenduojamas gamintojo.

NGF turi du aiškius probaltymus, vadinamus "ilguoju" (prasideda nuo "A" starto srities) ir "trumpuoju" (prasideda nuo "B" starto srities), jie skiriasi ilgiu ir sekomis N gale (Darling ir kt., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1, 427-34, Selby ir kt., 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 3057-64, Edwards ir kt., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2456-64). Ir iš ilgo ir trumpo probaltymo galima gauti proteinolize subrendusį

NGF baltymą, kuris yra 120 aminorūgščių liekanų iš N probaltymų galo.

Sekvenuojant kelių gyvūnų rūšių NGF genus, buvo
5 nustatyta, kad didesnioji sekos iš N galo yra atskiruose egzonuose, išskyrus keturis kodonus (Val-His-Ser-Val), kurie yra 5' egzono gale, kuris koduoja pilną trumpąją probaltymą ("B" starto sritis). Anksčiau
čia buvo pademonstruota, kad du iš keturių kodonų (Val-
10 X-X-Val), taip pat ir surišimo sritis RNR splaisinge, kuris yra prieš juos, yra konservatyvūs ir yra virš konservatyvios starto srities "B" BDNF genuose, išskirtuose iš įvairių gyvūnų rūšių; tai įgalino padaryti prielaidą, kad egzistuoja ilga ir trumpa BDNF
15 probaltymo forma. Yra konservatyvi kodonų seka Val-X-X-Val taip pat ir splaisingo surišimo sritis ir spėjama introno riba parodyta (Fig. 7A). Šios sekos analizės dėka buvo nuspėtas koduojančių egzonų egzistavimas NT-3 gene, kuris koduoja ilgąją probaltymą. Suradus prieš
20 "A" startinę sritį konservatyvią seką, dar labiau sustiprino tai, kad egzistuoja ilgoji BDNF probaltymo forma ir paaiškėjo svarbus evoliucinis šio ilgojo probaltymo vaidmuo visiems NGF šeimos nariams. Numatyta subrendusio NT-3 baltymo N galo seka yra įprasta
25 proteinazių skėlimo sritis (Arg-Arg-Lys-Arg), ji yra panaši į sekas, esančias NGF ir BDNF baltymuose (Fig. 7A, C). Kai kurių gyvūnų rūšių NGF baltymų C gale dvi aminorūgščių liekanos yra pašalintos proteinazėmis. Skirtingai nei NGF, žiurkės NT-3 neturi potencialios
30 proteinazių skėlimo srities baltymo C gale (Fig. 7A, C), todėl buvo padaryta išvada, kad kaip ir visuose šiuo metu ištirtuose BDNF baltymuose, taip ir NT-3 baltyme, C gale nėra proteinazių modifikavimo.

35 Pagal šiuos teiginius spėjamas subrendusio NT-3 baltymo dydis yra 119 aminorūgščių liekanų, apskaičiuotas pI yra apie 9.5. Pagal dydį, bendrą baltymo kūvį, NT-3

baltymas labai panašus į NGF ir BDNF. Septynios subrendusio NT-3 baltymo aminorūgščių liekanos, C gale skiriasi nuo NGF ir BDNF. Pradedant nuo aštuntos aminorūgšties liekanos subrendusiame NT-3 baltyme optimaliam sutapimui reikalingas dviejų aminorūgščių liekanų trūkis BDNF baltyme ir vienos aminorūgšties liekanos vienintelio intarpo baltyme NGF (žiūr. Fig. 7D). Subrendęs žiurkės NT-3 baltymas turi 57 % sekos homologiją, lyginant su žiurkės NGF, ir 58 % sekos homologiją, lyginant su žiurkės BDNF, 57 iš 120 aminorūgščių liekanų (48 %) yra bendros visiems trimis baltymams (žiūr. (Fig. 7D). Šešios cisteino liekanos, nustatytos NGF ir BDNF, yra konservatyvios ir jos yra NT-3 baltyme, didžiausios homologijos sritys šiuose trijuose baltymuose yra sukonzentruotos apie šias cisteino liekanas.

7.2.3. Neurotrofino-3 probaltymo analizė

Virš numatomos skėlimo srities, kurią nuskėlus, gaunamas subrendęs NT-3 baltymas, yra bendra glikozilino sritis - (Asn-X-Thr/Ser) (žiūr. (Fig. 7A, C), ši sritis buvo nustatyta toje pačioje padėtyje ir NGF ir BDNF (Ullrich ir kt., 1983, Nature, 303, 821-5; Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-52). Ar turi ši glikozilino sritis koki nors vaidmenį NT-3, NGF arba BDNF probaltymų procesingė lieka neišaiškinta.

Toliau lyginant NT-3 probaltymo seką su NGF ir BDNF probaltymų sekomis, matomos dvi homologijos sritys prieš subrendusio NT-3 seką (sritys I ir II (fig. 7B, C). Pagal I homologijos sritį galima teigti, kad egzistuoja žiurkės NT-3 gene starto sritis "B" (nustatyta NGF genui), nuo kurios būtų sintetinamas trumpasis probaltymas iš 258 aminorūgščių liekanų, panašaus dydžio kaip ir trumpasis NGF probaltymas (241 a.r.l.) ir trumpasis BDNF probaltymas (249 a.r.l.),

startinis metionino kodonas, sekrecinė signalinė seka ir signalinės sekos atskėlimo sritis trumpųjų šių trijų faktorių probaltymų yra konservatyvios (Fig. 7C). Todėl, kad I homologijos sritis yra prieš starto sritį "B", galima numatyti egzistuojanti ilgąją NT-3 probaltymą, kurio transkripcija prasidės nuo startinio kodono "A" (žiūr. Fig. 7A, B, C). Kaip buvo nustatyta NGF (Ullrich ir kt., 1983, Nature, 303, 821-5, Selby ir kt., 1987, Mol.Cell. Biol., 7, 3057-64), ir spėjama BDNF, tokia startinė sritis, matyt, bus koduojama papildomuose egzonuose į viršų vieninteliam egzonui, kuris koduoja visą trumpąjį probaltymą.

Papildomai I ir II homologijos sričiai, lyginant hidrofilines NT-3, NGF ir BDNF baltymų sritis, nustatyta, kad virš subrendusių baltymų esančios probaltymų sekos yra panašaus hidrofiliškumo.

7.2.4. Neurotrofinas-3 pasižymi neurotrofiniu aktyvumu

Stebėtina NT-3, NGF ir BDNF homologija įgalina su didele tikimybe teigti, kad NT-3 gali pasižymėti neurotrofiniu aktyvumu. NGF ir BDNF palaiko periferinės ir centrinės nervų sistemos atskirų neuronų populiacijų gyvybingumą in vivo ir in vitro (tai išnagrinėta Whimmore ir Senger, 1987, Brain Res. Rev., 12, 439-64, Lindsay, 1988 "The Making of the Nervous System" p. 149-65, Davies, 1988, Trends Genet., 4, 139-43). Pavyzdžiui, naudojant bet kurią iš minėtų faktorių, vystantis paukščių embrionui, išvengiama natūralaus neuronų žuvimo periferiniuose ganglijuose (pav., Hoffer ir Barde, 1988, Nature, 331, 261-2). Pridėjus į eksplantuotus ganglijus NGF ir BDNF iššaukiamas neuritų ataugimas (Davies ir kt., 1986, J. Neurosci, 6, 1897-1904), o pridėjus į disocijuotų ganglijaus neuronų kultūras, šie faktoriai palaiko neuronų gyvybingumą ir inicijuoja jų diferenciaciją (Lindsay ir kt., 1985, Dev.

Biol., 112, 319-328). Tyrimai atlikti in vitro, naudojant kelis viščiuko periferinius ganglijus, buvo naudojami nustatyti neurotrofinių NGF ir BDNF aktyvumų skirtumus. Abu šie faktoriai veikia sensorinių neuronų populiacijas iš dorsalinių bazinių ganglijų nervų keteroje (DRG), ir BDNF palaiko nodozinio ganglijaus sensorinius neuronus (MG) (Lindsay ir kt., 1985, Dev. Biol., 112, 319-328). Skirtingai nei BDNF, NGF gali palaikyti gyvybingumą ir skatinti augimą simpatinių ganglijų neuronų (SG) (Barde ir kt., 1983, EMBOJ, 1, 549-553).

Tam, kad nustatyti potencialų NT-3 biologinį aktyvumą, žiurkės NT-3 genas buvo įterptas į pCDM8 vektorių (Seed, 1987, Nature, 329, 840-842), tai buvo naudojama trumpalaikiai BDNF ir NGF ekspresijai žinduolių ląstelėse. Ši konstrukcija buvo sudaryta NT-3 trumposios probaltymo formos ekspresijai, ekspresuojant trumpasias NGF ir BDNF probaltymų formas buvo gaunami biologiškai aktyvūs junginiai (Edwards ir kt., 1988,, Mol. Cell., Biol., 8, 2456-64, Leibrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152). NT-3, NGF ir BDNF genų konstrukcijos buvo transfekuotos į COS ląsteles; buvo surenkamas kultūrų supernatantas, iš pradžių, naudojant įvairias koncentracijas, buvo tiriamas neuronų iš DRG eksplantantų sugebėjimas ataugti (žiūr. Fig. 8). Pirmas įrodymas, kad NT-3 genas koduoja neurotrofinį aktyvumą buvo tai, kad šio geno produktas išaukia intensyvių neuritų iš DRG eksplantantų ataugimą (Fig. 8).

Norint nustatyti ar NT-3 tiesiogiai veikia neuronus, buvo tiriama šio faktoriaus įtaka koncentruotose disocijuotų DRG neuronų kultūrose (Fig. 9). Kai faktiškai nebuvo švano ląstelių ir fibroblastų, NT-3 palaikė gyvybingumą ir stimulavo ataugimą neuritų 60 % DRG neuronų. Žinant kad BDNF ir NGF kartu palaiko 100 % DRG neuritų gyvybingumą (Lindsay ir kt., 1985, Dev.

Biol., 112, 319-328), galima teigti, kad NT-3 palaiko ląstelių gyvybingumą tų, kurios sąveikauja su vienu iš dviejų faktorių.

5 7.2.5. NT-3 neurotrofinis aktyvumas skiriasi nuo NGF ir BDNF aktyvumų.

10 Tolesniam NT-3 neuroninio specifiškumo tyrimui buvo tiriamas NG ir SG eksplantantuose. Kaip buvo tikėtasi, bandymai patvirtino, kad NGF išaukia SG neuritų ataugimą, bet ne viščiuko embriono E8 eksplantantų NG; BDNF išaukdavo NG neuritų ataugimą, bet ne SG eksplantantų. Įdomu, kad NT-3 išaukdavo NG ir SG eksplantantų neuritų ataugimą (Fig. 8), tai liudija
15 apie platesni NT-3 specifiškumą, nei NGF arba BDNF. Bet NT-3, kaip ir NGF ir BDNF, nepalaikė gyvybingumo arba neišaukdavo ataugimo eksplantantų neuritų arba disocijuotų praturtintų neuronais kultūrose iš ciliarinio viščiuko ganglijų. Kaip buvo pademonstruota
20 aukščiau, parasimpatiniai neuronai, kurie yra šiame ganglijuje, reaguoja į žiurkių GNTF, neuroninį faktorių ne iš NGF/BDNF/NT-3 genų šeimos. (Manthorpe ir kt., 1986, Brain Res., 367, 282-6; Stockli ir kt., 1989, Nature, 342, 21-28). Nebuvo pastebėta reakcijos nei
25 vieno šio eksperimento metu, kai buvo naudojamas COS ląstelių, transfekuotų kontroliniais vektoriais, supernatantai (Fig. 8). Lentelėje IV pateikiami pavyzdinių bandymų, nustatant eksplantuotų viščiuko embrionų E8 DRG, nodozinių ganglijų (NG) ir
30 paravertebraliųjų simpatinių ganglijų (SG) reakciją į įvairias NT-3 koncentracijas. Ganglijai buvo kultivuojami nurodytą lentelėje laiką taip pat kaip eksplantantai 1 ml kolageno gelio, kaip aprašyta Lindsay ir Rohrer, 1985, Dev. Biol., 112, 30-48).
35 Ataugų ataugimas buvo įvertinamas nuo 0 iki 5, kai 5 - maksimalus ataugų ataugimas, stebimas dorsaliniuose baziniuose ganglijuose, naudojant sočią nervų augimo

faktoriaus dozę (NGF) (1-10 ng/ml). Žiurkės NT-3 buvo naudojamas iš kondicionuotos COS-M5 ląstelių, transfekuotų, kaip aprašyta aukščiau, plazmide pC8-rN3 (G1), terpės. Visomis tikrintomis dozėmis, didesnėmis nei 50 praskiedimu, NT-3 išaukdavo žymų ataugų ataugimą visų tipų eksplantuotuose ganglijuose, nors esant mažai koncentracijai ši reakcija simpatiniams ganglijams buvo silpnesnė. Didžiausia ataugų ataugimo reakcija, naudojant NT-3, buvo gauta dorsaliniams baziniams ganglijams, ji buvo artima NGF ir BDNF reakcijai. Didžiausia nodozinių ganglijų reakcija, naudojant NT-3 buvo žymiai didesnė, nei naudojant BDNF. NGF neveikė nodozinių ganglijų. Didžiausia simpatinių ganglijų reakcija, naudojant NT-3, buvo mažesnė, nei naudojant NGF ir buvo stebima tik esant didelėms NT-3 koncentracijoms, nei buvo reikalinga dorsalinių bazinių kultūroms arba nodoziniams ganglijams.

Lentelė IV

Rekombinantinis žiurkės NT-3 išaukia ataugų ataugimą šiems eksplantantams:

E8 viščiuko embriono dorsalinių bazinių ganglijų

DRG - E8 viščiuko embriono dorsalinių bazinių ganglijų

NG - E8 viščiuko embriono nodoziniams ganglijų

SG - E8 viščiuko embriono paravertebraliųjų parasimpatinės grandinės ganglijų.

				Ataugų ataugimo įvertinimas		
				DRG	NG	SG
				24 val.	24 val.	24 val.
Kontrolė	500	μl	mock-	0-0.5	0	0
transfekuotų						

	COS ląstelių supernatanto			
NT-3	10 μ l ląstelių supernatanto	2-3	2-3	0-0.5
NT-3	50 μ l ląstelių supernatanto	3-4	2-3	0-0.5
NT-3	200 μ l ląstelių supernatanto	5*	2-3	0-1
NT-3	500 μ l ląstelių supernatanto	5*	0-2	1-2

Ataugų ataugimo įvertinimas buvo atliktas kiekvienu atveju su 4-6 pakartojimais.

- 5 *Esant didesnėms NT-3 koncentracijoms, ataugų ataugimas sumažėja, tai buvo nustatyta pagal ataugusių ataugų ilgį eksplantantuose ir jų skaičių NG eksplantantuose

10 7.2.6. Žiurkės neurotrofino-3 aktyvumas pasireiškia žinduolių neuronams.

Tam, kad nustatyti, ar veikia žiurkės NT-3 žinduolių neuronus, buvo pakartoti eksperimentai su eksplantantais, naudojant dorsalinius bazinius ganglijus, paimtus iš 14 dienų žiurkių embrionų (Lent. 5). Išgrynintas NGF buvo naudojamas kaip kontrolė. Žiurkių E14 eksplantantai dorsaliniai baziniai ganglijai (po keturis ganglijus 1 ml kultūros) buvo kultivuojami 24 valandas, beveik taip pat kaip viščiuko ganglijus (Fig. 8, Lent. 4), nepridedant neurotrofinio faktoriaus (kontrolė), pridėjus nervų augimo faktoriaus iš pelės pažandės liaukos (NGF) arba pridėdant rekombinantinio žiurkės NT-3 (kodicijuonuta COS-M5 ląstelių, transfekuota plazmide pC8-rN3 (P1), kaip aprašyta aukščiau, terpė). Kiekviename ganglijuje buvo

įvertinamas ataugų ataugimas (Žiūr. Lent. 4). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad NGF ir NT-3 iššaukdavo smarkų ataugų ataugimą eksplantantų dorsaliniuose baziniuose ganglijuose.

5

Lentelė V.

NT-3 poveikis žiurkės embriono eksplantantų dorsalinių bazinių ganglijų ataugų ataugimui.

10

Ataugų ataugimo įvertinimas (E14 žiurkių DRG)

Kontrolė	0	0	0	0
NGF (pelė, 5 ng/ml)	4	4	4	3
NT-3 20 μ l, žiurkės	3	3	3	4
NT-3 COS ląstelių supernatantas				

15 Ataugų ataugimas įvertintas nuo 0 iki 5, pateiktas kiekvienam ganglijui atskirai.

20 Kadangi DRG, NG ir SG eksplantantai reaguoja bent į du iš trijų giminingus neurotrofinius faktorius, tai maksimali reakcija, pasireiškianti šiems ganglijams priklauso nuo naudojamo faktoriaus. DRG atveju, reakcija į sočias NGF, BDNF ir NT-3 koncentracijas buvo santykinai ekvivalentiška. Bet NG maksimali reakcija į NT-3 buvo stipresnė, nei į BDNF; SG maksimali reakcija į NT-3 buvo žymiai silpnesnė ir uždelsta, lyginant su NGF.

25

7.2.7. Neurotrofino-3 sintezės sričių tyrimas.

30 Buvo nustatyta, kad vystantis neuronams, jų gyvybingumas priklauso nuo atitinkamų neurotrofinių molekulių. Ilgam gyvybingumui, net suaugusiems, gali

būti reikalingas neurotrofinis palaikymas. (Thansen ir kt., 1987, Ciba. Found. Symp., 126, 82-95). . Kitais atvejais subrendusių neuronų gyvybingumas gali daugiau nepriklausyti nuo neurotrofinio faktoriaus; bet buvo
 5 nustatyta, kad tokie faktoriai stipriai įtakoja neuronų diferencijuotą fenotipą (Lindsay ir Harmar, 1989, Nature, 337, 362-364). Nustačius neurotrofinės molekulės sintezės sritis, padėtų išsiaiškinti jų fiziologinį vaidmenį.

10

NT-3 sintezės sričių tyrimui ir norint palyginti NT-3 ekspresiją su NGF ir BDNF ekspresijomis, buvo atliekami trisluoksniai RNR, gautų iš įvairių subrendusios žiurkės audinių, Nouthern blotavimai, buvo
 15 hibridizuojama su zondais, specifiniais kiekvienam šiam genui (Fig. 10). Kaip buvo pademonstruota anksčiau (Neumann ir kt., 1984, EMBO, 3, 3183-9; Shelton ir Reichardt, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7951-7955), NGF iRNR ekspresija buvo didžiausia galvos smegenyse, širdyje ir blužnyje; pėdsakai buvo nustatyti kituose ištirtuose audiniuose. BDNF ekspresija buvo labiau lokalizuota; didžiausia ekspresija buvo
 20 nustatyta galvos smegenyse (Liebrock ir kt., 1989, Nature, 341, 149-152), žymūs kiekiai buvo nustatyti širdyje, plaučiuose ir raumenyse. Kaip ir NGF atveju, NT-3 transkriptas (1.4 kb) buvo nustatytas visuose tirtuose suaugusių gyvūnų audiniuose. Bet visuose periferiniuose audiniuose NT-3 iRNR ekspresijos lygis buvo geriausiu atveju toks pats kaip suaugusių gyvūnų
 25 galvos smegenyse ir tik kai kuriais atvejais (pav., inkstuose, blužnyje) buvo didesnis.

30

Taip pat buvo ištirtas NGF, BDNF ir NT-3 ekspresijos lygis naujagimių ir subrendusių pelių galvos smegenyse.
 35 Skirtingai nei NGF ir BDNF atveju, NT-3 iRNR ekspresijos lygis naujagimių galvos smegenyse buvo didesnis, nei subrendusių gyvūnų (Fig. 8). Detalesnės

analizės metu buvo nustatyta, kad NT-3 iRNR ekspresijos lygis centrinėje nervų sistemoje žymiai didesnis vaisiaus vystymosi metu ir po to mažėja iki subrendusių lygio.

5

7.3. Aptarimas.

NGF, BDNF ir naujausio šios šeimos nario, NT-3, struktūros analizė leido nustatyti kelias konservatyvias sritis, ir buvo padaryta išvada, kad šių faktorių funkciniai skirtumai yra apsprendžiami sekomis, kurios yra ne konservatyviose srityse. Spėjimas, kad egzistuoja ilgosios ir trumposios visu trijų baltymų probaltymo formos, iškėlė intriguojančius klausimus apie šių probaltymų formų egzistavimą in vivo. Ilgosios probaltymų formos gali būti efektyviau procesuojamos, nei trumposios. Bet, vektoriai, ekspresuojantys trumpąsias probaltymų formas, išskiria biologiškai aktyvias medžiagas COS ląstelėse.

