

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3245-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15. 04. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.04.96,
09.05.96, 14.04.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/015907, 96/017221,
97/837199**

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 01. 99**
(Věstník č. 1/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/06281**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/40152**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

| | |
|--------|-------|
| C 12 N | 15/12 |
| C 12 N | 1/21 |
| C 12 N | 5/10 |
| C 12 N | 5/16 |
| C 07 K | 14/71 |
| C 07 K | 16/28 |
| A 61 K | 38/17 |
| A 61 K | 9/48 |
| G 01 N | 33/68 |

(71) Přihlášovatel:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US;

(72) Původce:

Fox Gary M., Newbury Park, CA, US;

Jing Shuqian, Thousand Oaks, CA, US;

Wen Duanzhi, Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Receptor pro neurotrofický faktor
odvozený od gliální buněčné linie**

(57) Anotace:

Neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie /GDNF/, silný neurotrofin, který vykazuje široké spektrum biologických aktivit na mnoho typů buněk jak centrálního, tak z periferního nervového systému. Klonování a charakterizace receptoru pro GDNF s vysokou afinitou. Tato molekula byla pojmenována GDNF receptor /GDNFR/, protože je první známou složkou receptorového systému. Jsou popsány sekvence nukleových kyselin a aminokyselin pro GDNFR proteinové produkty. Hydrofobní doména s vlastnostmi signálního peptidu se nalézá na amino-konci, zatímco druhá hydrofobní doména na karboxy-konci se účastní vazby receptoru na buněčnou membránu. Chybění transmembránové domény a cytoplasmického regionu ukazuje, že GDNFR vyžaduje jednu nebo více dalších molekul pro transmembránový přenos signálu. GDNFR mRNA je rozsáhle distribuována jak v nervovém systému, tak v non-neutrálních tkáních, což je v souladu s distribucí zjištěnou pro GDNF.

Z 3245-98 A3

Receptor pro neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká receptorů pro neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNF) a poskytuje sekvence nukleových kyselin a aminokyselin kodující receptor pro GDNF (GDNFR). Předkládaný vynález se také týká terapeutických technik pro léčbu stavů reagujících na GDNF.

Dosavadní stav techniky

Neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie

Neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNF) byl poprvé izolován a klonován z krysích B49 buněk jako silný neurotrofický faktor, který zvyšuje přežívání dopaminergních neuronů středního mozku (Lin et al., Science, 260: 1130 - 1132, 1993). Novější studie naznačili, že tato molekula vykazuje různé další biologické aktivity a že působí na několik typů neuronů jak z centrálního, tak z periferního nervového systému. V centrálním nervovém systému (CNF) bylo prokázáno, že GDNF brání axotomií indukované smrti savčích faciálních a míšních motorických neuronů (Li et al., Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA, 92: 9771 - 9775, 1995; Oppenheim et al., Nature, 373: 344 - 346, 1995; Yan et al., Nature, 373: 341 - 344, 1995; Henderson et al., Science, 366: 1062 - 1064, 1994; Zurn et al., Neuroreport 6: 113 - 118, 1994) a že brání programované buněčné smrti u ptačích motorických neuronů (Oppenheim et al., výše). Bylo prokázáno, že lokální podání GDNF chrání dopaminergní neurony substantia nigra

před axotomií indukovanou (Kearns and Gash, Brain Research, 672: 104 - 111, 1995; Beck et al., Nature, 373: 339 - 341, 1995) nebo neurotoxinem indukovanou degenerací (Sauer et al., Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA, 92: 8935 - 8939, 1995; Tomac et al., Nature 373: 335 - 339, 1995). Kromě toho, bylo ukázáno, že lokální podání GDNF indukuje růst výběžků z dopaminergních neuronů, zvyšuje hladiny dopaminu, noradrenalinu a serotoninu a zlepšuje motoriku (Tomac et al., výše).