20

Nustačius, kad šie trys neurotrofiniai faktoriai ekspresuojami specifiškai vystymosi stadijose ir skirtinguose audiniuose, sustiprina teiginį, kad nervinis vystymasis skirtingas laike ir skirtingai lokalizuotas ir priklauso nuo diskretinių neurotropinių aktyvumų. Pagal NT-3 ekspresiją, priklausomą nuo vystymosi, galima teigti, kad šis faktorius gali būti svarbus ankstyvoje nervų sistemos vystymosi stadijoje. Pradinis NT-3 neurotrofinio aktyvumo charakterizavimas in vitro kartu su tuo, kad NT-3 iRNR dominuoja ir suaugusių gyvūnų smegenyse ir suaugusių gyvūnų periferiniuose audiniuose įgalina padaryti išvadą, kad NT-3 gali turėti plačią įtaką neuronų funkcijoms ir/arba suaugusių gyvūnų neuronų gyvybingumui palaikyti. Platesnė NT-3 ekspresija įgalina teigti, kad šis faktorius veikia ir ne nervų sistemos ląsteles,

35

tokias prielaidas padarė NGF baltymui (Otten ir kt., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86,10059-10063).

5 Nors iki šiol aiškiai nepademonstruota, kad neuronai gali reaguoti vienu metu į kelis neurotrofinius faktorius, faktai įgalina padaryti prielaidą, kad NGF ir BDNF gali veikti persidengiančias neuronų populiacijas. Pavyzdžiui, įvedus NGF arba BDNF gali išsaugoti daugumą DRG neuronų, kurie normalaus paukščių vystymosi metu žūva (Hofer ir Barde, 1988, Nature, 331, 261-2). Mūsų nustatytas NT-3 poveikis viščiuko periferiniams ganglijams patvirtina, kad atskiri neuronai gali reaguoti į daugybę giminingų faktorių. Jeigu tai teisinga, tai kyla įdomūs klausimai. 10 Pavyzdžiui, receptorių komponentai ir/arba signalų transdukcijos mechanizmai trims giminingiems neurotrofiniams faktoriams gali būti bendri. Vienu metu reaguojantys neuronai gali turėti kelis receptorius, specifinius konkrečiam neurotrofiniam faktoriui arba 15 vienintelį receptorių, kuris gali iššaukti reakciją įvairiems neurotrofiniams faktoriams. In vivo šie įvairūs faktoriai gali vienu metu būti visiems reaguojantiems neuronams. Labiau tikėtina, kad egzistuoja erdviniai šių receptorių pokyčiai laike 20 (pav. Davies ir kt., 1987, Nature, 326, 353-358). Gali būti, kad įvairūs faktoriai yra įvairiose to paties neurono vietose (pavyzdžiui, sensorinis neuronas gali surišti skirtingus faktorius periferinėse ir centrinėse srityse (Kalcheim ir kt., 1987, Le Douarin, EMBO, 6, 2871-2873). Jei skirtingi faktoriai susiriša su kai 25 kuriais neuronais, tai jų poveikis gali būti kaip nereikalingas, taip ir komplementarus.

35 NGF, BDNF ir NT-3 individualaus ir potencialaus komplementaraus vaidmens demonstravimas bus paremtas informacija, kuri turi labai svarbią reikšmę, norint suprasti nervų sistemos normalų vystymąsi ir

egzistavimą. Tyrimai atlikti su gyvūnais įgalina manyti, kad NGF gali būti naudingas gydant degeneratyvinius neurologines būsenas (Snider ir Jonson, 1989, Amer. Neurol., 26, 489-506; Ficher ir kt., 1987, Nature, 329, 65-8; Phelps ir kt., 1989, Neurobiol Aging, 10, 205-7). Naujo NGF/BDNF šeimos nario klonavimas ir jo potenciali sąveika su kitais šios šeimos nariais inicijuoja naujus galimus šių baltymų terapinius pritaikymus, gydant neurodegeneracinius susirgimus.

8 Pavyzdys. Žmogaus neurotrofino-3 geno klonavimas ir charakterizavimas.

8.1. Rezultatai.

Zondo (R1B/2C), naudojamo žiurkės NT-3 geno identifikavimui, paruošimas buvo atliekamas kaip aprašyta 7 skyriuje. Zondas buvo gautas polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) pagalba iš žiurkės genominės DNR, naudojant degeneruotus nukleotidinius pradmenis, atitinkančius dviem nurodytoms rėmeliuose aminorūgščių liekanų sekoms, sutampančiomis NGF ir BDNF genuose. Nustačius su R1B/2C zonu DNR molekulių populiacijas, atitinkančias naujam genui, buvo iš pradžių nustatyta blotuojant žiurkės genominę DNR, suskaldytą restriktaze EcoRI, šiuo zonu buvo nustatytas naujas DNR fragmentas be laukiamų fragmentų, atitinkančių NGF ir BDNF genams.

Kai buvo naudojamas žymėtas 32P R1B/2C zondas analizuojant žmogaus genominę DNR, suskaldytą įvairiomis restriktazėmis, kaip ir žiurkės DNR atveju, hibridizavosi juostos, atitinkančios NGF ir BDNF genams, o taip pat ir papildomos juostos. Pavyzdžiui, skaldant HindIII restriktaze, buvo stebima nauja (t.y., ne-NGF, ne-BDNF) juosta, kurios dydis - apie 1.8 kb,

skaldant BamHI - buvo stebima nauja juosta, kurios dydis - apie 15 kb; ir skaldant EcoRI - buvo stebimos naujos juostos, kurių dydžiai 8 ir 12 kb (dvi juostos galėjo būti dėl polimorfizmo EcoRI restrikcijos srityse
5 žmogaus genomine DNR). Šie duomenys įrodo, kad žmogaus DNR yra NT-3 genas, kuris yra konservatyvus žiurkėms ir žmogui.

Žmogaus NT-3 genas buvo išskirtas genominės bibliotekos
10 skринingu, kaip aprašyta išskiriant žiurkės NT-3 geną (žiūr. pavyzdžiui, 7 skyrių). Konkrečiau, biblioteka, sudaryta dalinai suskaldžius genomine DNR iš žmogaus placentos Sau3A restriktaze, klonuota bakteriofago vektorių λEMBL3/SP/T7 ("Clontex" Inc.), buvo tikrinama
15 R1B/2C zonu, o taip pat žiurkių NGF ir BDNF zondais. Buvo laukiama, kad žmogaus NT-3 klonas hibridizuosis su R1B/2C zonu, bet nesihibriduos su NGF ir BDNF zondais. Vienas toks fago klonas buvo identifikuotas iš 8×10^5 patikrintų. Šis klonas pažymėtas φhN3 (G1), kaip
20 buvo nustatyta, turėjo apie 16 kb dydžio žmogaus DNR intarpą. Šio klono DNR buvo skaldoma restriktazėmis ir atrinkti restrikciniai fragmentai buvo subklonuojami į plazmidę pBluescript (Stratagene) DNR sekos analizei. Fig. 11 parodyta: žmogaus NT-3 geno seka ir iš jos
25 išvesta produkto aminorūgščių liekanų seka ir ji palyginta su žiurkės NT-3 seka.

8.2. Aptarimas.

30 Analizuojant sekas buvo nustatyta, kad žmogaus ir žiurkės NT-3 nukleotidų ir aminorūgščių liekanų sekos tarpusavyje yra didžiai konservatyvios. Viduje srities, koduojančios subrendusį baltymą (119 aminorūgščių liekanos) žiurkės ir žmogaus genų DNR sekos
35 homologiškumas yra 92 %. Bet nėra nė vieno skirtumo žiurkės ir žmogaus geno nukleotidų sekoje, kurie pakeistų koduojamas aminorūgščių liekanas, pateiktos

subrendusių žiurkės ir žmogaus NT-3 (ir subrendusio pelės NT-3, žiūr. Skyrius 6, aukščiau). baltymų aminorūgščių liekanų sekos yra identiškos. Tai primena didelį BDNF konservatyvumą, šio baltymo sekos pilnai
5 identiškos išskirto iš žiurkių, pelės, žmogaus ir kiaulės. Skirtingai, subrendusio žmogaus NGF ir graužikų (pelės arba žiurkės) NGF baltymų aminorūgščių liekanų sekos skiriasi apie 10 %.

10 Be to žmogaus ir žiurkės NT-3 probaltymų aminorūgščių liekanų sekos taip pat mažai skiriasi (skirtingos sritys pabrauktos Fig. 11). Virš spėjamos proteinazių skėlimo srities, polipeptidas Arg-Arg-Lys-Arg, žmogaus baltyme nėra vieno kodono (prieš Pro), kuris yra
15 žiurkės gene. Vienas žmogaus aminorūgščių liekanų sekos blokas iš keturių skiriasi nuo žiurkės preptro NT-3, ir 6 aminorūgščių liekanos yra pakeistos tarp šių blokų ir spėjamos proteinazių skėlimo srities.

20 9. Žmogaus NT-3 biologinis aktyvumas

Kadangi subrendusio žmogaus NT-3 baltymo išvesta aminorūgščių liekanų seka yra identiška subrendusiam žiurkės NT-3, galima patikimai numatyti, kad žmogaus ir
25 žiurkės NT-3 baltymai pasižymės tomis pačiomis identiškomis biologinėmis savybėmis. Neurotrofinis žmogaus NT-3 aktyvumas buvo patvirtintas, įterpiant klonuotą žmogaus geną į plazmidinį ekspresijos vektorių pCDM8, transfekuoiant gautą plazmidę pC8-hN3 (P1) COS-
30 M5 ląsteles (kaip aprašyta Okayama, 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 1745-52), ir po to tiriant neurotrofinį aktyvumą transfekuotų ląstelių terpėje. Žmogaus NT-3 genas buvo amplifikuojamas PGR pagalba iš bakteriofago ϕ hN3 (G1) ir įterpiamas į plazmidinį ekspresijos
35 vektorių pCM8, tuo pačiu būdu, kaip ir žiurkės NT-3 genui (Pavyzdys 7); gauta plazmidė buvo pažymėta pC8-hN3 (P1). Buvo nustatyta visa NT-3 geno intarpo

nukleotidų seka ir palyginta su genomine seka, nustatyta, kaip aprašyta aukščiau, tam, kad patvirtinti ar PGR ir klonavimo metu nebuvo įvesta jokių mutacijų. Transfekcijos ir analizės metodai buvo identiškai naudotiems, įvertinant žiurkės NT-3 aktyvumą.

Kaip buvo spėjama, buvo nustatyta, kad žmogaus NT-3 pasižymi neurotrofiniu aktyvumu, tiriant jo aktyvumą 9 dienų viščiuko embriono eksplantantų dorsaliniuose baziniuose ganglijuose ir nodoziniuose ganglijuose (žiūr. Fig. 8, Lent. IV) po 24 valandų paveikus imitaciškai transfekutuotų COS-M5 ląstelių, kondicionuota terpe (supernatantu), transfekutuotų plazmidėmis (visos jos yra iš ekspresijos vektoriaus pCDM8), koduojančių rekombinantinį žmogaus BDNF arba rekombinantinį žiurkės NT-3 (rNT-3; plazmidė pC8-rNT3 (P1), arba rekombinantiniu žmogaus NT-3 (hNT-3; plazmidė pC8-hN3 (P1). BDNF plazmidė buvo pasirinkta kaip teigiama kontrolė, nes BDNF pasižymi neurotropiniu aktyvumu ir nodoziniuose ganglijuose, ir dorsaliniuose baziniuose ganglijuose. Kaip matoma Lent. IV, ir žiurkės ir žmogaus rekombinantiniai NT-3 vidutinėmis dozėmis (palyg. Lent. IV) pasižymi tokio pat aktyvumu, kaip ir BDNF dorsaliniuose baziniuose ganglijuose ir aktyvumas žymiai didesnis, nei BDNF aktyvumas nodoziniuose ganglijuose. Nebuvo pastebėta skirtumų tarp žmogaus ir žiurkės NT-3 aktyvumo.

Lentelė VI.

Rekombinantinis žmogaus NT-3 baltymas, produkuojamas COS ląstelėse, pasižymi tuo pačiu aktyvumu, kaip ir rekombinantinis žiurkės NT-3, tiriant nodoziniuose ganglijuose ir viščiuko embriono eksplantantų dorsaliniuose baziniuose ganglijuose.

Lentelė VI.

	Ataugų ataugimo įvertinimas						
	DRG					NG	
Kontrolė	0	0	0	0	0.5	0	0
BDNF: 20 μl COS supernatanto	3	3	3	3	3	1	3
Imitacija: 20 μl COS supernatanto	0	0.5	0	0	0	0	
Žmogaus NT-3: 20 μl COS supernatanto	3	2	4	3		3	3
Žiurkės NT-3: 20 μl COS supernatanto	3	4	4	3	4	3	4

5 Ataugimo įvertinimas pateiktas nuo 0 iki 5 pagal 1-5 atskirus ganglijus po 24 valandų kultivavimo. Pateikiamas kiekvieno ganglijaus įvertinimas.

10. Žmogaus NT-3 geno produkto identifikavimas metaboliškai žymint.

10

Numatytas subrendusio NT-3 polipeptido dydis (žiurkės ir žmogaus) yra 119 aminorūgščių liekanos, kurių molekulinė masė 13.6 kD. Tam kad nustatyti eksperimentiškai subrendusio žmogaus NT-3 polipeptido dydį, ląstelės buvo transfekuojamos žmogaus NT-3 ekspresine plazmide ir metaboliškai žymima, o po to kodiconuota terpė buvo tikrinama ar yra joje norimas polipeptidas. Eksperimente, kurio rezultatai pateikti Fig. 12, COS-M5 ląstelės buvo transfekuojamos plazmide pC-hN3 (P1) (aprašyta aukščiau), ląstelės buvo žymimos [³⁵S] metionino ir [³⁵S] cisteino mišiniu, augimo terpė buvo surenkama ir frakcionuojama SDS PAGE elektroforezės pagalba 15 % akrilamidiniame gelyje, baltymai buvo pernešami ant membranos (pagrinde, kaip 25 aprašyta Fowbin ir kt., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 76, 4350-4354), žymėti polipeptidai buvo nustatomi autoradiografija. Imituojančios transfekcija ląstelės buvo naudojamos kaip kontrolė (takelis pažymėtas "Mosck"). Kaip parodyta Fig. 12, ekspresijos plazmidė pC8-hN3 (P1) ekspresavo vienintelį polipeptidą, kurio nustatytas dydis yra apie 14 kD (pažymėtas piešinėlyje NT-3), kurio nebuvo kontrolėje. Pagal šio metodo paklaidą, tai gerai sutapo su spėjamu subrendusio NT-3 baltymo dydžiu.

10

11. Neurotrofinas-3 palaiko dopaminenergetinių neuronų iš žiurkės embriono ventralinio mezencefalono kultūrų gyvybingumą

15 Žiurkės embriono E14 ventralinių vidurinių smegenų kultūra buvo paruošiama pagal paraišką JAV patentui Nr. 07/400 591, pateiktą 1989 rugpjūčio 30 d., kuri pilnai įjungta į šį išradimą kaip nuoroda. Kultūra buvo užsėjama, esant ląstelių tankumui - 100 tūkst. ląstelių

20 1 cm² arba 50 tūkst. ląstelių 1 cm² (žiūr. Fig. 13 ir 14), ir buvo auginamos be neurotrofinio faktoriaus (kontrolės) arba su didėjančiais COS ląstelių supernatanto kiekiais, kuriame buvo rekombinantinis žmogaus neurotrofinas-3. Po 8 dienų kultivavimo

25 ląstelės buvo fiksuojamos ir dažomos monokloniniais antikūnais prieš tirozin-hidroksilazę (TH) - dopaminenergetinių neuronų merkeriu. Kaip matome Fig. 13 ir 14, didėjant NT-3 kiekiui, didėja TH teigiamų ląstelių, išgyvenusių po 8 dienų, kiekis, maksimalus jų

30 kiekis yra 2.5 karto didesnis, nei kontrolėje, praskiedus 1:25 NT-3 COS ląstelių supernatantą. Buvo nustatyta, kad išgrynintas neuroninio augimo faktorius neturi įtakos, o NT-3 efektai buvo analogiški BDNF veikimui.

35

12. Pavyzdys. NT-3, BDNF ir NGF besivystančioje žiurkės nervų sistemoje: paraleliniai ir receptoriniai ekspresijos pasiskirstymai

5 12.1. Metodai

12.1.1. Medžiagos ir dissekcijos

10 Sprague-Dawley žiurkės iš Harlan Sprague-Dawley Inc. buvo naudojamos visoms dissekcijoms. Subrendusių gyvūnų galvos smegenų dissekcijos buvo atliekamos pagal standartines mikroskopines anatomines žymes. Kortekso mėginiai apėmė neokorteksą ir dorsalines uoslės žievės sritis. Tarpinių smegenų mėginiai buvo paimti naudojant 15 smegeninius ruožus (stria medullaria) ir kryžiuojant regos nervus atitinkamai kaip dorsalines ir ventralines žymes. Viduriniųjų smegenų mėginiai buvo iš colliculi superior ir colliculi inferior, dorsališkai, ir tęsėsi link smegenų ventralinio paviršiaus iki labiausiai 20 išsikišusio hipofizio krašto. Užpakalinių smegenų mėginiuose nebuvo smegenėlių, bet juose buvo hipofizis ir pailgosios smegenys. Reikia pažymėti, kad buvo naudojami tik pagrindinės stritumo sritys, tam, kad išvengti užteršimo gumburo audiniais. Hipokampuso 25 mėginiai buvo imami nuo fimbria/fornix srities iki kaudalinio poliuso. Naujagimių galvos smegenų dissekcijos buvo atliekamos, naudojant analogiškas žymes, išskyrus stria medullaria. Embrioniniams audiniams gauti buvo naudojamos dirbtinai apvaisintos 30 žiurkės, žymint apvaisinimo datą, pažymėtą E1, naujagimio pasirodymo diena žymima PO. Suaugusios žiurkės svėrė nuo 150 iki 275 gramus (6-8 savaičių).

12.1.2. RNR išskyrimas ir Northern blotavimas.

35

Pasirinkti audiniai buvo išpjunami iš žiurkių ir staigiai užšaldomi skystame azote. iRNR buvo išskiriama

homogenizuojant 3M LiCl/6M urėjoje, kaip aprašyta (Bothwell ir kt., 1990, "Eukariotinių genų klonavimo ir analizės metodai", Jons ir Bartlett, Bostonas, MA). Gauta RNR (10 µg) buvo frakcionuojama elektroforezės pagalba keturiuose 1 % susiūtos agarozės geliuose (Bothwell ir kt.) ir pernešama ant nailoninių membranų (Magna Graph, Micron Separations) naudojant 10x standartinį citratinį fiziologinį tirpalą, pH 7.0. Šios RNR UV pagalba buvo liguojamos (Stratalinker®, Stratagene Inc.) ir hibridizuojama 68°C temperatūroje su radioaktyviais zondais 0.5 M natrio fosfatiname buferiniame tirpale (pH 7.0) su 1 % jaučio serumo albumino (Frakcija V, Sigma), 7 % SDS, 1 mM EDTA (Mahmondi ir Liss, 1989, Biotechniques, 7, 31-33) ir 100 µg/ml suardytos ultragarsu lašišos spermos DNR. Filtrai buvo praplaunami 68 °C temperatūroje su 2xSSC, 0.1 % SDS ir eksponuojama nuo 1 dienos iki dviejų savaitių su sustiprinančiu ekranu (Cronex®, Du Pont), naudojant rentgeno juostą (XAR-5, Kodak) - 70°C temperatūroje. Išryškinus keturis gelius etidio bromidu, buvo nustatyta, kad įvairiuose audiniuose nustatyta vienodi totalinės RNR kiekiai (Mainsonpierre ir kt., 1990, Science, 247, 1446-1451), tai buvo patvirtinta hibridizuojant kelis blotus su zonu, specifišku 28SrRNR.