Nověji bylo popsáno, že GDNF je silným trofickým faktorem pro mozkové noradrenergní neurony a pro Purkyňovi buňky. Přenos fibroblastů ektopicky exprimujících GDNF bránil degeneraci indukované 6-hydroxydopaminem a způsoboval in vivo fenotyp dospělých noradrenergních neuronů (Arenas et al., Neuron, 15: 1465 - 1473, 1995), zatímco exogenně aplikovaný GDNF účinně způsoboval přežívání a morfologickou diferenciaci Purkyňových buněk in vitro (Mount et al., Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA, 92: 9092 - 9096, 1995). V periferním nervovém systému bylo ukázáno, že GDNF podporuje přežívání neuronů v nodosních, ciliárních a sympatických gangliích, stejně jako přežívání malé populace embryonálních sensorických neuronů v gangliích zadních kořenů (DRG) a v trigeminálním gangliu (Trupp et al., Journal of Cell Biology, 130: 137 - 148, 1995; Ebendal et al., Journal of Neuroscience Research, 40: 276 - 284, 1995; Oppenheim et al., 1995, výše; Yan et al., 1995, výše; Henderson et al., 1994, výše). Bylo také popsáno, že GDNF zvyšuje expresi mRNA vazoaktivního intestinálního peptidu a preprotachykinu-A v kultivovaných neuronech horního krčního ganglia (SCG) a tak způsobuje fenotyp SCG neuronů a indukuje růst svazkům podobných výběžků (Trupp et al., 1995, výše).



Expresse GDNF byla také pozorována v mnoha různých buněčných typech v nervovém systému. V CNS byla expresse GDNF mRNA pozorována pomocí reversní transkriptasové polymerasové řetězové reakce (RT-PCR) jak ve vyvíjejícím se, tak v dospělém krysím striatu, hlavním cíly nigrální dopaminergní inervace, a ve značném množství také v dalších oblastech, včetně hippocampu, kůry, thalamu, septa, mozečku, míchy a prodloužené míchy (Arenas et al., výše; Poulsen et al., *Neuron*, 13: 1245 - 1252, 1994; Springer et al., *Experimental Neurology* 127: 167 - 170, 1994; Stroenberg et al., *Experimental Neurology* 124: 401 - 412, 1993; Schaar et al., *Experimental Neurology* 124: 368 - 371, 1993). U lidí byly GDNF transkripty také detekovány ve striatu, s nejvyššími hladinami v nucleus caudatus a nižšími hladinami v putamenu. Detekovatelné hladiny byly také nalezeny v hippocampu, kůře a míše, ale nikoliv v mozečku (Schaar et al., *Experimental Neurology* 130: 387 - 393, 1994; Springer et al., 1994, výše). Na periférii byla expresse GDNF mRNA také popsána v DRG a SCG u krysy v den 1 po narození, v ischiadickém nervu a v primárních kulturách neonatálních Schwannových buněk (Trupp et al., 1995, výše; Hoffer et al., *Neuroscience Letters*, 182: 107 - 111, 1994; Henderson et al., 1994, výše; Springer et al., 1994, výše). Kromě toho, nedávné studie ukázaly, že GDNF transkripty jsou také ve značné míře exprimovány v periferních non-nervových orgánech, včetně postnatálních varlat a ledvin, embryonálním ochlupení a kůži. Expresse může být detekována v nízkých hladinách v embryonálním svalu, adrenální žláze a končetinových pupenech a v postnatálních plicích, játrech a vaječnicích (Trupp et al., 1995 výše; Henderson et al., 1994, výše). Doposud nicméně není biologický význam non-neuronální exprese GDNF jasný.

Podrobný popis přípravy a charakterizace GDNF proteinových

produktů může být nalezen v U.S. patentové přihlášce č. 08/182183 podané 23.5.1994 a jejích souvisejících přihláškách (viz též PCT/US92/07888, WO 93/06116 podaná 17.9.1992 a Evropská patentová přihláška č. 92921022.7, publikace č. EP 610254), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz. Další GDNF proteinové produkty jsou popsány v související U.S. patentové přihlášce č. 08: 535681 podané 28.9.1995, jejíž objev je zde uveden jako odkaz. Jak je zde použito zahrnuje termín "GDNF proteinový produkt" biologicky aktivní syntetické nebo rekombinantní GDNF proteiny a analogy, stejně jako jeho chemicky modifikované deriváty. GDNF analogy zahrnují deleční varianty jako jsou zkrácené GDNF proteiny, stejně jako inserční nebo substituční varianty GDNF. Také jsou zde zahrnuty GDNF proteiny, které jsou významně homologní s lidským GDNF proteinem.