12.1.3. NT-3, BDNF, NGF ir NGFR zondu paruošimas.

NT-3, BDNF ir NGF koduojančių sričių klonavimas i ekspresijos vektorių pCMM8 (Aruffo ir Secel, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8573-8577) buvo aprašytas ankščiau (Maisanpiere ir kt., žiūr. aukščiau). Visos XhoI intarpo šiose plazmidėse 800 bazių porų (bp) buvo išskiriamos akrilamidiniame gelyje ir elektroliuujamos (Bothwell ir kt., 1990), po to buvo žymimos 32 P atsitiktinių šešetukų metodu (Bothwell ir kt.); hibridizuojant su kiekvienu zonu

sintetinius NT-3, BDNF ir NGF transkriptus (žiūr. žemiau), buvo nustatyta, kad zondas, specifinis vienam neurotrofinui, nesihibridina su giminingų neurotrofinų transkriptais. Žiurkės NGFR zondas buvo 1.6 kb NcoI
5 kDNR fragmentas, išplečiantis žiurkės NGFR baltymo kodavimo sritį (Radeke ir kt., 1987, Nature, 325, 593-597).

10 12.1.4. Sintetinio transkripto gavimas ir kiekybinis nustatymas.

Fago T7 promotorius, esantis ekspresinėse konstrukcijose pCDM8/neurotropinas, aprašytose
15 aukščiau, buvo naudojamas gaunant sintetinius RNR transkriptus, atitinkančius prasminę sričių, koduojančių NT-3, BDNF ir NGF orientaciją. Iš pradžių šių sintetinių transkriptų kiekis buvo nustatytas spektrofotometriškai. Vėliau transkriptai buvo tiriami, žymint jo galą (Bothwell ir kt.) 30 nukleotidų zonu,
20 kuris buvo hibridintas prie bendro 5' galo (iš kart po T7 promotoriaus) visiems trims transkriptams. Densitometriškai skenuojant (Kompiuterinis densitometras, serija 300, "Molecular Dynamics, Inc.") sintetinių transkriptų dot- ir Northern blotus,
25 hibridizuotus su oligonukleotidiniu zonu, (hibridizavimas ir atplovimas buvo atliekamas 55°C temperatūroje, kitos operacijos, kaip aprašyta aukščiau) buvo patvirtinta, kad ekvivalentiniai sintetinių transkriptų kiekiai gali būti panaudoti kaip
30 tikslūs standartai (duomenys pateikti Fig. 15A).

12.1.5. Kiekybinis neurotrofinų transkriptų kiekio nustatymas densimetruojant.

35 Transkriptų koncentracijos įvairiuose pavyzdžiuose buvo normalizuojamos iki standartinio pavyzdžio iš subrendusios žiurkės galvos smegenų (žiūr. aukščiau)

sekančiu būdu. Ekvivalentinės subrendusių smegenų RNR pavyzdžių alikvotos buvo užnešamos į kiekvieną blotą. Kiekvieno pavyzdžio signalo intensyvumui nustatyti buvo atliekamas įvairios ekspozicijos autoradiografų densitometrinis skanavimas. Kiekvienai skanuojamai ekspozicijai buvo nustatomas kiekvieno pavyzdžio signalo intensyvumas. Kiekvienai skanuojamai ekspozicijai kiekvieno pavyzdžio signalo intensyvumas buvo dalyjamas iš subrendusių smegenų pavyzdžio signalo intensyvumo toje pačioje ekspozicijoje, taip buvo normalizuojama visi nustatymai pagal standartizuotus subrendusių smegenų pavyzdžius. Fig. 18 pateiktas transkriptų lygis įvairiuose pavyzdžiuose normalizuotas pagal subrendusių smegenų lygį, subrendusių smegenų lygis buvo priimtas lygiu 1.0. Nustačius fg neurotrofinio faktoriaus subrendusių smegenų pavyzdžio totalinės 1 mg RNR, pasisekė nustatyti tikruosius transkripcijos lygius (fg/hg) pavyzdžiuose, normalizuotuose pagal subrendusių smegenų pavyzdį.

12.2. REZULTATAI

12.2.1. NT-3, BDNF ir NGF iRNR kiekybinis nustatymas ir jų kiekių palyginimas suaugusių žiurkių galvos smegenyse.

Northern blotavimas buvo naudojamas NT-3, BDNF ir NGF transkriptų kiekybiniam nustatymui ir jų ekspresijos palyginimui įvairiuose audinių pavyzdžiuose. Kiekybiškai kiekvienas neurotrofinio faktoriaus transkriptas įvairiuose pavyzdžiuose buvo nustatomas pagal tikslius sintetinius standartus. Sintetinių NT-3, BDNF ir NGF transkriptų RNR, kurių koncentracija buvo tiksliai nustatoma (žiūr. Fig. 15A ir paaiškinimus), buvo įnešami blotavimo metu, taip pat buvo įnešama 10 µg totalinės RNR, išskirtos iš subrendusių žiurkių smegenų. Buvo hibridizuojama su radioaktyviais zondais

ir daromi autoradiografai (Fig. 15B). Skenuojanti densimetrija buvo naudojama subrendusių smegenų pavyzdžio ir sintetinių standartų hibridizacijos signalų palyginimui. Šių tyrimų metu buvo nustatyta, kad visuose pavyzdžiuose buvo apylygiai iRNR kiekiai (NT-3 transkriptų - 40 fg, BDNF transkriptų - 45 fg ir NGF transkriptų - 30 fg 1 ng totalinės RNR) visų neurotrofinų subrendusiose žiurkės smegenyse. Visuose kituose blotavimuose buvo įnešama standartinio subrendusių žiurkių smegenų pavyzdžio alikvota, tokiu būdu kiekybiškai buvo įvertinama neurotrofinių faktorių transkriptų ekspresijos lygiai (žiūr. žemiau). Tam, kad palengvinti vizualinį visų trijų neurotrofinų transkriptų ekspresijos lygio įvertinimą įvairiuose pavyzdžiuose, ekspozicijos buvo parenkamos taip, kad signalo intensyvumas nuo standartinio subrendusių žiurkių smegenų pavyzdžio būtų toks pats visiems neurotrofinams, normalizuojant signalus kitų audinių pavyzdžių pagal atitinkamą standartą.

12.2.2. NT-3, BDNF ir NGF genų ekspresija išryškina bendrus ir individualius vystymosi požymius.

Tiriant neurotrofinio geno ekspresiją žiurkių embrionuose buvo nustatyta, kad visi trys neurotrofinai staigiai ekspresuojami tarp 11 ir 12 embriono vystymosi dienos. Fig. 16A: visi trys neurotrofinų transkriptai ryškūs E11 ir E12 embrionuose. Laikas, kurio metu vyksta neurotrofinų genų ekspresijos staigus padidėjimas, sutampa su periodu, kai faktiškai vyksta neurogenezė (kaip periferinė, taip ir centrinė), ir sutampa su šių neuronų formuojamų aksonų vystymosi pradžia (žiūr., pavyzdžiui, Altman ir Bayer, 1982, Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. vol. 74; Altman ir Bayer, 1984, ten pat, vol. 85).

Nežiūrint į šią neurotrofinių genų ekspresijos koordinaciją embriogenezės metu, lyginant su standartiniu galvos subrendusių smegenų pavyzdžiu, buvo nustatyta, kad NT-3 iRNR ekspresija yra didesnė

5 ankstyvuosiuose embrionuose (180 fg/ng totalinės RNR), tuo metu, kai BDNF iRNR - mažiausia (5-10 fg/ng totalinės iRNR), o NGF iRNR - tarpinis lygis (30 fg/ng totalinės iRNR) (Fig. 16A). Tarp NT-3 ir BDNF ekspresijos yra abipusis ryšys besivystančiose galvos

10 smegenyse (Fig. 16B) arba stipriai inervuotoje širdyje (Fig. 16C) - iš pradžių aukštas NT-3 ekspresijos lygis mažėja, tuo metu, kai žema pradinė BDNF ekspresija didėja kol suaugusiame gyvūne galų gale susilygina; NT-3 ekspresija lieka pastovi. Įdomu, kad NT-3 ekspresija

15 didėja vystantis kepenims ir timusui, organams, kurie yra silpnai inervuojami ir kuriuose nepasireiškia pastebima BDNF iRNR ekspresija (Fig. 16C).

NGFR transkripto embrionalinė ekspresija, matyt,

20 prasideda prieš neurotropinio geno ekspresijos padidėjimą ir yra nelauktai aukšta ankstyvosiose nugaros smegenyse, ir mažėja galvos smegenų prenatalinio vystymosi metu ir postnatalinio širdies vystymosi metu (Fig. 16A, B ir C).

25

12.2.3. NT-3, BDNF, NGF ir NGFR ekspresijos palyginimas suaugusiųjų ir naujagimių nervų sistemose.

Erdviniam neurotrofinių genų ekspresijos žiurkės nervų

30 sistemoje pasiskirstymui nustatyti ir tam kad suprasti kaip aiškūs išsivystę smegenų profiliai sąveikauja tarp atskirų galvos smegenų sričių, buvo tiriama neurotrofinių genų ekspresija naujagimių smegenyse ir suaugusių žiurkių smegenyse. Visų šių trijų faktorių

35 ekspresija buvo diskretinė erdvėje ir vystymosi laike (Fig. 17). Kiekybinis transkriptų ekspresijos lygių nustatymas, įskaitant ir periferiniuose audiniuose,

pateiktas grafiškai Fig. 4. Pagrindinis panašumas tarp visų trijų faktorių - tai aukštas ekspresijos lygis suaugusiųjų hipokampuse. Skirtumai - suaugusiųjų periferiniuose audiniuose, kur NT-3 ir NGF ekspresija yra panaši (Maisonpierre ir kt., žiūr. aukščiau). Tarp NT-3 ir BDNF ekspresijos yra aiški paralelė suaugusiųjų smegenyse (Fig. 17B, 18B); įdomu tai, kad abiejų faktorių nėra striatume. Bet NT-3 ir BDNF pasižymi įdomiais ir, matyt, tarpusavyje susijusiais skirtumais, kai lyginama ekspresija naujagimiuose ir suaugusiųjų smegenyse (Fig. 17A, B ir Fig. 18A, B). NT-3 ekspresija yra didžiausia naujagimiuose, ir žymiai didesnė, nei suaugusiųjų, mažiau subrendusiose smegenų srityse (t.y., smegenėlėse, hipokampe (amono rage) ir neokortekse). BDNF ekspresija abejose šiose srityse yra pati mažiausia, ir pati didžiausia, panašiai kaip suaugusiųjų, daugiau kaudalinėse smegenų srityse, nei srityse, kurios subręsta anksčiau (t.y., užpakalinės smegenys, vidurinės smegenys ir tarpinės smegenys). Kaip ir subrendusiose smegenyse, taip ir naujagimių striatume NT-3 ir BDNF transkriptai neaptinkami.

Palyginus NT-3 ir BDNF ekspresijos lygius su NGF ir NR1 ekspresijos lygiu, nustatyta, kad NGF ir NR1 ekspresijos lygiai mažiau skiriasi tarp naujagimių ir suaugusių gyvūnų smegenų audiniuose (Fig. 17, 18) NGF ekspresijos lygis uoslės duobelėse yra didesnis nei naujagimius, kai NGF ekspresijos lygis hipokampe ir neokortekse yra didesnis nei suaugusių gyvūnų. NGFR ir NR1 ekspresijos lygiai buvo didesni naujagimiuose, nei suaugusiųjų smegenyse, išskirtinai aukštas lygis buvo naujagimių smegenėlėse ir užpakalinėse smegenyse (Fig. 17A, B).

12.2.4. NT-3, NGF ir BDNF ekspresijos tyrimas diskretinių centrinės nervų sistemos sričių vystymosi metu.

Tam kad patvirtinti nuomonę, kad NT-3 žymiau ekspresuojamas ankstyvosiose centrinės nervų sistemos sričių vystymosi stadijose, o BDNF ekspresuojamas pagrindinai vėlesnėse tų pačių sričių vystymosi stadijose, buvo tiriama neurotrofinių faktorių genų ekspresija, vystantis trims centrinės nervų sistemos sritims, kurių brendimo periodas yra skirtingas. Neurogenezė, po kurios prasideda natūralus ląstelių žuvimas, prasideda nugaros smegenyse labai anksti (E12-E13) ir pasibaigia kelias dienas prieš gimimą (Altman ir Bayer, žiūr. aukščiau). Skirtingai, dauguma neuronų smegenėlėse ir hipokampe (amono rage) (įvertinama pagal granulioląstelių populiacijas) atsiranda po gimimo (pavyzdžiui, Altman, 1996, J. Comp. Neur., 128, 431-474; Schlessinger ir kt., 1975, J. Comp. Neur., 159, 149-176). Vėlesnėse smegenėlių vystymosi stadijose per pirmąsias tris savaites po gimimo vyksta intensyvi neurogenezė, neuroblastų migracija ir neuronų diferencijacija (Large ir kt., 1986, Science, 234, 352-355); šis padidėjimas įvyksta daug vėliau perinatalinio proceso, pasireiškiantis granulioląsteline proliferacija (pavyz., Altman, 1986, žiūr. aukščiau) ir cholinerginių neuronų iš bazalinių prekinių smegenų ataugų išsiterpimu (Koh ir Ioy, 1989, J. Neurosci., 9, 2999-3018), bet sutampa su tolesne cholinergine šių neuronų diferencijacija (Xarge ir kt., aukščiau).

Mūsų atliktų besivystančių nugaros smegenų tyrimų metu (Fig. 5A, E) buvo nustatyta aukšti NT-3 ekspresijos lygiai E12-E13 (150-280 fg/ng totalinės RNR), kurie mažesni po gimimo ir beveik nenustatomi subrendusiuose gyvūnuose. BDNF iRNR vos pastebima E12-E13, pasiekia savo maksimalią reikšmę gimimo metu (10-20 fg/ng totalinės RNR) ir po to mažėja. NGF iRNR didžiausia ekspresija stebima E12-E13 nugaros smegenyse (15-25 fg/ng totalinės RNR), bet 10 kartų ekspresija mažesnė, nei NT-3 iRNR ekspresija toje pačioje stadijoje. Įdomu

5 tai, kad NGFR ekspresija didesnė ankstyvosiose nugaros smegenyse; ši ekspresija anksčiau buvo koreliuojama su naujų formuojančių judesius neuronų ankstyvosiose nugaros smegenyse natūraliu ląstelių žuvimo periodu (Ernfors ir kt., 1989, Neuron, 2, 1605-1613).

10 Vėlyvosios vystymosi stadijos smegenėlėse (Fig. 19B, G) per pirmąsias tris savaites po gimimo ekspresuojami gana dideli kiekiai NT-3 iRNR (500-820 fg/ng totalinės RNR), o BDNF ekspresija pradeda didėti tik šio periodo gale, ankstyvosiose smegenėlių vystymosi stadijose buvo aptinkamas tik labai mažas NGF iRNR kiekis. NDFR ekspresuojamas dideliais kiekiais ankstyvojoje smegenėlių vystymosi stadijoje ir po to mažėja prieš 15 pradedant mažėti NT-3 iRNR kiekiui.

20 Amono rage (Fig. 19C, G) kaip BDNF taip ir NGF iRNR kiekiai didėja nuo mažų kiekių E17 iki vidutinių kiekių gimimo metu ir pasiekia didžiausius kiekius suaugusiuose gyvūnuose. Nors visi trys neurotrofinų transkriptai ekspresuojami panašiais kiekiais suaugusiųjų gyvūnų amono rage, NT-3 ekspresija žymiai didesnė, nei BDNF ir NGF E17 ir naujagimių amono rage; NT-3 ekspresijos lygis amono rage yra aukštas kaip ir 25 perinatalinėse smegenėlėse (820 fg/ng totalinės RNR). Skirtingai nei neurotrofinų, NGFR ekspresija mažėja vystantis amono ragui.

30 Visose trijose CNS srityse, kurios buvo ištirtos, NT-3 ekspresija didesnė vystantis šioms sritims, o po to mažėja iki subrendusių gyvūnų lygio, tuo tarpu maži BDNF iRNR kiekiai pradžioje didėja iki subrendusių lygio, panašiai kaip NT-3. Skirtingai nuo tarpusavyje surištų NT-3 ir BDNF ekspresijos profilių, NGF 35 ekspresija nepasireiškia kokia nors nuoseklia eiga; NGF daugiau ekspresuojamas (nors labai mažais kiekiais)

ankstyvosiose smegenyse ir smegenėlėse, nei vėlyvajame amono rage.

12.3. Aptarimas.

5 Šios analizės metu buvo nustatyti trijų neurotrofinų transkriptų ekspresijos panašumai ir skirtumai laike ir ekspresijos srityse. NT-3, BDNF ir NGF transkriptų kiekis vienu metu padidėja tarp 11 ir 12 žiurkės
10 embriogenezės dienos. Šios ekspresijos padidėjimas sutampa su intensyvia neurogeneze (pav., Altman ir Bayer, 1982, žiūr. aukščiau); (pav., Altman ir Bayer, 1984, žiūr. aukščiau). Šis sąryšis patvirtina tai, kad visi trys neurotrofinai yra labai svarbūs nervų
15 vystymuisi, galima išskirti periodą, kai visi neurotrofinai tampa būtini post-mitotinių neuronų gyvybingumui. Vis dėlto, jų ekspresijos momentai gali nurodyti ir kitus neurotrofinų vaidmenis besivystančioje nervų sistemoje (žiūr. žemiau).

20 Nors ekspresijos intensyvumo pikas vyksta vienu metu visų trijų neurotrofinų, ekspresijos lygiai, kuriuos jie pasiekia ankstyvuosiuose embrionuose, stipriai skiriasi. NT-3 iRNR kiekiai didžiausi embrionuose; o
25 BDNF iRNR ekspresuojama mažiausiais kiekiais. Šis NT-3 ir BDNF ekspresijos kontrastas išlieka beveik kiekvienu ištirtu momentu. Vystantis NT-3 ekspresija stipriausia CNS srityse, kuriose vyksta proliferacija, migracija ir neuronų ir proneuronų diferencijacija; ir paprastai
30 staigiai sumažėja subrendusiose CNS srityse. Atvirkščiai, BDNF ekspresija didžiausia tose CNS srityse, kuriose jau įvykusi neurogenezė ir, įprastai, padidėja, kai šios CNS sritys subręsta. Stebėtina, kad NT-3 ir BDNF transkriptų kiekiai, kurie yra
35 subrendusiųjų gyvūnų CNS srityse yra vienodi. Tarpusavio ryšys tarp NT-3 ir BDNF ekspresijų, vystantis CNS, papildant jų panašiais ekspresijos

profiliais suaugusiųjų gyvūnų CNS, nurodo tai, kad NT-3 ir BDNF gali kai kuriais atvejais sąveikauti su tomis pačiomis neuronų populiacijomis CNS. Jei tai teisinga, tai remiantis mūsų gautais duomenimis, galima teigti, kad NT-3 labai svarbus šių neuronų vystymuisi (matyt, tikslinės inervacijos metu), o BDNF veikia neuronus vėliau (t.y., kaip brendimo ir gyvybingumo palaikymo faktorius). NGF ekspresija lokaliai kinta vystantis, bet šie kitimai skiriasi nuo NT-3 ir BDNF. NGFR iRNR ekspresuojami kiekiai neturi specifinio ryšio su bet kuriuo iš šių trijų neurotrofinų genų ekspresija, tai gali būti susieta su tuo, kad NGFR yra bendras individualių neurotrofinų receptorių komponentas (Radriguez-Tebar ir kt., 1990, Neuron, 4, 487-492). NGFR ekspresija turi tendenciją būti didesne ankstyvoje CNS sričių vystymosi stadijoje; mūsų tyrimais buvo nustatyti idomūs, vystymosi eigoje reguliuojami, NGFR ekspresijos pokyčiai, kurie yra tolimesnių tyrimų objektas.

NT-3 ir BDNF pasiskirstymas subrendusioje CNS panašus, o jų pasiskirstymas suaugusių gyvūnų periferiniuose audiniuose skirtingas; platesnis NT-3 transkriptų periferinis pasiskirstymas gali atspindėti jo aktyvumą platesniam spektrui periferinių ląstelių (nervų ląstelių ir neturinčių ryšio su nervų sistema), skirtingai nei BDNF (Maisonpierre ir kt., žiūr. aukščiau).

Nors ir yra svarbūs įrodymai, kad NGF ir BDNF svarbūs ankstyvojoje nervų sistemos vystymosi stadijoje, mūsų atlikta analize nustatyta labiau nuoseklesnė ir ryškesnė didelės NT-3 ekspresijos ir ankstyvaus nervų sistemos vystymosi koreliacija. NT-3 iRNR kiekiai besivystančiose smegenėlėse ir naujagimių amono rage kelis kartus didesni, nei bet kurių neurotrofinų bet kuriuose audiniuose arba smegenų srityse ir daugiau nei

20 kartų didesni už bet kurių neurotrofinų kiekius
suaugusių gyvūnų smegenyse. Nustačius, kad NT-3,
naujas, giminingas NGF baltymas, gali palaikyti bent
kai kurių BDNF ir NGF priklausomų neuronų gyvybingumą
5 (Maisonpierre ir kt., aukščiau) ir, kad jo ekspresija
laike aiškiai sutampa su kritiniais nervų sistemos
vystymosi periodais, galima teigti, kad NT-3 yra
fiziologinis agentas, atsakingas už kai kurias svarbias
vystymosi funkcijas, kurios anksčiau buvo priskiriamos
10 BDNF ir NGF. Nauji šios genų šeimos narių vaidmens
tyrimai yra labai svarbūs, nes antikūnais prieš šiuos
faktorius galima paveikti jų funkcijas (Whitlmore,
senger, 1987, Brain Res. Rev., 12, 439-464).

15 Nors mes anksčiau pademonstravome, kad NT-3 gali veikti
kaip klasikinis neuronų gyvybingumą palaikantis
junginys (Maisonpierre ir kt., aukščiau), įvertinant,
kad NT-3 veikia kaip iš taikinio kilęs faktorius,
apribojus kurio ekspresiją vyksta neuronų selekcija ir
20 atranka, visa tai jokių būdu neeliminuoja kitų svarbių
NT-3 funkcijų (taip pat kaip ir kitų neurotrofinų
atveju). NT-3 ekspresijos pasiskirstymas
besivystančioje nervų sistemoje yra panašus į nestino
(naujo filamentinio tarpinio baltymo, kurio ekspresija
25 yra charakteringa CNS sritims neurogenezės metu Lendahl
ir kt., 1990) ir į SNAAPA - ankstyvojo neuritų
antigeninio markerio - (Jamamoto ir kt., 1986, J.
Neurosci, 6, 3576-3594). Skirtingai nei NGF (Cleoo ir
kt., 1989., Devel. Biol., 134, 30-37), didelė NT-3
30 ekspresija stebima prieš simpatinėms ataugoms
pasiekiant širdį. Tokiu būdu, NT-3 gali būti susieta su
vystymosi procesais, kurie neapima neuronų gyvybingumo
palaikymą, įskaitant proliferaciją (proneuronų
diferencijaciją) ir/arba ląstelių arba aksonų
35 migracijos valdymą; tolesnė prielaida apie tokį
potencialų NT-3 fiziologinį vaidmenį remiasi naujais
tyrimais - vienas neurotrofinų (t.y., NGF) gali turėti

įtaką proneuronų proliferacijai in vitro. Priešingai, BDNF nors transkribuojamas ankstyvosiose vystymosi stadijose, gali turėti bendresnį vaidmenį daug vėliau po pradinio neuronų žuvimo ir selekcijos periodo.

5

Visų trijų neurotrofinų ekspresijos profiliai suaugusiuose gyvūnuose yra stebėtinai panašūs - visi trys neurotrofinai ekspresuojami palyginamai dideliais kiekiais suaugusiųjų amono rage. Cholinerginių neuronų ataugų bazalinių priekinių smegenų amono rage nutraukimas įtakoja atrofiją ir sumažėja mediatorių sintezė neuronuose (tai išnagrinėta Smider ir Jonson, 1989, Am. Neurol., 26, 489-506). Panaši atrofija susieta su senų žiurkių "atminties" testų blogu atlikimu, žmonėms - su Alchaimerio liga. Cholinerginių neuronų ataugų į bazalinius priekinius smegenis atrofija gali būti grįžtama modeliuose su žiurkėmis, įvedant NGF. Čia pateikiami duomenys neprieštarauja tokiai galimybei, kad subrendęs amono ragas normaliai tiekia bazaliniams priekiniams smegenims visus tris neurotrofinus, turint omeny, kad NGF ir BDNF veikimas yra komplementarus cholinerginiams neuronams kultūroje, atspindint tikrus fiziologinius šių junginių vaidmenis. Bet NT-3 ekspresija labai didelė ankstyviausioje amono rago vystymosi stadijoje, o po to sumažėja iki suaugusiųjų dydžio, kuris panašus NGF ir BDNF dydžiams. Ši didelė ankstyvoji NT-3 ekspresija leidžia padaryti prielaidą, kad NT-3 gali turėti unikalų vaidmenį valdant arba sukuriant ankstyvuosius darinius iš bazalinių priekinių smegenų arba kitus hipokampo aferentus, arba žvaigždėtų progranuliolastelių proliferaciją; santykinai maži NGF ekspresijos kiekiai ankstyvojoje amono rago vystymosi stadijoje liudija, kad NGF tokio vaidmens neturi (Large, aukščiau).

10

15

20

25

30

35

13. Mikroorganizmų deponavimas

Pateikiami žemiau mikroorganizmų kamienai buvo deponuoti 1990 m. vasario mėn. 28 d. Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (American Type Culture Collection, 12301, Parkland drive, Rock Ville, Maryland, 20852):

	Kamienas	ATCC kolekcijos numeris
Bakteriofago DNR	φhN3 (G1)	40763
Bakteriofago DNR	φrN3 (G1)	40764
Plazmidė	pC8-rN3 (P1)	40766
Plazmidė	pC8-hN3 (P1)	40765

Šis išradimas neapsiriboja pateikiamais aprašyme išradimo įgyvendinimo pavyzdžiais. Iš tikrųjų galimos įvairios išradimo modifikacijos, papildant pateikiamą aprašymą, kurios bus suprantamos specialistams iš pateikto aprašymo ir pridėtų piešinių. Tokias modifikacijas apima šio išradimo Apibrėžtis. Aprašyme cituojami įvairūs šaltiniai, kurie naudojami kaip nuorodos.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Neurotrofino-3 baltymas (NT-3), turintis aminorūgščių seką:
5 Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys
Asp Ser Glu Ser
Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
His Gln Val Thr
Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln
10 Tyr Phe Tyr Glu
Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Glu Cys Arg
Gly Ile Asp Asp
Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val
Arg Ala Leu Thr
15 Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile
Asp Thr Ser Cys
Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

arba funkciškai aktyvus baltymas, iš esmės homologiškas
20 minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo subseka
arba jo homologas, apimantis funkciškai aktyvų peptidą,
skirtas panaudoti žmonių arba gyvulių nervų sistemos
ligos arba sutrikimo gydymui.

25 2. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas,
arba šio homologo subseka pagal 1 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti panaudoti
gydymui kombinacijoje su antru citokino agentu.

30 3. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas,
arba šio homologo subseka pagal 2 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti panaudoti
gydymui kombinacijoje su antruoju citokino agentu,
kuris yra pasirinktas iš nervų augimo faktoriaus (NGF)
35 ir smegenų neurotrofinio faktoriaus (BDNF).

4. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal bet kuri iš aukščiau pateiktų punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti panaudoti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra degeneracinė liga, gydymui.

5. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti degeneracinės ligos, kuri yra Alchaimerio liga, Hantingtono liga, išsėtinė sklerozė, amiotrofinė lateralinė sklerozė arba Parkinsono liga, gydymui.

6. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal bet kuri iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra nervų sistemos sužalojimas, gydymui.

7. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 1, 2, 3 arba 6 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra periferinė neuropatija, gydymui.

8. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 1, 2, 3 arba 6 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra diabetinė neuropatija, gydymui.

9. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 1, 2, 3 arba 6 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra alkoholinė neuropatija, gydymui.

10. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 1, 2, 3 arba 6 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra
5 neuropatija, susijusi su įgyto imunodeficito sindromu, gydymui.

11. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 6 punktą, b e s i s -
10 k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos sužalojimo, kuri sukėlė trauma, chirurginė operacija, infarktas, infekcija arba piktybinis susirgimas, gydymui.

12. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 6 punktą, b e s i s -
15 k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuri sukėlė apsinuodijimas toksiniu agentu, gydymui.

13. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 6 punktą, b e s i s -
20 k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuri sukėlė badavimas, gydymui.

14. NT-3 baltymas arba jo subseka, arba jo homologas, arba šio homologo subseka pagal 4 arba 6 punktą, b e -
30 s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra skirti nervų sistemos ligos arba sutrikimo, kuris yra įgimtas sutrikimas, gydymui.

15. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina neurotrofino-3 baltymo, turinčio aminorūgščių seką:
35

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys
 Asp Ser Glu Ser
 Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
 His Gln Val Thr
 5 Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln
 Tyr Phe Tyr Glu
 Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg
 Gly Ile Asp Asp
 Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val
 10 Arg Ala Leu Thr
 Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile
 Asp Thr Ser Cys
 Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

15 arba funkciškai aktyvaus baltymo, iš esmės homologiško
 minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo
 subsekos, arba jo homologo, apimančio funkciškai aktyvų
 peptidą, terapiškai efektyvus kiekis, bei antrasis
 citokino agentas pagal 2 arba 3 punktą kartu su
 20 farmaciškai priimtinu nešikliu.

16. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i
 tuo, kad į ją įeina neurotrofino-3 baltymo, turinčio
 aminorūgščių seką:

25 Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys
 Asp Ser Glu Ser
 Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
 His Gln Val Thr
 30 Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln
 Tyr Phe Tyr Glu
 Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg
 Gly Ile Asp Asp
 Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val
 35 Arg Ala Leu Thr
 Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile
 Asp Thr Ser Cys

Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr,

5 arba funkciškai aktyvaus baltymo, iš esmės homologiško
minėtam NT-3 baltymui, arba minėto NT-3 baltymo
subsekos, arba jo homologo, apimančio funkciškai aktyvų
peptidą, terapiškai efektyvus kiekis, kartu su
farmaciškai priimtinu nešikliu, pritaikyta
intraderminiam, intraraumeniniam, intraperitoniniam,
intraveniniam, poodiniam, intraventrikuliariniam arba
10 intratekaliniam vartojimui, arba įleidimui per
implantuotą įtaisą arba kateterį.

17. Antikūnas, antikūno fragmentas arba jų darinys,
b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie atpažįsta
15 neurotrofino-3 baltymą (NT-3), turintį aminorūgščių
seką pagal 1 punktą, arba jo homologą pagal 1 punktą,
arba šio peptido fragmentą, arba jo darinį.

18. Antikūno pagal 17 punktą gavimo būdas, b e s i s -
20 k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš šių stadijų:

(a) gyvūno (ne žmogaus) imunizavimo neurotrofinu-3 arba
peptidu, turinčiu neurotrofino-3 antigeninę
determinantę, norint pagaminti antikūną, reaguojantį su
25 neurotrofinu-3;

(b) antikūno, pasigaminusio (a) stadijoje, išskyrimo iš
gyvūno.

30 19. Monokloninio antikūno pagal 17 punktą gavimo būdas,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš
šių stadijų:

(a) hibridomų, galinčių išskirti antikūnus,
35 imunologiškai reakingus neurotrofinui-3, dauginimo; ir

(b) monokloninio antikūno gavimo iš padaugintų antikūnus produkujančių hibridomų.

20. Nervų sistemos ligos arba sutrikimo diagnozavimo in vitro būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina:

(a) audinio sąlytis su žymėta detektuojama žyme antikūno molekulė, kuri gali susijungti su neurotrofino-3 baltymu, turinčiu seką, apibrėžtą 1 punkte, arba šio peptido fragmentu arba jo dariniu, tokiomis sąlygomis, kuriose yra galimas toks susijungimas; ir

(b) nustatymas, ar įvyko toks susijungimas.

21. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad diagnozuojama nervų sistemos liga arba sutrikimas yra pasirinktas iš auglio, degeneracinės ligos arba sensorinio neurono ligos.

22. Žymėta detektuojama žyme antikūno molekulė, galinti susijungti su neurotrofino-3 baltymu, turinčiu aminorūgščių seką pagal 1 punktą, šio peptido fragmentu arba jų dariniu, skirta panaudoti diagnozuojant in vivo nervų sistemos ligą arba sutrikimą.

1/ 35

HSDPARRGELSVCDISSEHVIADKKTAVDHSGGTIVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNP	pig BDNF	kiaulės
SSSHPIFHRGEFSVCDISVWV**GDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRD	human NGF	žmogaus
SSSHPVFHRGEFSVCDISVWV**GDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRD	bovine NGF	jaučio
SSTHPYFHMGEFSVCDISVWV**ADKTTATDIKGKEVTVLAEVHVNINNSVFKQYFFETKCRD	g. pig NGF	g. kiaulės
SSTHPVFMHGEFSVCDISVWV**GDKTTATDIKGKEVTVLAEVNIINNSVFRQYFFETKCRD	mouse NGF	pelės
TAHPVLHRGEFSVCDISVWV**GDKTTATDIKGKEVTVLAEVNIINNSVFKQYFFETKCRD	chick NGF	vištos
EDHPVIINLGEHSVCDISVWV**TKTTATDIKGNTVTVMENVLNDNKVYKQYFFETKCKH	snake NGF	gyvatės
MGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRRTTQSYVVRALTMDSKKRIGRIFIRIDTSCVCILTIKRG	pig BDNF	kiaulės
PHPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMGKQ*AAWRFIRIDTACVCLSRKAVRRA	human NGF	žmogaus
PHPVDSGCRGIDAKHWNSYCTTTHTFVKALTMGKQ*AAWRFIRIDTACVCLSRKTGQRA	bovine NGF	jaučio
PSPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTTDNKQ*AAWRFIRIDTACVCLNRKAARRG	g. pig NGF	g. kiaulės
SHPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTTDEKQ*AAWRFIRIDTACVCLSRKATRRG	mouse NGF	pelės
PRPVSSGCRGIDAKHWNSYCTTTHTFVKALTMGGKQ*AAWRFIRIDTACVCLSRKSGRP	chick NGF	vištos
PNPEPSGCRGIDSSHWNSYCTETDIFIKALTMENHQ*ASWRFIRIETACVCLSRKKGH	snake NGF	gyvatės

FIG. 1

2/35

```

GGAACCCCG CCGCTATAA ATAACAGGGA GGAGTTTACC 40
TCAATTTGTTA GACTGGTGGT ACCCTCTCCT CACCTCTCAGA TTGTCAGCCT CGGTGGCTGA TGCCAGAATG 110
ACAGGGGCCTC TTCCGGCCAG CTGTTAACAC CTGIGTTTCC TTTTTCAGA TCCTACAGGT GAACAAGGTG 180

1
Met Ser Ile Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn Ser 20
ATG TCC ATC TTG TTT TAT GTG ATA TTT CTT GCT TAT CTC CGT GGC ATC CAA GGC AAC AGC 40
Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys Leu Ile Gln 30
ATG GAT CAA AGG AGT TTG CCG GAA GAC TCT CTC AAT TCC CTC ATC ATC AAG CTG ATC CAG 60
Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln 50
GCG GAT ATC TTG AAA AAC AAG CTT TCC AAA CAG ATG GTG GAT GTT AAG GAA AAT TAC CAG 80
Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro Arg Glu Pro Glu Gln Gly Glu Ala Thr Arg Ser 70
AGC ACC CTG CCC AAA GCA GAG GCA CCC AGG GAA CCA GAG CAG GGA GAG GCC ACC AGG TCA 100
Glu Phe Gln Pro Met Ile Ala Thr Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln Arg Arg Tyr Asn 90
GAG TTC CAG CCA ATG ATT GCA ACG GAC ACA GAG CTA CTA CGG CAA CAG AGA CGC TAC AAT 120
Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Met 110
TCG CCC CGG GTC CTG AGT GAC AGC ACC CCT TTG GAG CCC CCT CCC TTA TAC CTA ATG 140
Glu Asp Tyr Val Gly Asn Pro Val Val Ala Asn Arg Thr Ser Pro Arg Arg Lys Arg Tyr 130
GAG GAT TAT GTG GGC AAC CCG GTG GTA GCC AAT AGA ACC TCA CCA CGG AGG AAA CGC TAT 140

```

FIG.2

Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr	Ser Val Cys Asp Ser Ser Glu Ser Leu Trp Val	150	160
GCA GAA CAT AAG AGT CAC CGA GGA GAG TAC TCA GTG TGT GAC AGT GAG AGC CTG TGG GTG		170	660
Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile		180	
ACC GAC AAG TCC TCA GCC ATT GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTC ACA GTG CTG GGG GAG ATC		190	720
Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg		200	
AAA ACC GGT AAC TCT CCT GTG AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG AGA TGT AAA GAA GCC AGG		210	780
Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr		220	
CCG GTC AAA AAC GGT TGC AGG GGG ATT GAT GAC AAA CAC TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACT		230	840
		240	
Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp		900	
TCG CAA ACC TAT GTC CGA GCA CTG ACT TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC TGG CGC TGG			
Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End		960	
ATA CGA ATA GAC ACT TCC TGT GTG TGT GCC TTG TCG AGA AAA ATT GGA AGA ACA TGA ATT			
GGCATCIGTC CCCACATATA AATTATTACT TTAAATTATA TGATATGCAT GTAGCATATA AATGTTTATA		1030	
TTGTTTTTAT ATATTATAAG TTGACCITTA TTATTAAAC TTCAGCAACC CTTACAGTAT ATAGCTTTT		1100	
TTCTCAATAA AATTCGIGTG CTGCGCTCCC CTCAGGCCCTT TCCCATCIGT TAACCTTGTT TTGTGATTGG		1170	
GCCTCTGGGA ACCCTTCTGT AAAACCTGIG TACACCAGTA TTGGCATTG AGTATTGTCA AGGCCATGAC		1240	
TGTGGTTTCA GTAAACITTC TTAAATCGG ATGAGTCAGA GTTG		1284	

FIG.2 (tesinys)