Terapie GDNF

Terapie GDNF je užitečná v léčbě poškození nervů způsobené stavy, které ohrožují přežívání a/nebo správnou funkci jednoho nebo více typů nervových buněk. Takové nervové poškození se může vyskytnout v důsledku mnoha různých příčin: (1) fyzikálního poškození, které způsobuje degeneraci axonálních výběžků a/nebo těl nervových buněk poblíž místa poškození; (2) přechodného nebo trvalého zpomalení toku krve k částem nervového systému, jako je tomu u mrtvice; (3) záměrné nebo náhodné expozice neurotoxinům, jako jsou chemoterapeutické přípravky (např. cisplatina) pro léčbu nádorů nebo dideoxycytidin (ddC) pro léčbu AIDS; (4) chronických metabolických onemocnění, jako je diabetes nebo dysfunkce ledvin; nebo (5) neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc a amyotrofická laterální sklerosa (ALS), které vznikají v důsledku degenerace specifických



neuronálních populací.

Několik studií naznačilo, že terapie GDNF je zejména užitečná pro léčbu neurodegenerativních stavů jako je degenerace dopaminergních neuronů substantia nigra u Parkinsonovi nemoci. Jediné současné způsoby léčby pro Parkinsonovu nemoc jsou léčby paliativní, zaměřené na zvýšení hladin dopaminu ve striatu. Očekávaným účinkem terapie GDNF není pouze produkce zvýšení dopaminergní neurotransmise v zakončených dopaminergních nervů ve striatu (což povede ke zmírnění příznaků), ale také zpomalení, nebo i zastavení, progresu degenerativního procesu a reparace poškozené nigrostriatální dráhy a obnovení její funkce. GDNF může být také použit pro léčbu jiných forem poškození nebo nesprávné funkce dopaminergních nervových buněk u lidských pacientů. Takové poškození nebo malfunkce se může vyskytovat u schizofrenie a u jiných forem psychos. Jedinou současnou léčbou takových stavů je léčba symptomatická a vyžaduje léky, které působí na dopaminergní receptory nebo na místa vychytávání dopaminu, což je v souladu s názorem, že nesprávná funkce dopaminergních neuronů, které inervují tuto neuronální populaci nesoucí receptory, může být jednou z příčin tohoto onemocnění.

Receptory

Bylo charakterizováno a molekulárně klonováno mnoho receptorů, které zprostředkují vazbu a odpověď na proteinové faktory, včetně receptorů pro insulin, destičkový růstový faktor, epidermální růstový faktor a jeho příbuzné, fibroblastové růstové faktory, různé interleukiny, hematopoetické růstové faktory a ciliární neurotrofický faktor (U.S. 5426177). Výsledky studií naznačují, že některé receptory mohou vázat více (příbuzných) růstových

faktorů, zatímco v jiných případech se může stejný faktor vázat na a aktivovat více (příbuzných) receptorů (například Lupu et al., Science 249: 1552 - 1555, 1990; Dionne et al., EMBO J., 9: 2685 - 2692, 1990; Miki et al., Science 251: 72 - 75, 1991). Většina receptorů může být obecně charakterizována tak, že má extracelulární část nebo doménu odpovědnou za specifickou vazbu proteinového faktoru, transmembránovou doménu, která překlenuje buněčnou membránu a intracelulární doménu, která je často zapojena do iniciace přenosu signálu po vazbě proteinového faktoru na extracelulární část receptoru. Ačkoliv mnoho receptorů je složeno z jednoho polypeptidového řetězce, další receptory jasně vyžadují dvě nebo více separátních podjednotek pro vazbu jejich proteinového faktoru s vysokou afinitou a pro umožnění funkční odpovědi po vazbě (například Hempstead et al., Science 243: 373 - 375, 1989; Hibi et al., Cell 63: 1149 - 1157, 1990).

Extracelulární a intracelulární části daného receptoru mohou mít společné strukturální motivy s regiony korespondujícími jiným receptorům, což ukazuje na evoluční a funkční vztahy mezi různými receptory. Tyto vztahy mohou být často dosti vzdálené a mohou jednoduše odrážet opakované použití určitých obecných doménových struktur. Například, mnoho různých receptorů, které váží nepříbuzné faktory, využívá ve své extracelulární části "imunoglobulinové" domény, zatímco jiné receptory využívají ve svých vazebných regionech pro faktor domény "cytokinových receptorů" (například Akira et al., The FASEB J., 4: 2860 - 2867, 1990). Velké množství receptorů s odlišnými extracelulárními vazebnými doménami (které proto váží různé faktory) obsahuje příbuzné intracytoplasmatické domény kodující tyrosin specifické protein kinasy, které jsou aktivovány v odpovědi na vazbu faktoru (například Ullrich and Schlessinger, Cell, 61: 203 - 212, 1990).