4/35

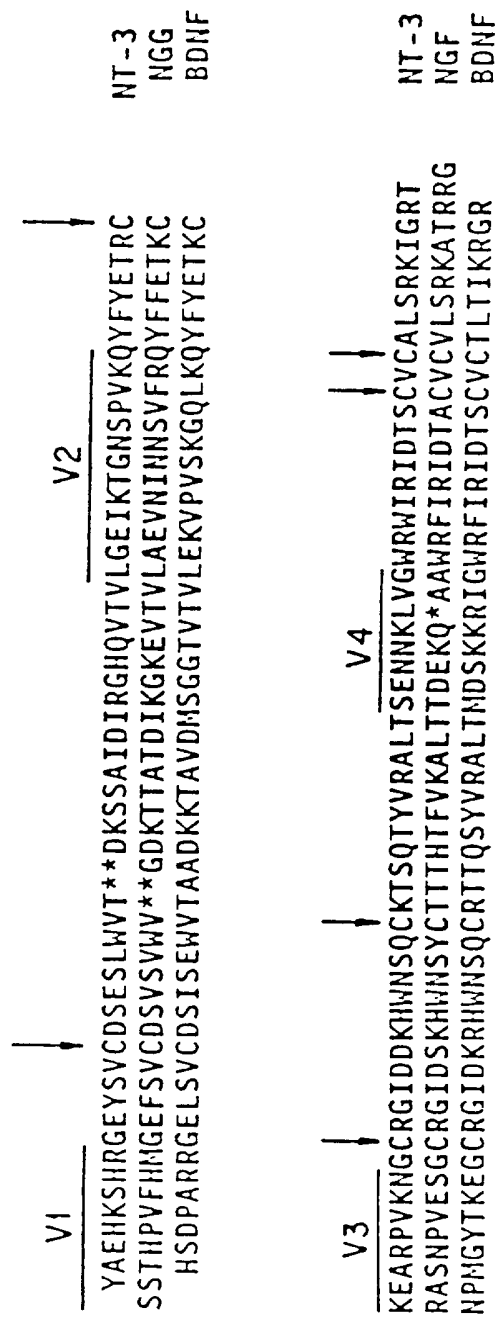


FIG.3

5/35

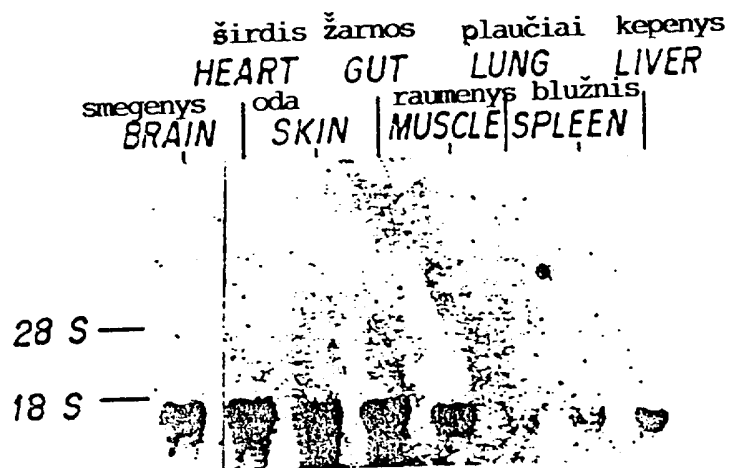


FIG. 4A

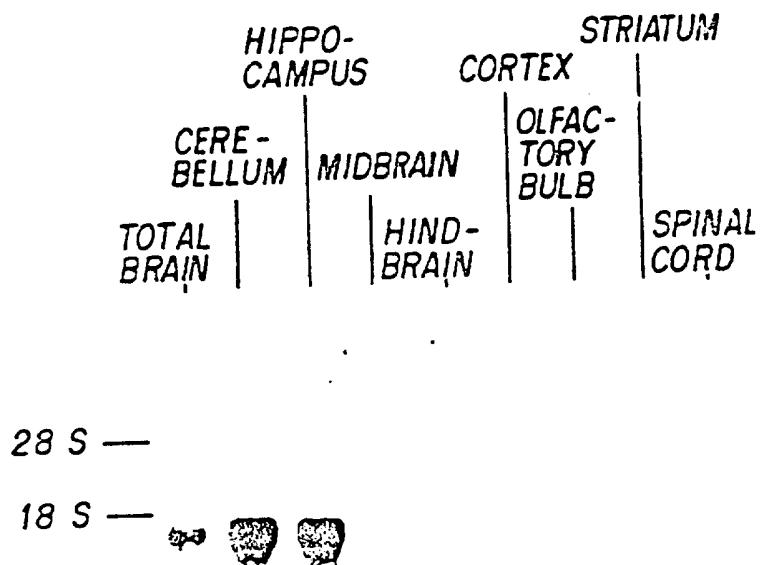


FIG. 4B

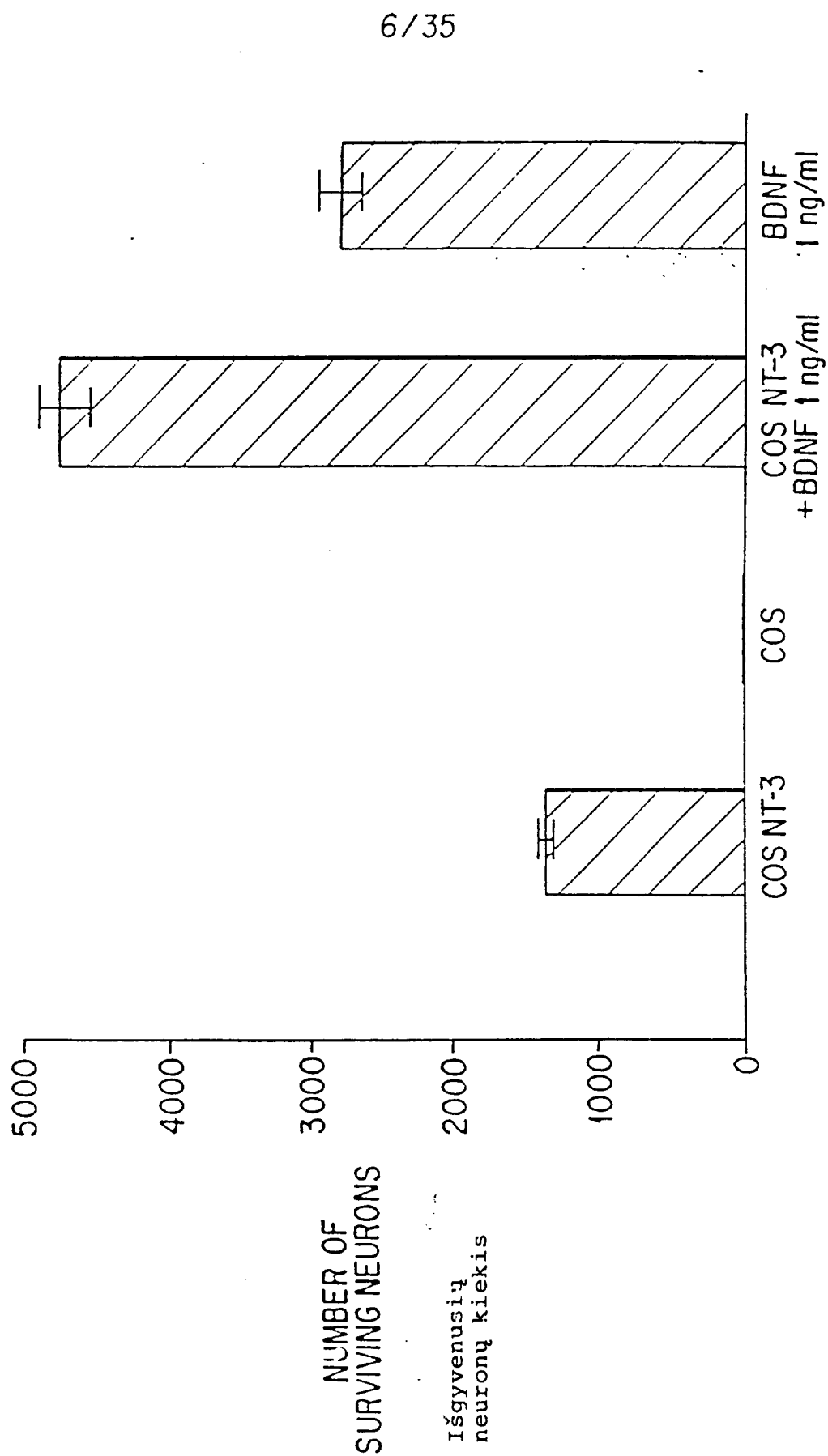


FIG. 5

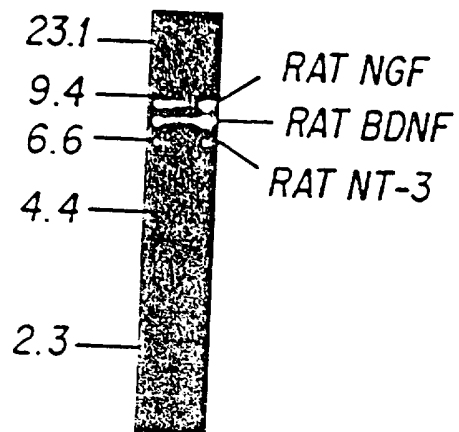


FIG. 6A

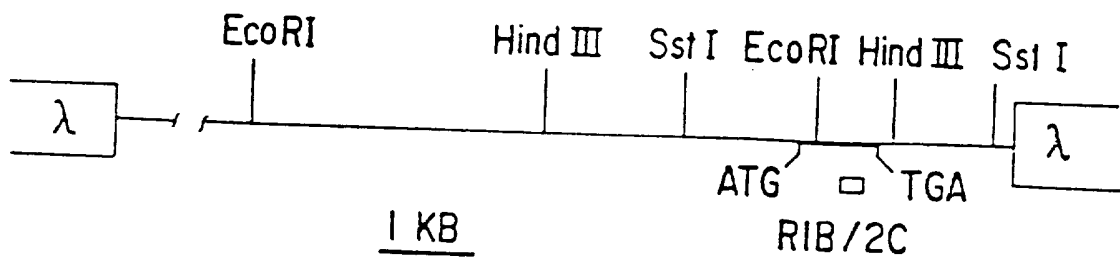
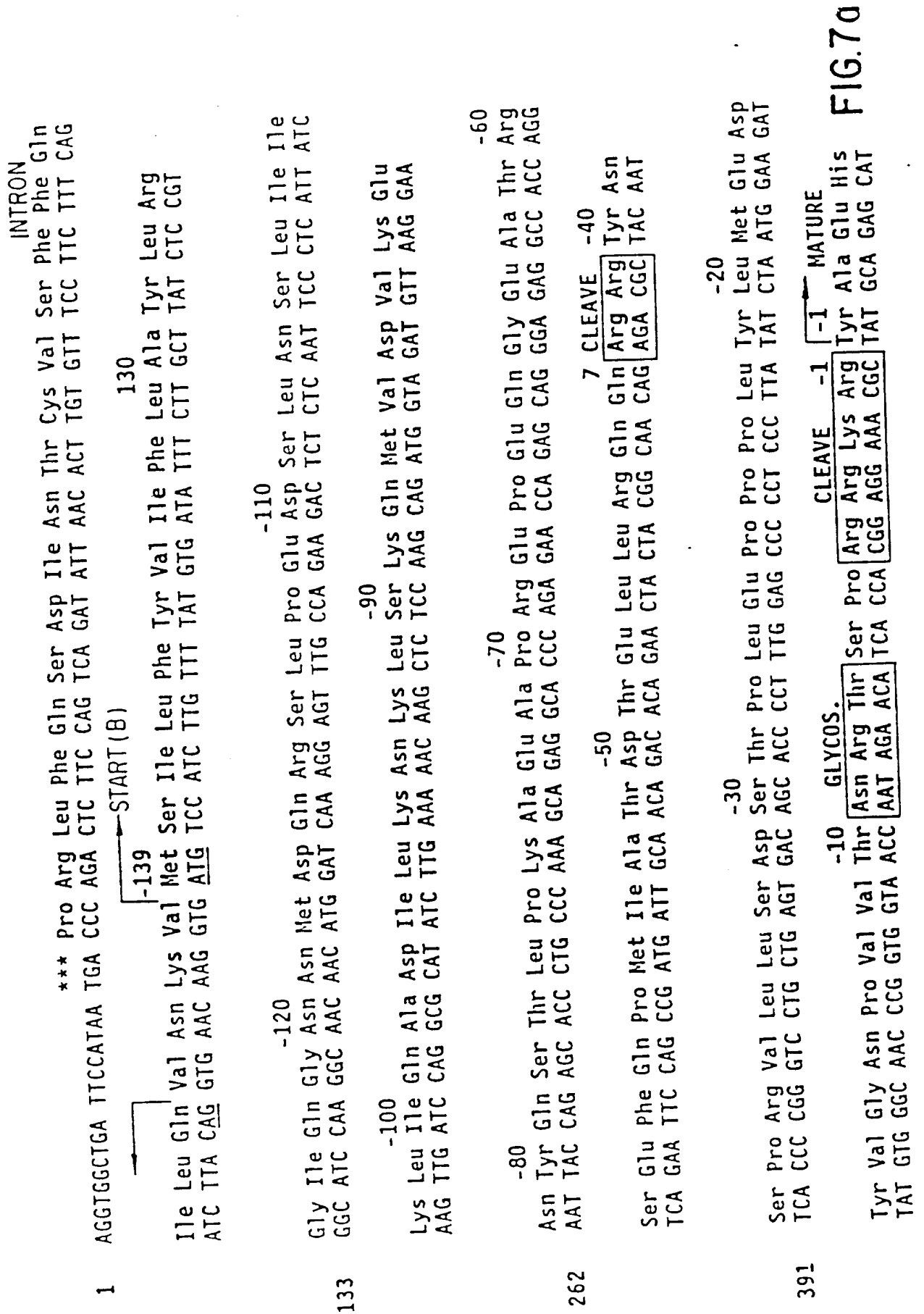


FIG. 6B

8/35



```

10
526 Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val CYS Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser
    AAG AGT CAC CGA GGA GAG TAC TCA GTG TGT GAC AGT GAG AGC CTG TGG GTG ACC GAC AAG TCC TCA

30
    Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro
    GCC ATT GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTT ACA GTG TTG GGA GAG ATC AAA ACC GGC AAC TCT CCT

40
649 Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg CYS Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly CYS Arg Gly
    GTG AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG AGG TGT AAA GAA GCC AGG CCA GTC AAA AAC GGT TCC AGG GGG

50
    70
    Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln CYS Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr
    ATT GAT GAC AAA CAC TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACG TCG CAA ACC TAC GTC CGA GCA CTG ACT

80
    90
    Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser CYS Val CYS Ala Leu
    TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC TGG CGC TGG ATA CGA ATA GAC ACT TCC TGT GIG IGT GCC TTG

100
    110
    Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr ***
    TCA AGA AAA ATC GGA AGA ACA TGA ATT GGCACTGTC CCCACATATA AATTATTACT TTAAATTATA

119
911 TGATATGCAAT GTAGCATATA AATGTTTATA TTGTTTTTAT ATATTATAAG TTGACCTTTA TTTATTAAAC TTCAGCAACC
    CTTACAGTAT ATAAGCTTTT TTTTCTCAAT AAAATTTCGIG TGCTTGCCIT CGCTCAGGCC TCTCCCACT

1061 GTTAACCTTG TTTTGTGATT GGGCTCTCGG GAACCTTCTG TAAACCTTGT GTACACCAGT ATTTGGCATT CAGTATTGTC
    AA

```

FIG. 7a (tesinys)