Mechanismy, kterými vazba faktoru aktivuje proces přenosu signálu, jsou málo známé, i v případě tyrosin kinas. Pro jiné receptory, ve kterých koduje intracelulární doména doménu neznámé funkce nebo ve kterých se vazebná složka asociuje s druhým proteinem neznámé funkce (například Hibi et al., Cell, 63: 1149 - 1157, 1990) není aktivace přenosu signálu dobře charakterizována.

Způsob účinku GDNF in vivo není v oboru jednoznačně vyhodnocen, částečně z důvodů absence informací o receptoru pro GDNF. Dvě skupiny nezávisle zjistily, že do striata injikovaný (^{125}I)-značený GDNF může být retrográdně transportován dopaminergními neurony substantia nigra (Tomac et al., Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA, 92: 8274 - 8278, 1995; Yan et al., 1995, výše). Byl také pozorován retrográdní transport (^{125}I)-GDNF míšními motorickými neurony, DRG sensorickými neurony a neurony v B vrstvě retinálního ganglia. Tento fenomen retrográdního transportu může být vždy specificky inhibován 100-násobnými nebo vyššími koncentracemi nezačteného GDNF, což ukazuje na satureovatelný, receptory zprostředkovaný transportní proces. In vitro bylo ukázáno, že GDNF zvyšuje přežívání a navozuje vychytávání dopaminu u kultivovaných dopaminergních neuronů při velmi nízkých koncentracích. Pozorovaná poloviční maximální účinná koncentrace (EC_{50}) GDNF pro tyto neurony je 0,2 až 1,6 pM (Lin et al., výše). Bylo také ukázáno, že GDNF podporuje přežívání disociovaných motorických neuronů při velmi nízkých koncentracích. Popsaná EC_{50} GDNF pro motorické neurony, v rozmezí 5 až 10 fM, je ještě nižší než pro dopaminergní neurony (Henderson et al., 1994, výše).

Dohromady tato pozorování naznačují, že receptor(y) pro GDNF exprivovaný na těchto buňkách má velmi vysokou afinitu pro

ligand. Podobně jako pro členy TGF β rodiny, naznačuje široce diversifikovaná tkáňová distribuce a různé biologické funkce GDNF na různé populace buněk, že mohou existovat různé typy receptorů nebo receptorových komplexů pro GDNF. Saturovaný rovnovážný stav a kompetitivní vazba (^{125}I) GDNF na E10 kuřecí sympatické neurony ukázaly, že tyto neurony exprimují vazebná místa pro GDNF, která se liší od míst pozorovaných na dopaminergních a motorických neuronech. Poloviční maximální saturační koncentrace a poloviční maximální inhibiční koncentrace GDNF na těchto vazebných místech je v rozmezí od 1 do 5 nM (Trupp et al., 1995, výše). Podobně, EC_{50} GDNF v podporování přežívání sympatických neuronů z P1 krysích SCG byla také popsána v řádu nanomolů (Trupp et al., 1995, výše).

Pro lepší pochopení mechanismů, kterými aktivuje GDNF přenos signálu pro způsobení jeho účinků na buňky bude výhodné identifikovat receptory, které zprostředkují vazbu a odpověď na tento proteinový faktor. Pro terapii GDNF bude také výhodné identifikovat a umožnit produkci dalších molekul, které umožní zlepšit GDNF signální přenos. Kromě toho, identifikace proteinového receptoru pro GDNF umožní významné aplikace v diagnostice, například pro určení jedinců, pro které bude přínosná terapie GDNF proteinem. Dále, proteinový receptor pro GDNF může být klíčovou složkou testu pro identifikaci dalších molekul, které se vážou na receptor a vedou k požadované biologické aktivitě.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje sekvence nukleových kyselin, které kodují proteinový receptor pro neurotrofický faktor mající

aminokyselinovou sekvenci jak je uvedena na obrázku 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4), stejně jako biologicky aktivní analogy. Proteinový receptor pro neurotrofický faktor a proteinové produkty podle předkládaného vynálezu jsou zde označeny jako (GDNFR) proteinový receptor pro neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNFR) a proteinové produkty. Nové GDNFR jsou funkčně charakterizovány schopností specificky vázat GDNF s vysokou afinitou a působit jaké část molekulového komplexu, který zprostředkuje nebo zvyšuje signální přenos účinků GDNF. GDNFR proteinové produkty jsou typicky poskytnuty jako solubilní receptorový protein a jsou poskytnuty ve významně přečištěné formě.

V jednom aspektu předkládaný vynález poskytuje produkci GDNFR proteinových produktů rekombinantními technikami genového inženýrství. V alternativním provedení jsou GDNFR proteiny syntetizovány chemickými technikami, nebo kombinací rekombinantních a chemických technik.

V jiném aspektu předkládaného vynálezu mohou být GDNFR proteiny vyrobeny v glykosylované nebo v neglykosylované formě. Deriváty GDNFR proteinu typicky obsahují připojení GDNFR proteinu na polymer rozpustný ve vodě. Například, GDNFR protein může být konjugován na jednu nebo více molekul polyethylenglykolu pro snížení srážení GDNFR proteinového produktu ve vodném prostředí.

Ještě jiný aspekt předkládaného vynálezu obsahuje různé polynukleotidy kodující GDNFR proteiny. Tyto sekvence nukleových kyselin jsou použity v expresi GDNFR v eukaryotických a prokaryotických hostitelských buňkách, kde expresní produkt nebo jeho derivát je charakterizován schopností vázat GDNF a tak



tvořit komplexy schopné zprostředkování aktivity GDNF, jako je zvýšení vychytávání dopaminu dopaminergními buňkami. Polynukleotidy mohou být také použity v aplikacích buněčné terapie nebo genové terapie. Vhodné sekvence nukleových kyselin zahrnují ty, které jsou specificky uvedeny na obrázcích stejně jako degenerované sekvence, přirozené alelické variace a modifikované sekvence podle předkládaného vynálezu.

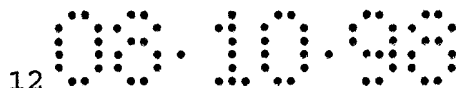
Příklady sekvencí nukleových kyselin zahrnují sekvence kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci ukázanou na obrázcích 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4) schopnou tvorby komplexů s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkování buněčné odpovědi na GDNF a jejich biologicky ekvivaletní analogy. Takové sekvence zahrnují: (a) sekvence uvedené na obrázku 1 (SEQ ID NO: 1) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁵ nebo na obrázku 3 (SEQ ID NO: 3) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁸ kodující receptor pro neurotrofický faktor (GDNFR) schopný tvorby komplexů s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkování buněčné odpovědi na GDNF; (b) sekvenci nukleové kyseliny, která (1) hybridizuje s komplementární sekvencí (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou; a (c) sekvenci nukleové kyseliny, která i přes degeneraci genetického kodu může hybridizovat s komplementární sekvencí (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou. Také jsou zde popsány vektory takových sekvencí nukleových kyselin, ve kterých jsou sekvence typicky operativně navázány na jeden nebo více operačních elementů schopných způsobení amplifikace nebo exprese sekvence nukleových kyselin. Také jsou uvedeny hostitelské buňky obsahující takové vektory.



Typicky je hostitelská buňka vybrána ze savčích buněk a bakteriálních buněk, jako jsou COS-7 buňky nebo E. coli, v příslušném pořadí.

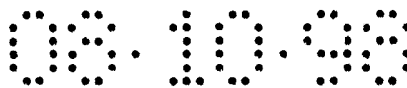
Další aspekt předkládaného vynálezu obsahuje vektory obsahující polynukleotid kodující GDNFR proteiny operativně navázaný na amplifikační a/nebo kontrolní expresní sekvence. Jak prokaryotická, tak eukaryotická hostitelská buňka může být stabilně transformována nebo transfektována takovými vektory tak, aby exprivovala GDNFR proteiny. Předkládaný vynález dále obsahuje rekombinantní produkci GDNFR proteinu, při které jsou takové transformované nebo transfektované hostitelské buňky kultivovány ve vhodném živném mediu a GDNFR exprivovaný těmito buňkami je, volitelně, izolován z hostitelských buněk a/nebo živného media. Předkládaný vynález dále obsahuje použití polynukleotidů kodujících GDNFR a vektorů obsahujících takové polynukleotidy v genové terapii nebo v buněčné terapii.