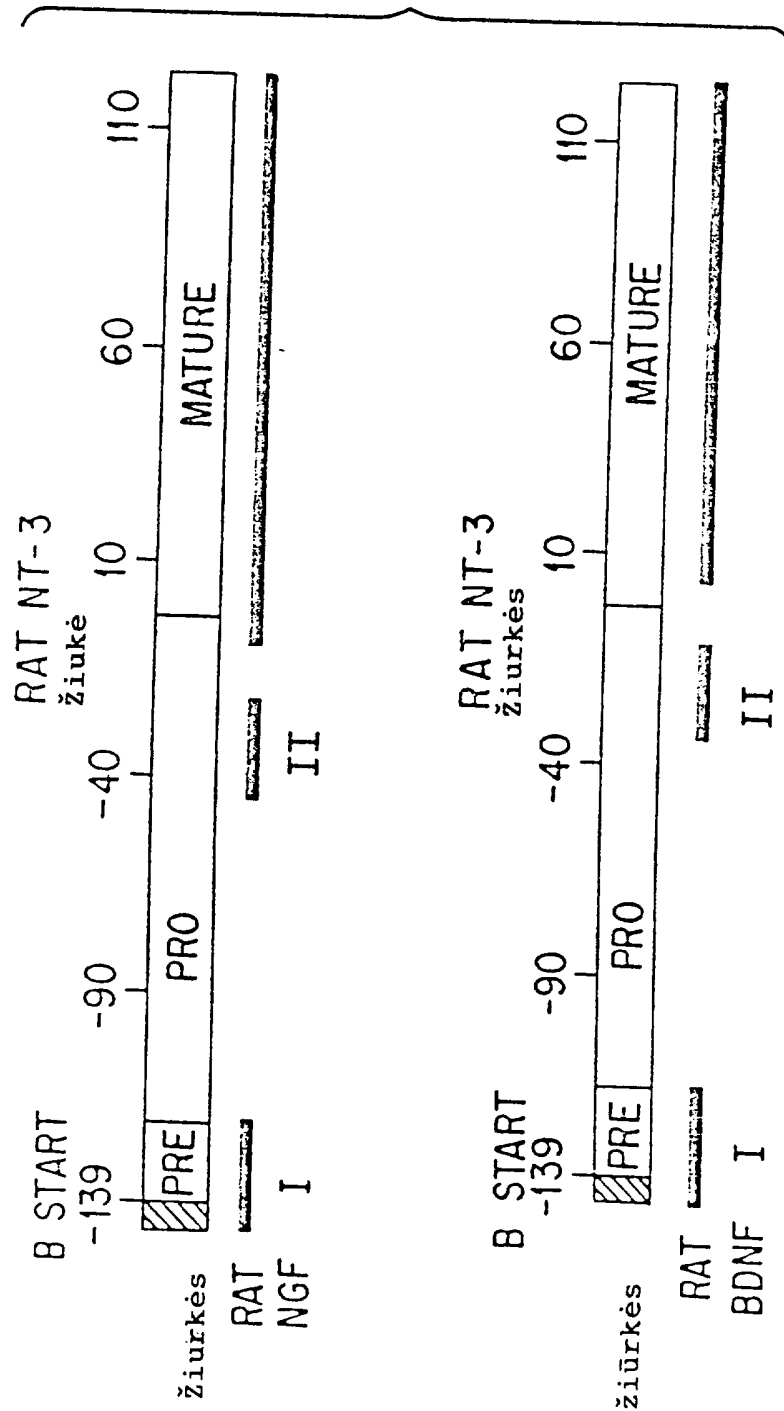


FIG. 7 b

FIG.7c

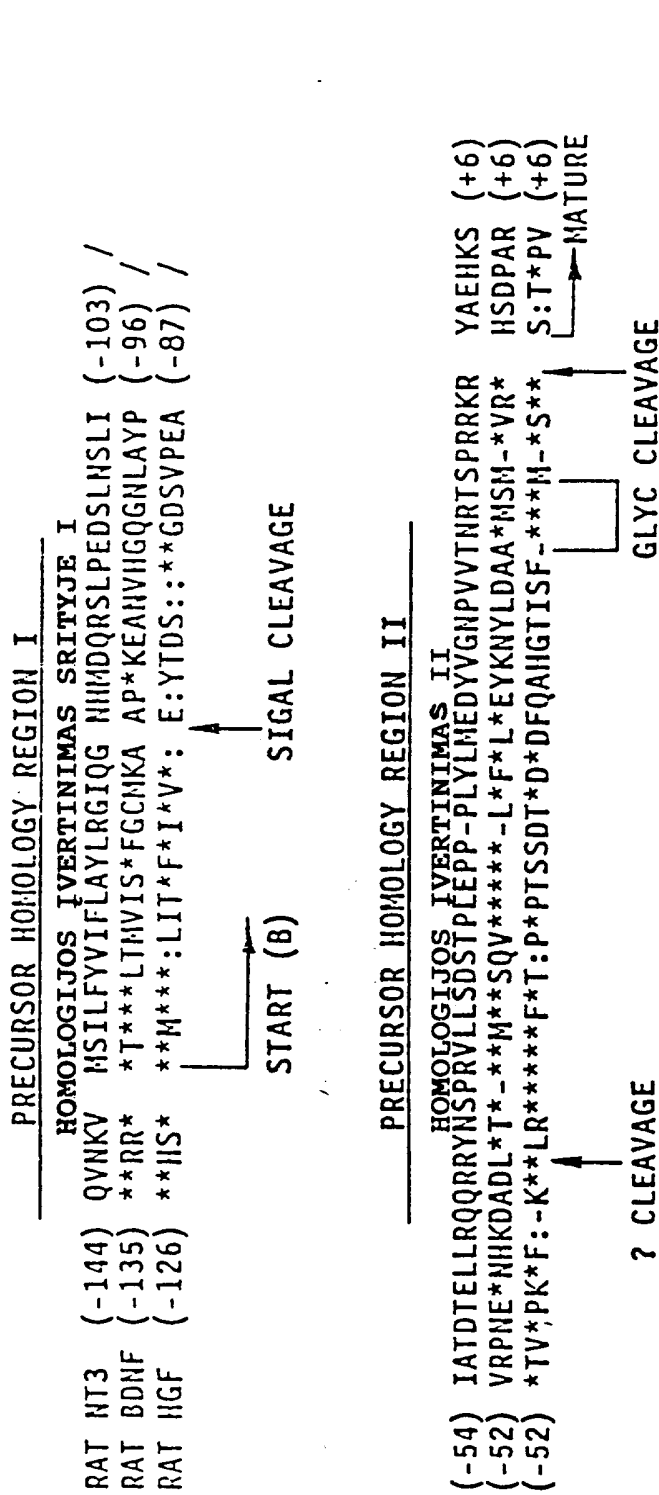
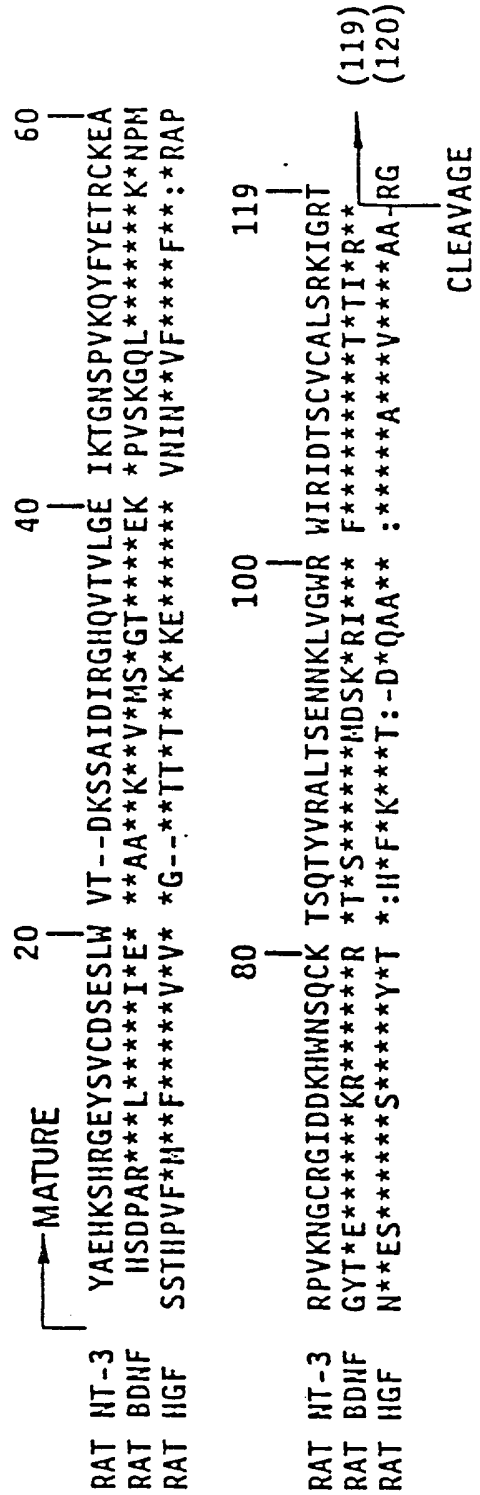
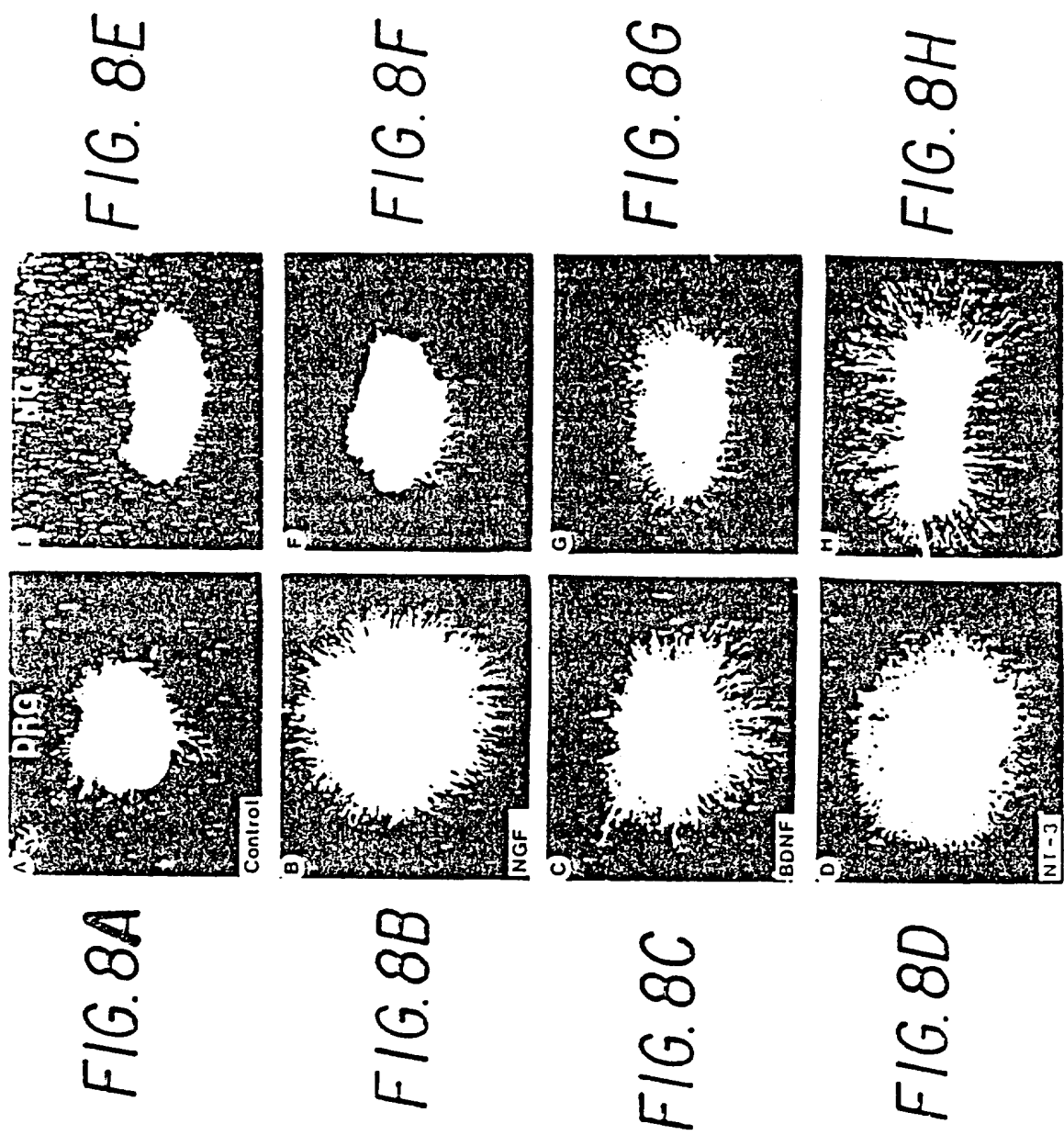


FIG.7d





13/35



FIG. 8I



FIG. 8J



FIG. 8K



FIG. 8L

14/35

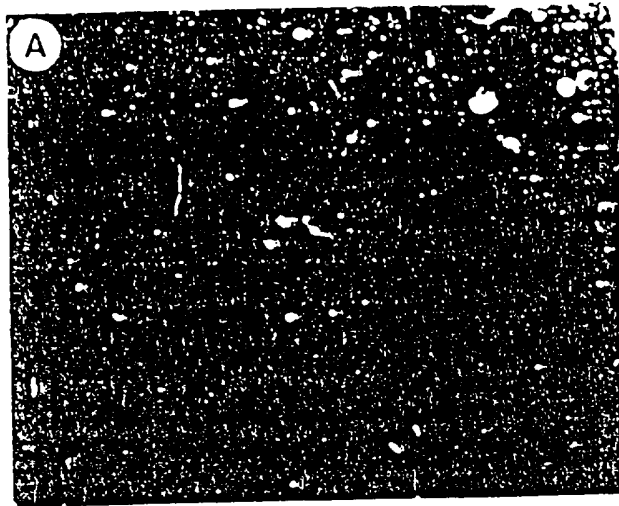


FIG. 9A

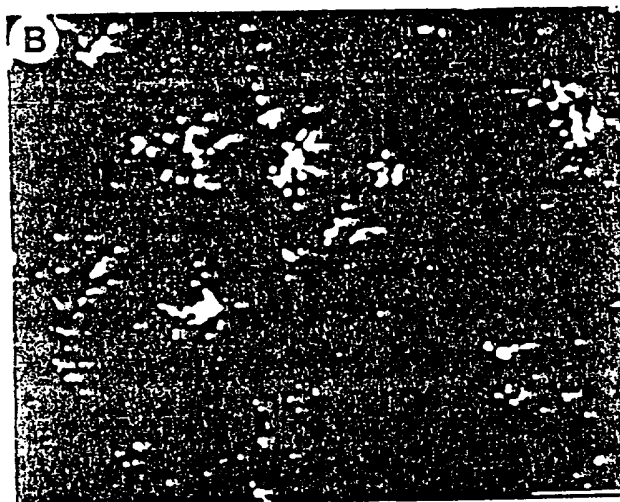


FIG. 9B

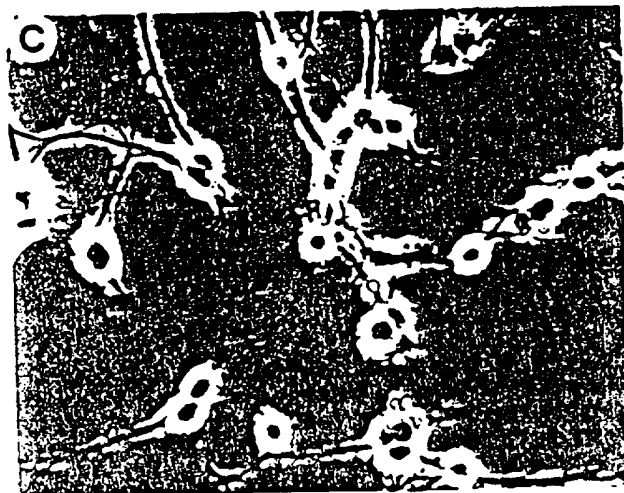
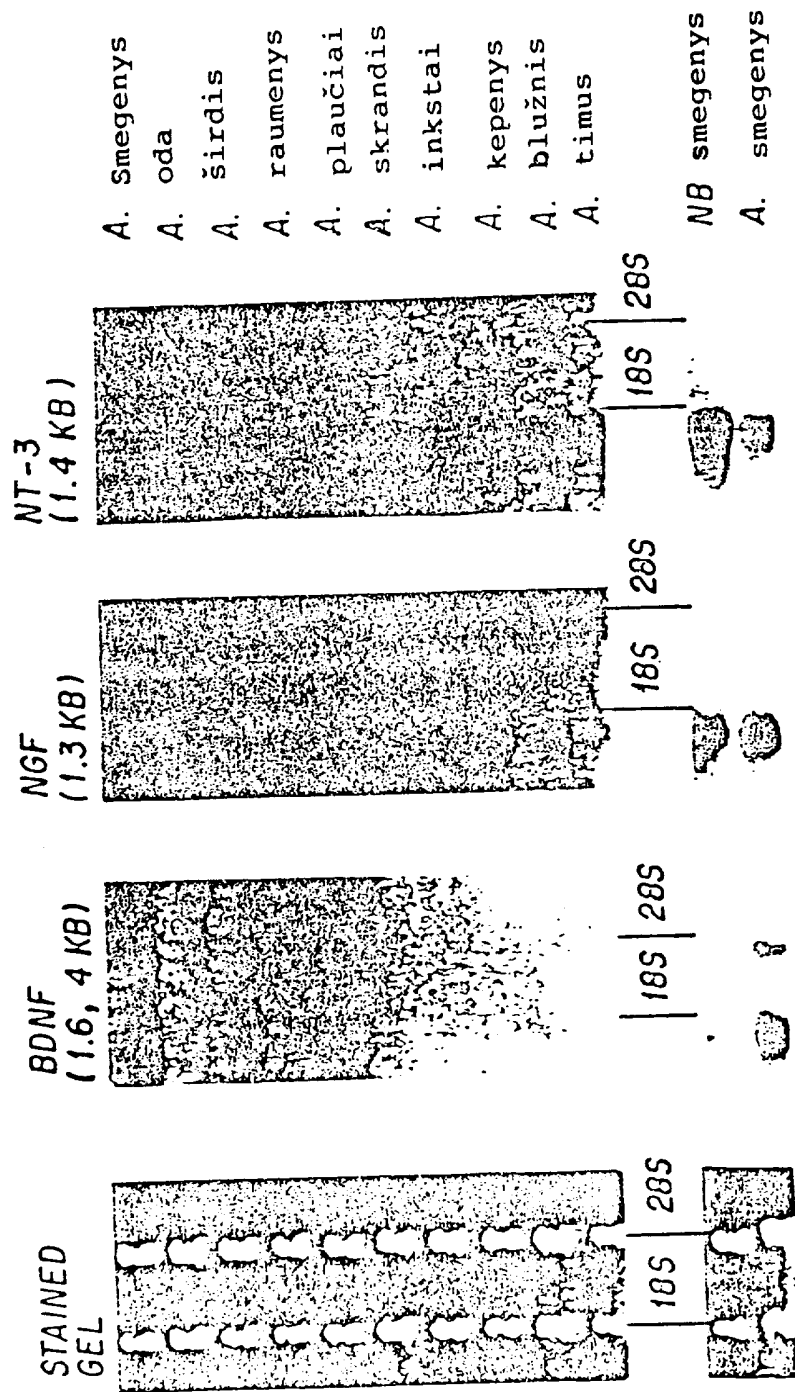


FIG. 9C

15/35

FIG. 10



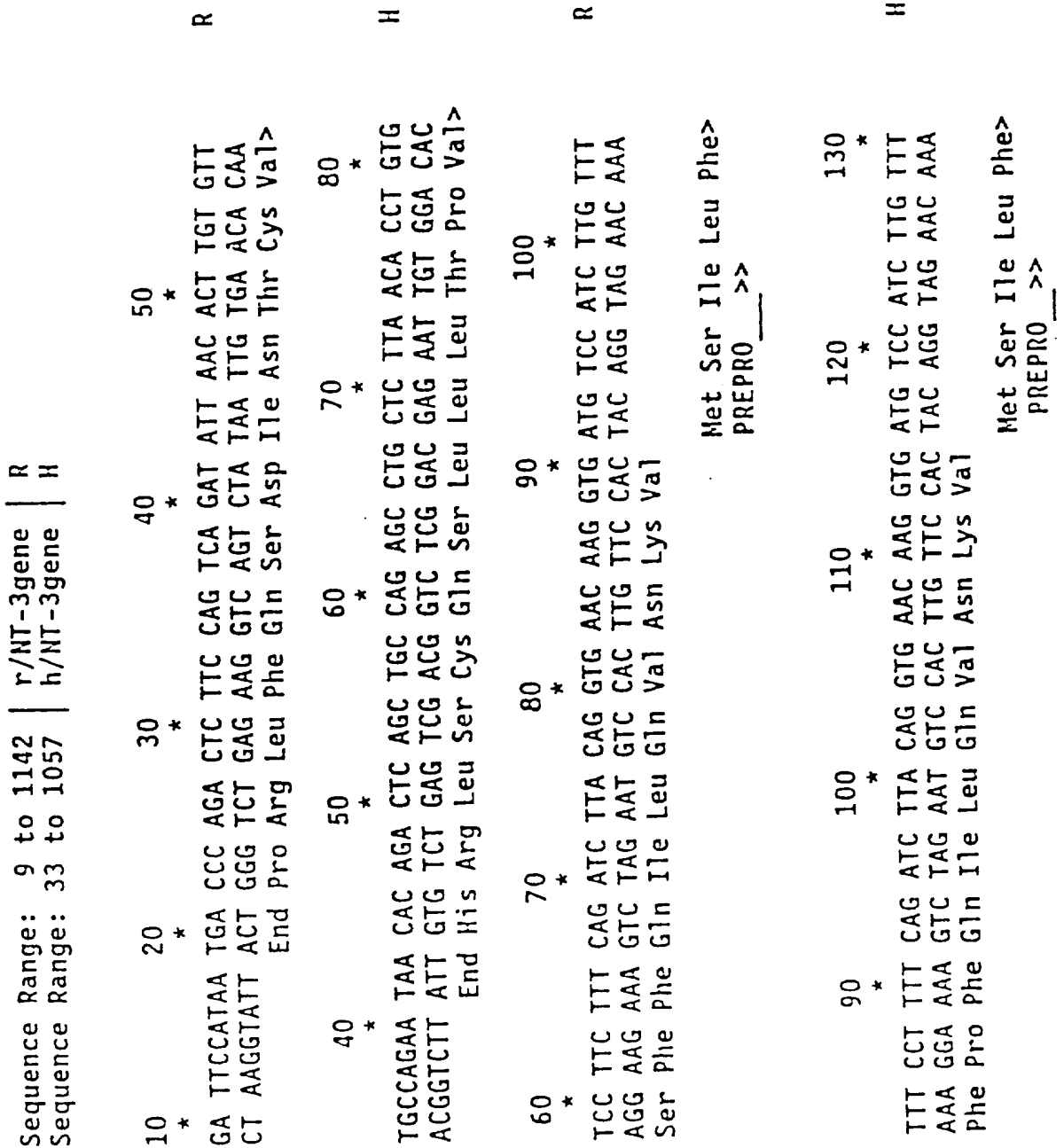


FIG.11

17/35

110	120	130	140	150	
*	*	*	*	*	
TAT GTG ATA TTT CTT GCT TAT CTC CGT GGC ATC CAA GGC AAC AAC ATG					R
ATA CAC TAT AAA GAA CGA ATA GAG GCA CCG TAG GTT CCG TTG TTG TAC					
Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn Asn Met>					
140	150	160	170		
*	*	*	*		
TAT GTG ATA TTT CTC GCT TAT CTC CGT GGC ATC CAA GGT AAC AAC ATG					H
ATA CAC TAT AAA GAG CGA ATA GAG GCA CCG TAG GTT CCA TTG TTG TAC					
Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn Asn Met>					
160	170	180	190	200	
*	*	*	*	*	
GAT CAA AGG AGT TTG CCA GAA GAC TCT CTC AAT TCC CTC ATT ATC AAG					R
CTA GTT TCC TCA AAC GGT CTT CTG AGA GAG TTA AGG GAG TAA TAG TTC					
Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys>					
180	190	200	210	220	
*	*	*	*	*	
GAT CAA AGG AGT TTG CCA GAA GAC TCG CTC AAT TCC CTC ATT ATT AAG					H
CTA GTT TCC TCA AAC GGT CTT CTG AGC GAG TTA AGG GAG TAA TAA TTC					
Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys>					

FIG.11 (tęsinys)

210	220	230	240	
* TTG ATC CAG GCG GAT ATC TTG AAA AAC AAG CTC TCC AAG CAG ATG GTA	* AAC TAG GTC CGC CTA TAG AAC TTT TTG TTC GAG AGG TTC GTC TAC CAT	* Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val>	* R	
230	240	250	260	270
* CTG ATC CAG GCA GAT ATT TTG AAA AAC AAG CTC TCC AAG CAG ATG GTG	* GAC TAG GTC CGT CTA TAA AAC TTT TTG TTC GAG AGG TTC GTC TAC CAC	* Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val>	* H	
250	260	270	280	290
* GAT GTT AAG GAA AAT TAC CAG AGC ACC CTG CCC AAA GCA GAG GCA CCC	* CTA CAA TTC CTT TTA ATG GTC TCG TGG GAC GGG TTT CGT CTC CGT GGG	* Asp Val Lys Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro>	* R	
280	290	300	310	320
* GAC GTT AAG GAA AAT TAC CAG AGC ACC CTG CCC AAA GCT GAG GCT CCC	* CTG CAA TTC CTT TTA ATG GTC TCG TGG GAC GGG TTT CGA CTC CGA GGG	* Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro>	* H	

FIG. 11 (tesinys)

300	*	310	*	320	*	330	*	340	*							
AGA	GAA	CCA	GAG	CAG	GGA	GAG	GCC	ACC	AGG	TCA	GAA	TTC	CAG	CCG	ATG	R
TCT	GTT	GGT	CTC	GTC	CCT	CTC	CGG	TGG	TCC	AGT	CIT	AAG	GTC	GGC	TAC	
Arg Glu Pro Glu Gln Gly <u>Gly Ala Thr Arg Ser Gly Phe Gln Pro Met</u>																
330	*	340	*	350	*	360	*	370	*							
CGA	GAG	CCG	GAG	CAG	GGA	GGG	CCC	CGC	AAG	TCA	GCA	TTC	CAG	CCA	GTG	H
GCT	CTC	GGC	CTC	GTC	CCT	CCC	GGG	GGC	TTC	AGT	CGT	AAG	GTC	GGT	CAC	
Arg Glu Pro Glu Gln Gly <u>Gly Pro Arg Lys Ser Ala Phe Gln Pro Val</u> >																
350	*	360	*	370	*	380	*	390	*							
ATT	GCA	ACA	GAC	ACA	GAA	CTA	CTA	CGG	CAA	CAG	AGA	CGC	TAC	AAT	TCA	R
TAA	CGT	TGT	CTG	TGT	CIT	GAT	GAT	GAT	GCC	GTT	GTC	TCT	GCG	ATG	TTA	AGT
Ile Ala <u>Thr Asp</u> Thr Glu Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln Arg Arg Tyr Asn Ser>																
380	*	390	*	400	*	410	*									
ATT	GCA	ATG	GAC	ACC	GAA	CTG	CTG	CGA	CAA	CAG	AGA	CGC	TAC	AAC	TCA	H
TAA	CGT	TAC	CTG	TGG	CIT	GAC	GAC	GAC	GCT	GTT	GTC	TCT	GCG	ATG	TTG	AGT
Ile Ala <u>Met Asp</u> Thr Glu Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln Arg Arg Tyr Asn Ser>																

FIG. 11 (tęsinys)

400 * 410 * 420 * 430 * 440 *
 CCC CGG GTC CTG CTG AGT GAC AGC ACC CCT TTG GAG CCC CCT CCC TTA
 GGG GCC CAG GAC GAC TCA CTG TCG TGG GGA AAC CTC GGG GGA GGG AAT R

Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu>

420 * 430 * 440 * 450 * 460 *
 CCG CGG GTC CTG CTG AGC GAC ACG ACC CCC TTG GAG CCC CCG CCC TTG
 GGC GCC CAG GAC GAC TCG CTG TGC TGG GGG AAC CTC GGG GGC GGG AAC H

Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Thr Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu>

450 * 460 * 470 * 480 *
 TAT CTA ATG GAA GAT TAT GTG GGC AAC CCG GTG GTA ACC AAT AGA ACA
 ATA GAT TAC CTT CTA ATA CAC CCG TTG GGC CAC CAT TGG TTA TCT TGT R

Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Asn Pro Val Val Thr Asn Arg Thr>

470 * 480 * 490 * 500 * 510 *
 TAT CTC ATG GAG GAT TAC GTG GGC AGC CCC GTG GTG GCG AAC AGA ACA
 ATA GAG TAC CTC CTA ATG CAC CCG TCG GGC CAC CAC CGC TTG TCT TGT H

Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val Val Ala Asn Arg Thr>

21/35

490 * 500 * 510 * 520 * 530 *
TCA CCA CGG AGG AAA CGC TAT GCA GAG CAT AAG AGT CAC CGA GGA GAG R
AGT GGT GCC TCC TTT GCG ATA CGT CTC GTA TTC TCA GTG GCT CCT CTC

Ser Pro Arg Arg Lys Arg

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu>
MATURE__>>

520 * 530 * 540 * 550 *
TCA --- CGG CGG AAA CGG TAC GCG GAG CAT AAG AGT CAC CGA GGG GAG II
AGT --- GCC GCC TTT GCC ATG CGC CTC GTA TTC TCA GTG GCT CCC CTC

Ser ___ Arg Arg Lys Arg

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu>
MATURE__>>

540 * 550 * 560 * 570 * 580 *
TAC TCA GTG TGT GAC AGT GAG AGC CTG TGG GTG ACC GAC AAG TCC TCA R
ATG AGT CAC ACA CTG TCA CTC TCG GAC ACC CAC TGG CTG TTC AGG AGT

Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser>

560 * 570 * 580 * 590 * 600 *
TAC TCG GTA TGT GAC AGT GAG AGT CTG TGG GTG ACC GAC AAG TCA TCG II
ATG AGC CAT ACA CTG TCA CTC TCA GAC ACC CAC TGG CTG TTC AGT AGC

Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser>

FIG.11 (təsinys)

590	600	610	620	630	R
* GCC ATT GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTT ACA GTG TTG GGA GAG ATC AAA CGG TAA CTG TAA GCC CCT GTG GTC CAA TGT CAC AAC CCT CTC TAG TTT	* Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys>	* 610	* 620	* 630	
610	620	630	640	650	H
* GCC ATC GAC ATT CGG GGA CAC CAG GTC ACG GTG CTG GGG GAG ATC AAA CGG TAG CTG TAA GCC CCT GTG GTC CAG TGC CAC GAC CCC CTC TAG TTT	* Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys>	* 620	* 630	* 640	
640	650	660	670	680	R
* ACC GGC AAC TCT CCT GTG AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG AGG TGT AAA TGG CCG TTG AGA GGA CAC TTT GTT ATA AAA ATA CTT TGC TCC ACA TTT	* Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys>	* 640	* 650	* 660	
660	670	680	690	700	H
* ACG GGC AAC TCT CCC GTC AAA CAA TAT TTT TAT GAA ACG CGA TGT AAG TGC CCG TTG AGA GGG CAG TTT GTT ATA AAA ATA CTT TGC GCT ACA TTC	* Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys>	* 660	* 670	* 680	
50					

FIG. 11 (tęsinys)

690	*	700	*	710	*	720	*	
GAA GCC AGG CCA GTC AAA AAC GGT TGC AGG GGG ATT GAT GAC AAA CAC								R
CIT CGG TCC GGT CAG TTT TTG CCA ACG TCC CCC TAA CTA CTG TTT GTG								
Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His>								
710	*	720	*	730	*	740	*	750
GAA GCC AGG CCG GTC AAA AAC GGT TGC AGG GGT ATT GAT GAT AAA CAC								H
CIT CGG TCC GGC CAG TTT TTG CCA ACG TCC CCA TAA CTA CTA TTT GTG								
Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His>								
730	*	740	*	750	*	760	*	770
TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACG TCG CAA ACC TAC TGC CCA GCA CTG ACT								R
ACC TTG AGA GTC ACG TTT TGC AGC GTT TGG ATG CAG GCT CGT GAC TGA								
Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr>								
760	*	770	*	780	*	790	*	
TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACA TCC CAA ACC TAC TGC CGA GCA CTG ACT								H
ACC TTG AGA GTC ACG TTT TGT AGG GTT TGG ATG CAG GCT CGT CAC TGA								
Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr>								

FIG. 11 (tesinys)

24/35

```

780 *      790 *      800 *      810 *      820 *
TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC TGG CGC ATA CGA ATA GAC ACT
AGT CTT TTG TTG TTT GAG CAT CCG ACC GCG ACC TAT GCT TAT CTG TGA
R

Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr>

800 *      810 *      820 *      830 *      840 *
TCA GAG AAC AAT AAA CTC GTG GGC TGG CGG TGG ATA CGG ATA GAC ACG
AGT CTC TTG TTA TTT GAG CAC CCG ACC GCC ACC TAT GCC TAT CTG TGC
H

Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr>
100

830 *      840 *      850 *      860 *
TCC TGT GTG TGT GCC TCG TCA AGA AAA ATC GGA AGA ACA TGA
AGG ACA CAC ACA CCG AAC AGT TCT TTT TAG CCT TCT TGT ACT
R

Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End>

850 *      860 *      870 *      880 *
TCC TGT GTG TCT GCC TCG AGA AAA ATC GGA AGA ACA TGA
AGG ACA CAC ACA CCG AAC AGC TCT TTT TAG CCT TCT TGT ACT
H

Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr End>
119

```

FIG. 11 (tęsinys)

870	*	880	*	890	*	900	*	910	*	920	*	R
ATTGGCATCT	GTCCCCACAT	ATAAATTATT	ACTTTAAATT	ATATGATAIG	CAT							
TAACCGTAGA	CAGGGGTGTA	TATTTAATAA	TGAAATTTAA	TATACTATAC	GTA							
890	*	900	*	910	*	920	*	930	*	940	*	H
ATTGGCATCT	CTCCCCCATAT	ATAAATTATT	ACTTTAAATT	ATATGATAIG	CAT							
TAACCGTAGA	GAGGGGTATA	TATTTAATAA	TGAAATTTAA	TATACTATAC	GTA							
930	*	940	*	950	*	960	*	970	*	980	*	R
GTAGCATATA	AATGTTTATA	TTGTTTTTAT	ATATTATAAG	TTGACCTTTA	TTTATTAAAC							
CATCGTATAT	TTACAAATAT	AACAAAATA	TATAATATTC	AACIGGAAAT	AAATAATTGG							
950	*	960	*	970	*	980	*	990	*	1000	*	H
GTAGCATATA	AATGTTTATA	TTGTTTTTAT	ATAT-ATAAG	TTGACCTTTA	TTTATTAAAC							
CATCGTATAT	TTACAAATAT	AACAAAATA	TATA-TATTC	AACIGGAAAT	AAATAATTGG							

FIG. 11 (tęsinys)

26 / 35

990	*	1000	1010	1020	1030	1040	
TTCAGCAACC		CTTACAGTAT	ATAAGCTTTT	TTTTCTCAAT	AAAATTGCTG	TGCTTGCCCTT	R
AAGTCGTTGG		GAATGTCATA	TATTCGAAAA	AAAGAGTTA	TTTTAAGCAC	ACGAACGGAA	
1010	*	1020	1030	1040	1050		
TTCAGCAACC		CT-ACAGTAT	ATAAGCTTAT	CGATACCGTC	GACCTCGAGG	GGGGGCC/	H
AAGTCGTTGG		GA-TGTCATA	TATTCGAATA	GCTATGGCAG	CTGGAGCTCC	CCCCCGG/	
1050	*	1060	1070	1080	1090	1100	
CGCTCAGGCC		TCTCCCATCT	GTAAACCTTG	TTTTGTGATT	GGCTCTCGG	GAACCTTCTG	R
GCGAGTCCGG		AGAGGGTAGA	CAATTGGAAC	AAACACTAA	CCCGAGAGCC	CTTGGAAGAC	
1110	*	1120	1130	1140			
TAAACCTGT		GTACACCAGT	ATTGGCATT	CAGTATTGTC	AA/		R
ATTITGGACA		CATGTGGTCA	TAAACCGTAA	GTCATAACAG	TT/		

FIG. 11 (tesinys)

27/35

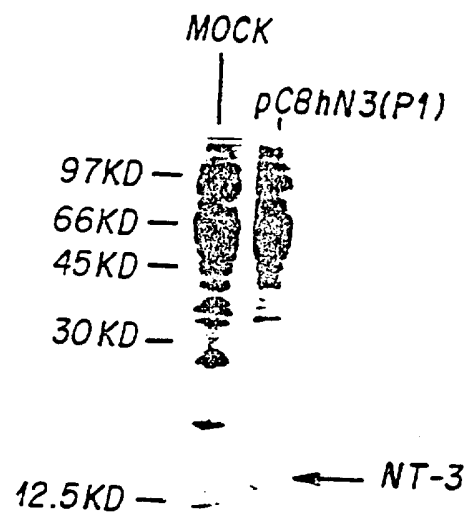


FIG. 12

28/35

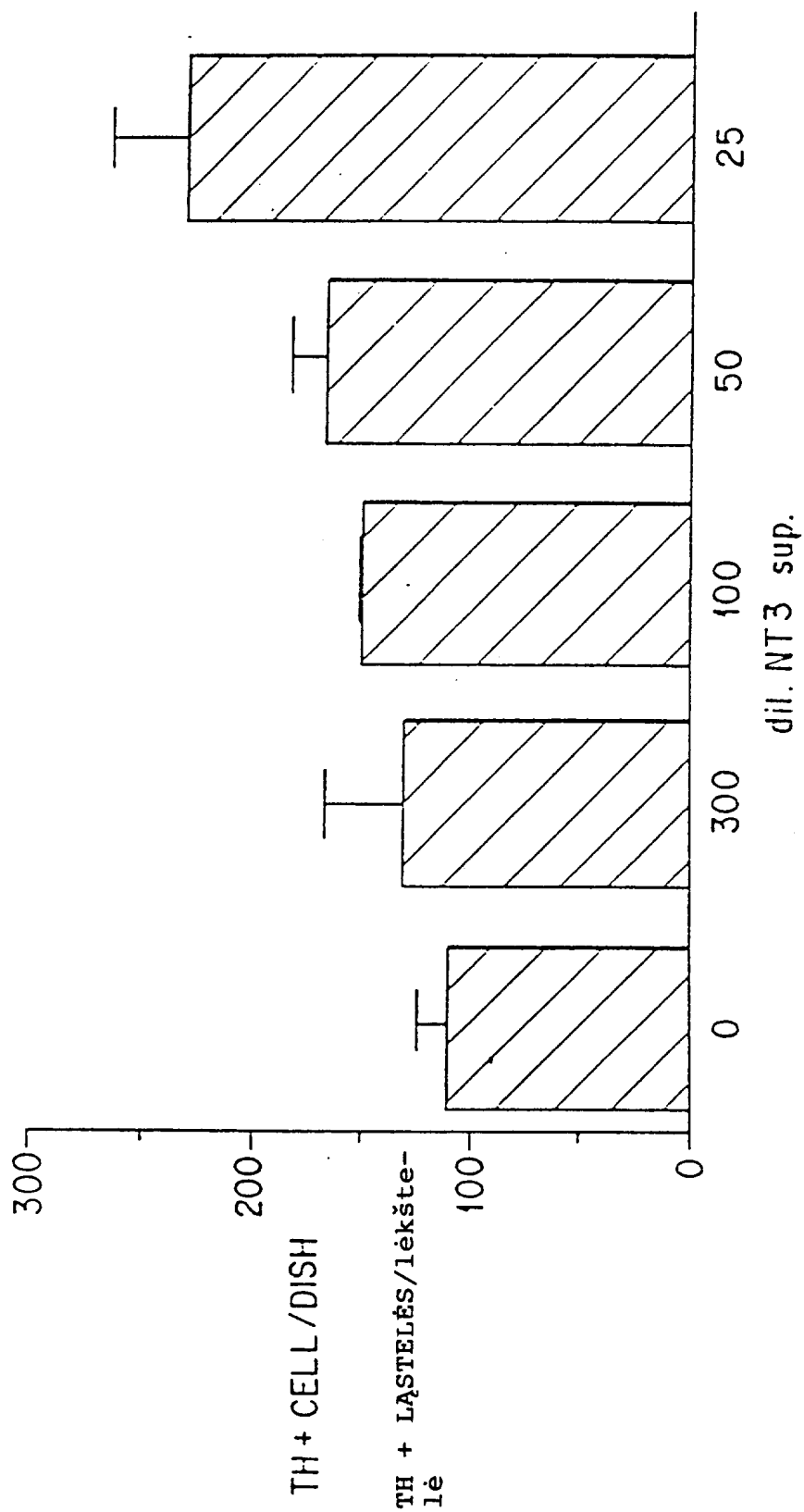


FIG.13

29/35

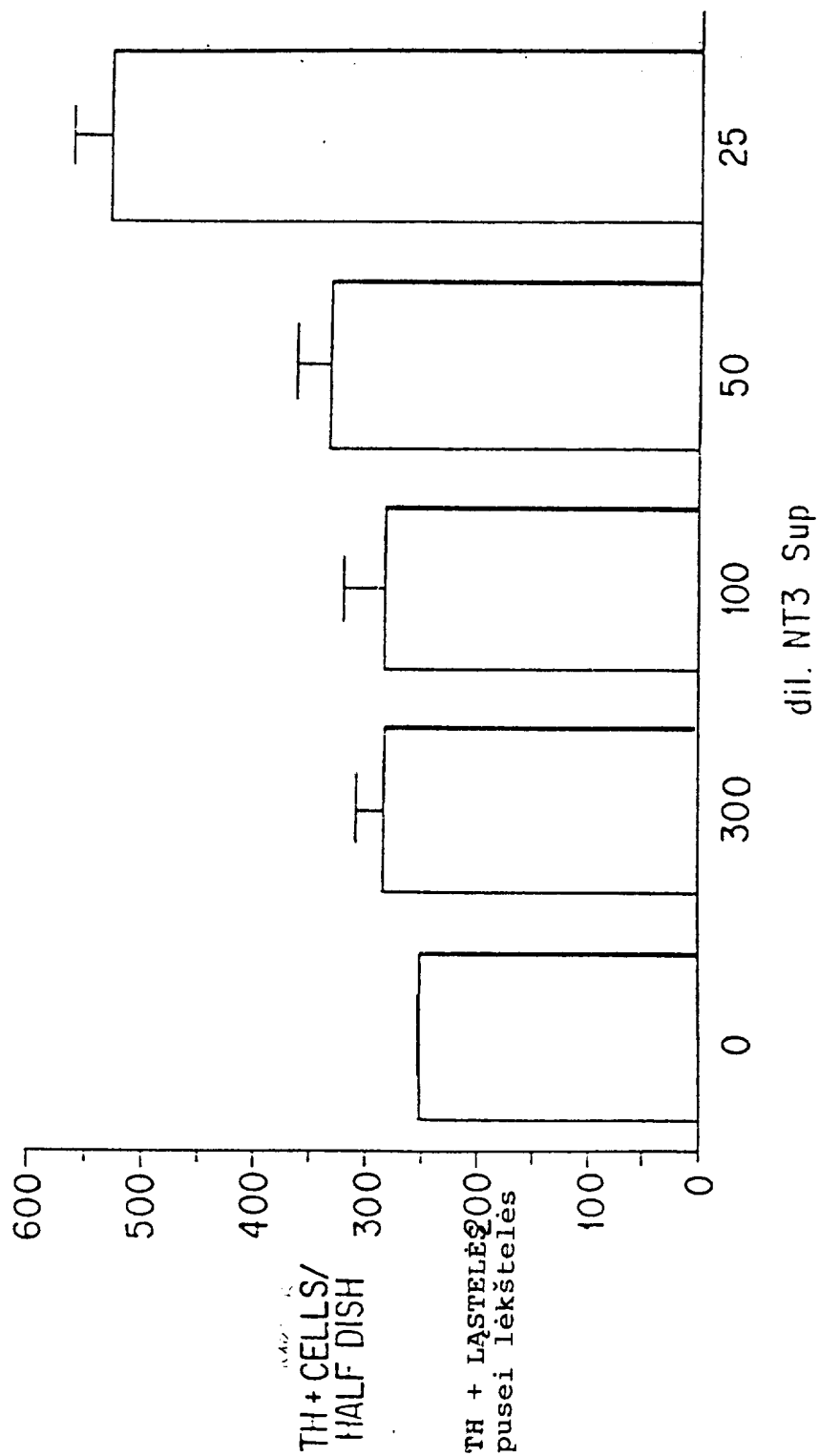
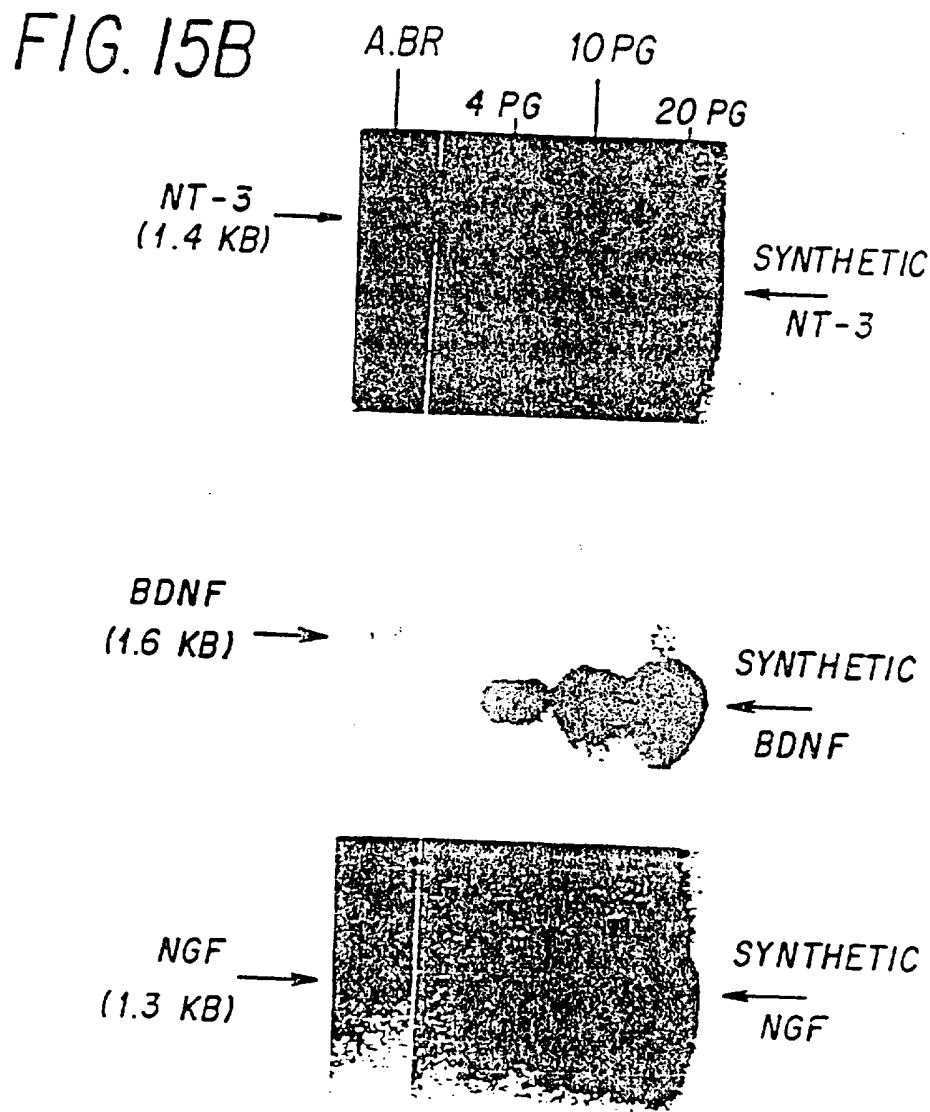
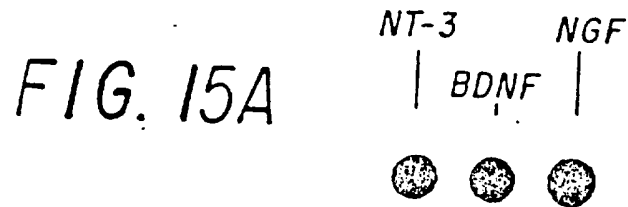
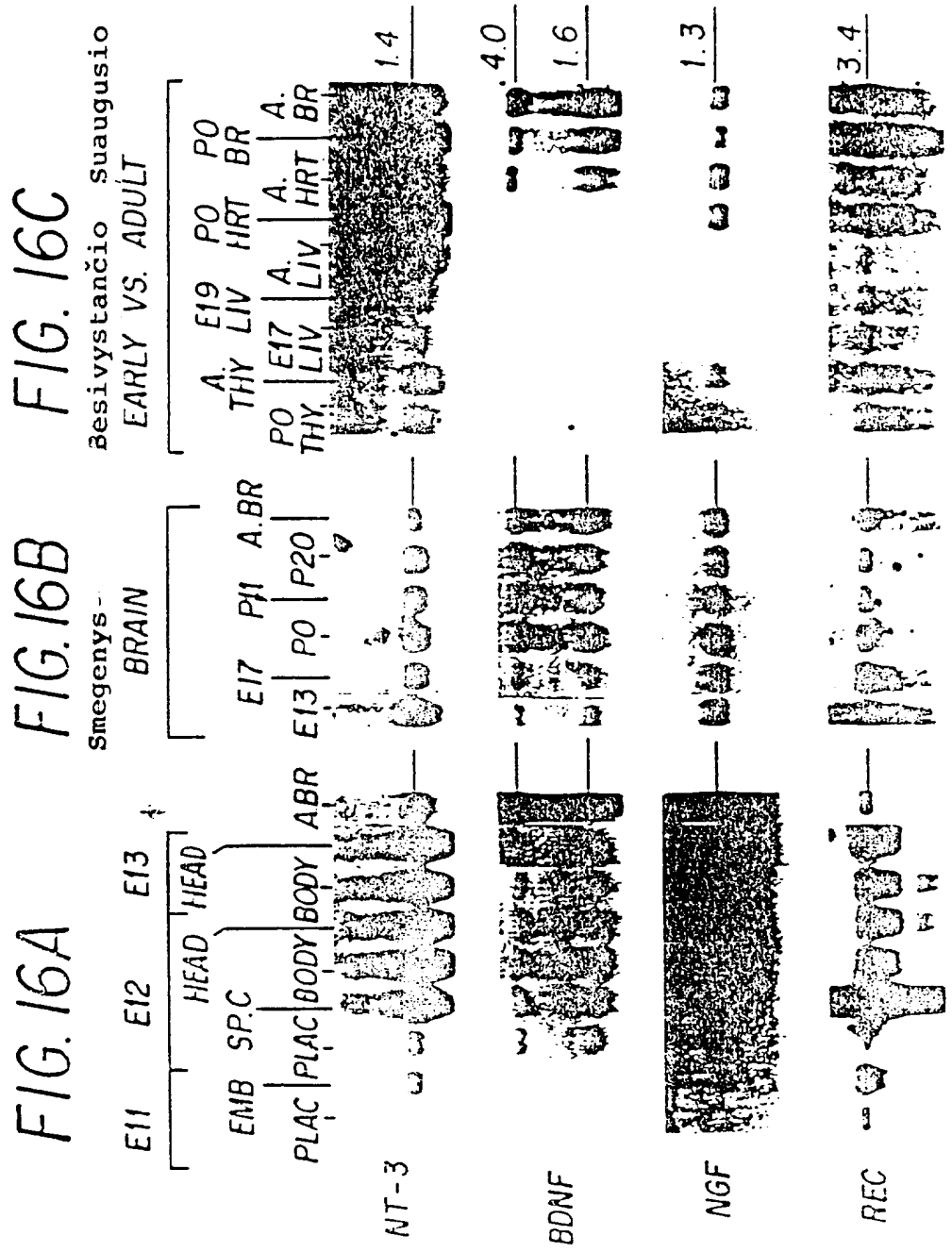