Hostitelská buňka může být vybrána tak, aby byla vhodná pro implantaci u lidí, při které implantované buňky exprivují a secernují receptor pro neurotrofický faktor podle předkládaného vynálezu. Hostitelská buňka může být také uzavřena v semipermeabilní membráně vhodné pro implantaci u lidí. Hostitelská buňka může být transformována nebo transfektována ex vivo. Příklady prostředků pro léčbu nervového poškození zahrnují: (a) semipermeabilní membránu vhodnou pro implantaci; a (b) buňky obalené membránou, kde buňky exprivují a secernují receptor pro neurotrofický faktor jak je zde popsán. Membrána je vybrána z materiálu, který je permeabilní pro proteinový receptor pro neurotrofický faktor, ale který je nepropustný pro materiály škodlivé pro uzavřené buňky.



Také jsou popsány způsoby pro rekombinantní produkci receptoru pro neurotrofický faktor podle předkládaného vynálezu. Příkladné způsoby obsahují: (a) kultivaci hostitelské buňky obsahující sekvenci nukleové kyseliny kodující receptor pro neurotrofický faktor podle předkládaného vynálezu, jako je aminokyselinová sekvence zobrazená na obrázcích 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4) schopná tvorby komplexů s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a schopná zprostředkovat biologickou odpověď na GDNF, nebo její biologicky ekvivalentní analogy; (b) udržování uvedených hostitelských buněk v podmínkách vhodných pro expresi uvedeného receptoru pro neurotrofický faktor uvedenou hostitelskou buňkou; a (c) volitelně, izolaci uvedeného receptoru pro neurotrofický faktor exprimovaného uvedenou hostitelskou buňkou. Hostitelská buňka může být prokaryotická buňka nebo eukaryotická buňka. Pokud je použita bakteriální exprese, pak může způsob dále obsahovat krok znovusložení receptoru pro neurotrofický faktor.

Předkládaný vynález dále obsahuje izolovaný a přečištěný protein obsahující aminokyselinovou sekvenci jak je zobrazena na obrázcích 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4) schopnou tvorby komplexů s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a schopnou zprostředkovat biologickou odpověď na GDNF, a její biologicky ekvivalentní analogy. Příklady analogů zahrnují, ale nejsou omezeny na, proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci Ser¹⁸ až Pro⁴⁴⁶, Asp²⁵ až Leu⁴⁴⁷ a Cys²⁹ až Cys⁴⁴², jak jsou zobrazeny na obrázku 2 (SEQ ID NO: 2), stejně jako proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci Met¹⁷ až Pro⁴⁴⁹ a Cys²⁹ až Cys⁴⁴³ jak jsou zobrazeny na obrázku 4 (SEQ ID NO: 4). Proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být glykosylované nebo neglykosylované a mohou být produkovány



rekombinantní technologií nebo chemickou syntesou. Předkládaný vynález dále obsahuje sekvence nukleových kyselin kodující receptorový protein obsahující takové aminokyselinové sekvence.

Také jsou zde popsány farmaceutické přípravky obsahující proteinový receptor podle předkládaného vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem. Pro usnadnění výroby, skladování, manipulace podání a/nebo účinnosti může být použito mnoho jiných materiálů pro formulace.

Jiný aspekt předkládaného vynálezu obsahuje terapeutické použití GDNFR genů a proteinů. Například, cirkulující nebo solubilní GDNFR proteinový produkt může být použit samostatně nebo spolu s GDNF pro léčbu onemocnění nebo poranění nervového systému tím, že zvyšuje aktivitu transmembránové signalizace GDNF. Tak mohou být proteiny a farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu použity pro léčbu nesprávně fungujících dopaminergních nervových buněk Parkinsonovi nemoci, Alzheimerovi nemoci a amyotrofické laterální sklerosy. Alternativně, rekombinantní GDNFR gen může být insertován do buněk nebo do tkání, které budou mít zisk ze zvýšené sensitivity k GDNF, jako jsou motorické neurony u pacientů trpících amyotrofickou laterální sklerosou. V ještě jiném provedení může být GDNFR použit pro blokování aktivity GDNF v případech, kde se aktivita GDNF považuje za škodlivou. GDNFR může být použit k potvrzení toho, že pozorované účinky GDNF jsou způsobeny GDNFR.