FIG. 14

30/35





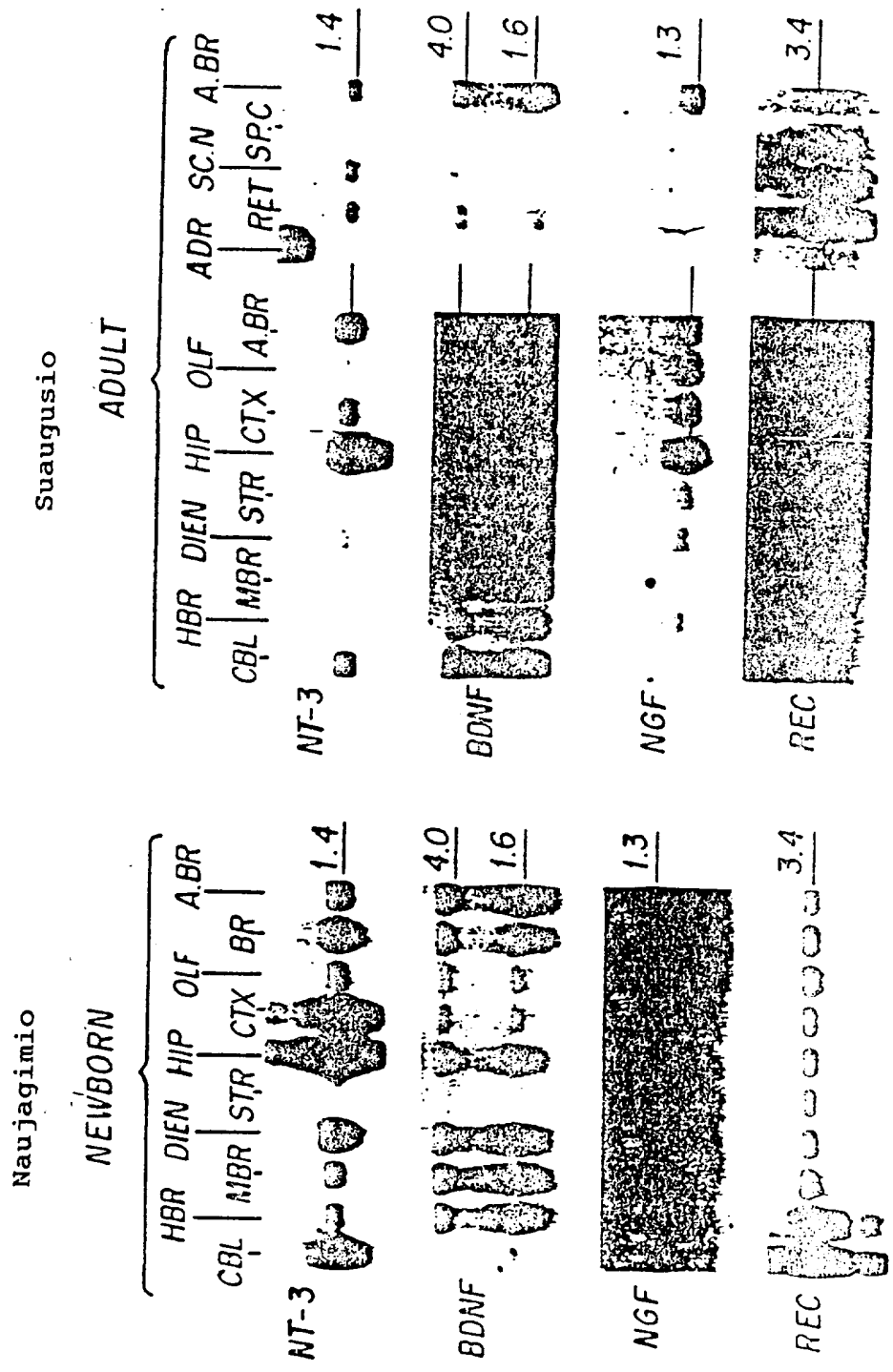


FIG. 17A

FIG. 17B

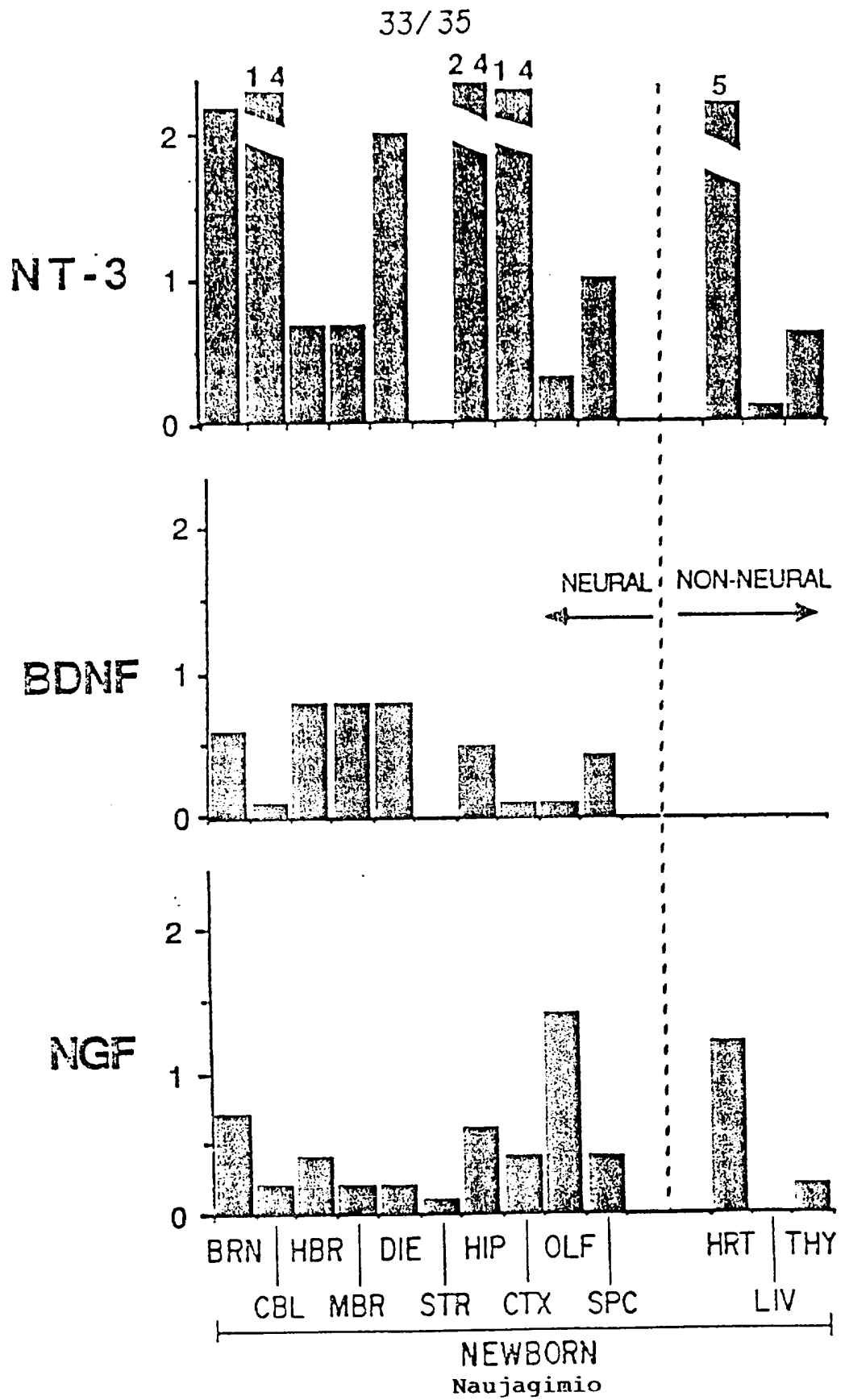


FIG.18A

34/35

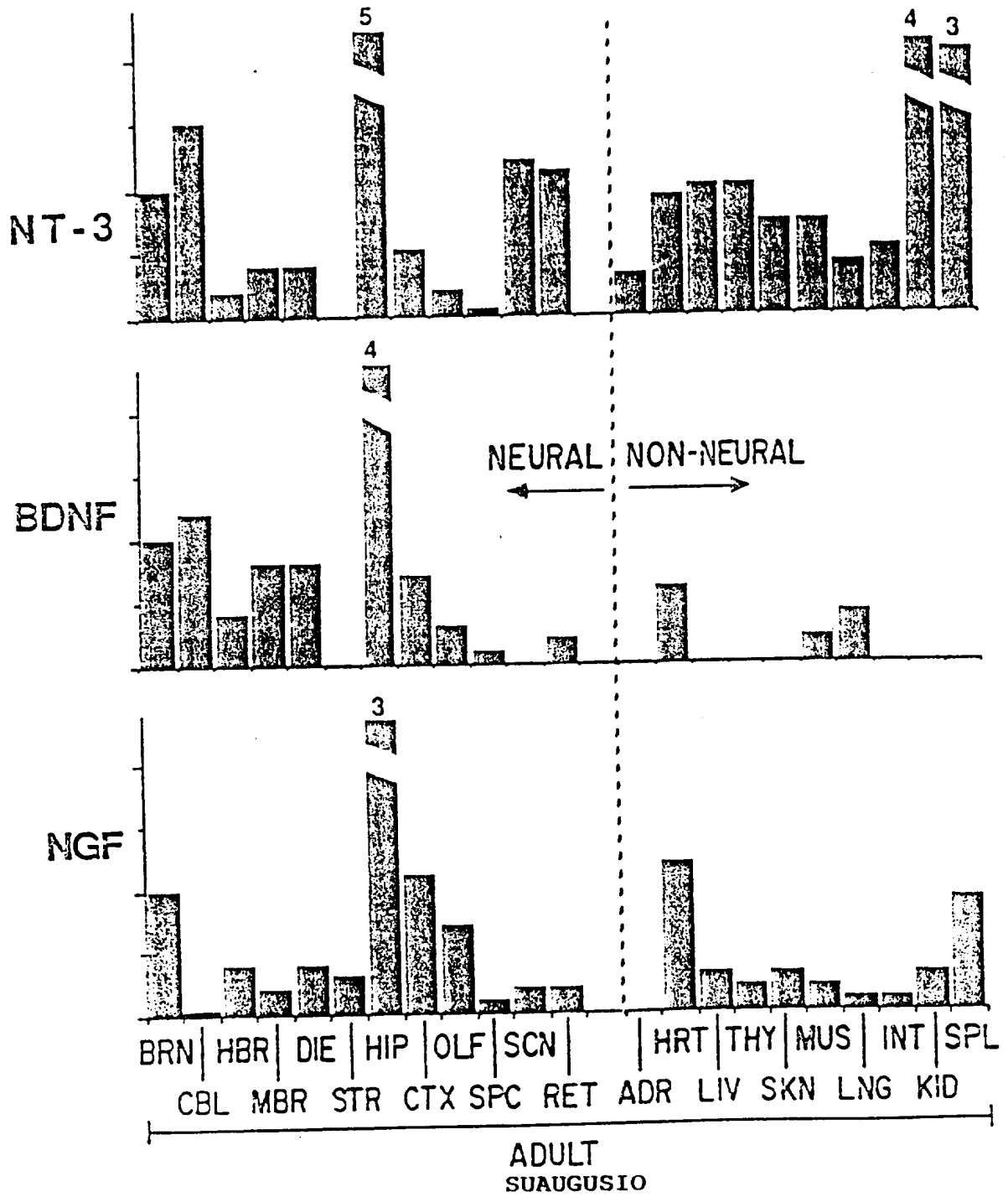


FIG. 18B

35/35

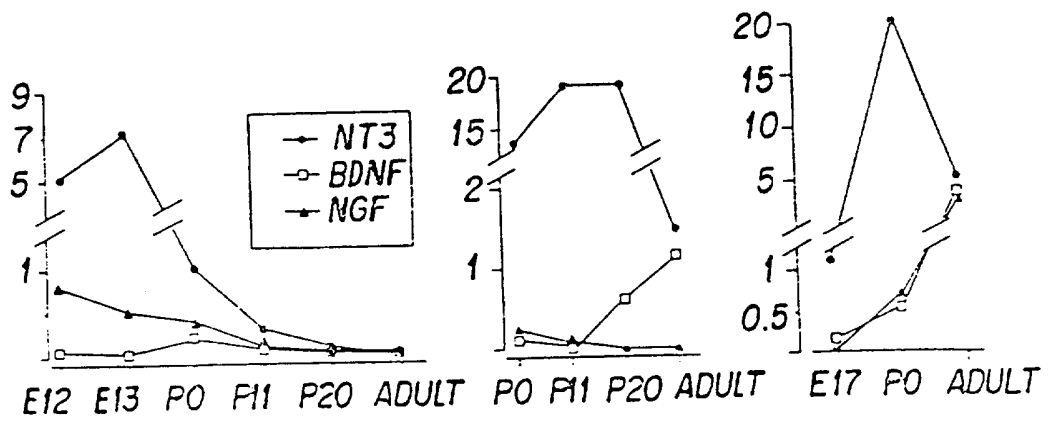
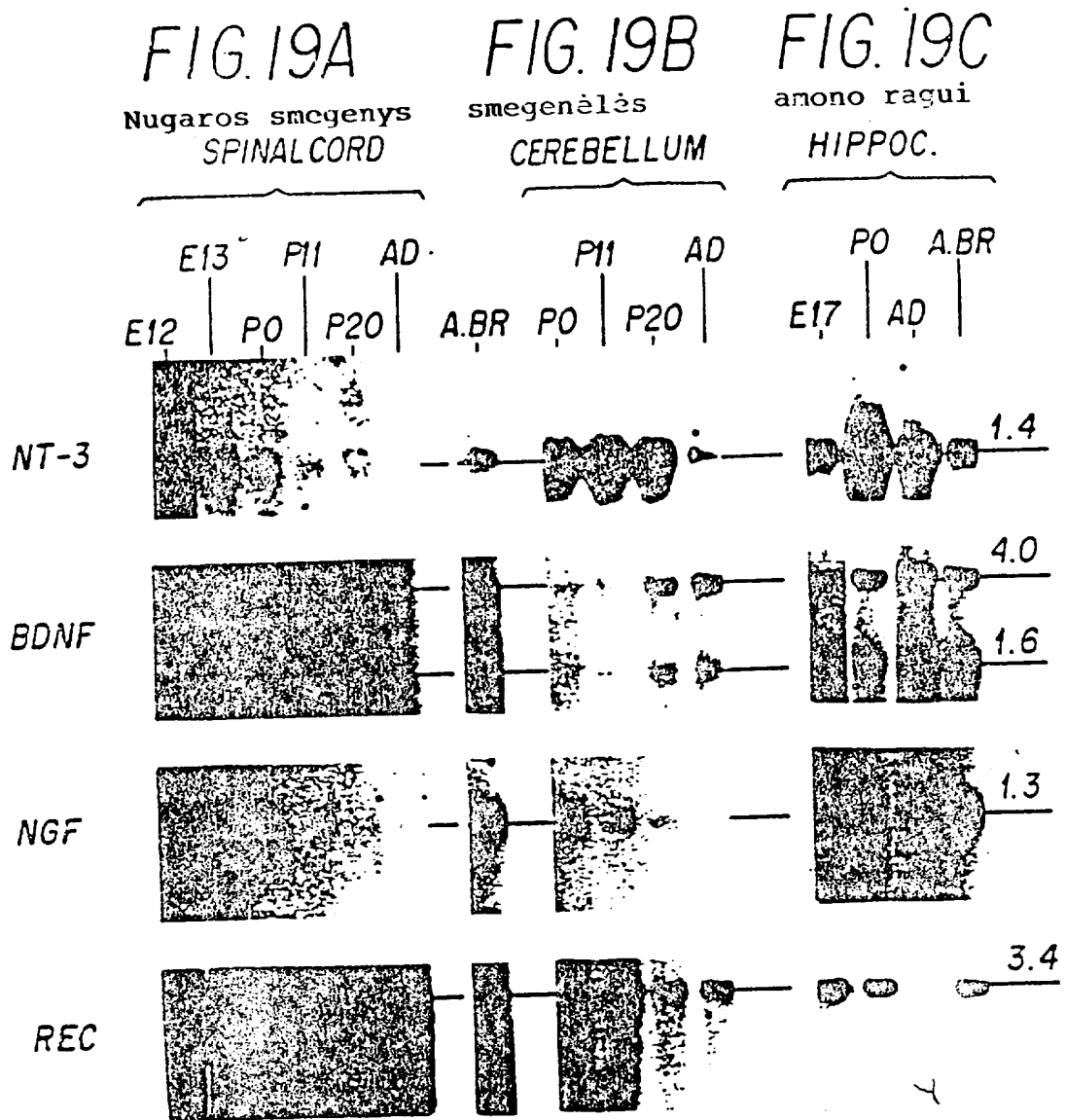


FIG. 19E

FIG. 19F

FIG. 19G