V ještě jiném aspektu vynálezu mohou být GDNFR sondy použity k identifikaci buněk a tkání, které reagují na GDNF za normálních okolností nebo za patologických stavů. Alternativně, sondy mohou být použity pro detekci změn v expresi GDNFR u pacientů trpících



onemocněními spojenými s GDNFR.

V ještě jiném provedení mohou být GDNFR sondy, včetně nukleokyselinových, stejně jako protilátkových sond, použity pro identifikaci molekul příbuzných GDNFR. Například, předkládaný vynález poskytuje takové molekuly, které tvoří komplexy s GDNFR a tak se účastní na funkci GDNFR. Jako jiný příklad, předkládaný vynález poskytuje receptorové molekuly, které jsou homologní nebo antigenně zkříženě reaktivní, ale ne identické, s GDNFR.

Předkládaný vynález také poskytuje vývoj jak vazebných, tak funkčních testů pro GDNF na podkladě receptoru. Například, testovací systém pro detekování aktivity GDNF může obsahovat buňky, které exprivují vysoké hladiny GDNFR a které jsou proto extrémně sensitivní i na velmi nízké koncentrace GDNF nebo GDNF-podobných molekul. V ještě jiném provedení může být solubilní GDNFR použit pro vazbu nebo detekci GDNF nebo GDNF-podobných molekul.

Kromě toho, předkládaný vynález poskytuje experimentální modelové systémy pro studium fyziologické role GDNF. Takové systémy obsahují testy obsahující anti-GDNFR protilátky nebo oligonukleotidové sondy, stejně jako zvířecí modely, jako jsou transgenní zvířata exprivující vysoké hladiny GDNFR a proto hypersensitivní na GDNFR nebo zvířata upravená za použití technologie embryonálních kmenových buněk, u kterých byly endogenní geny pro GDNFR deletovány z genomu. Anti-GDNFR protilátky se budou vázat na peptidovou část proteinových receptorů pro neurotrofický faktor. Protilátky zahrnují monoklonální a polyklonální protilátky. Alternativně, pro detekci mohou být na DNFR protein připojeny imunologické smyčky, proti

kterým již existují protilátky. Takové smyčky zahrnují, ale nejsou omezeny na, Flag (IBI/Eastman Kodak) a myc sekvence. Další smyčkové sekvence jako je polyhistidinová sekvence mohou být také použity pro detekci a přečištění na kolonách chelatujících kovy.

Další aspekty a výhody předkládaného vynálezu budou odborníkům v oboru zřejmé z následujícího popisu, který upřesňuje provedení předkládaného vynálezu.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 znázorňuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO: 1) kodující receptor pro neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNFR). Aminokyselinová sekvence kompletního GDNFR proteinu je kodovaná nukleovými kyselinami 540 až 1934.

Obrázek 2 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO: 2) kompletního lidského GDNFR proteinu.

Obrázek 3 znázorňuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO: 3) kodující krysí GDNFR. Aminokyselinová sekvence kompletního GDNFR proteinu je kodovaná nukleovými kyselinami 302 až 1705.

Obrázek 4 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO: 4) kompletního krysího GDNFR proteinu.

Obrázek 5 znázorňuje seřazení a srovnání částí GDNFR cDNA sekvencí produkovaných v různých klonech, stejně jako konsenzuální sekvence pro lidský GDNFR.



Obrázek 6 znázorňuje identifikaci Neuro-2A odvozené buněčné linie exprivující GDNFR.

Obrázky 7A a 7B znázorňují výsledky rovnovážné vazby (^{125}I)GDNF na buňky exprivující GDNFR.

Obrázek 8 znázorňuje výsledky chemické zkřížené vazby (^{125}I)GDNFR na GDNFR a Ret exprivované v buňkách exprivujících GDNFR.

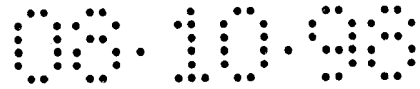
Obrázek 9 znázorňuje výsledky indukce c-Ret autofosforylace způsobené GDNF v buňkách exprivujících GDNFR.

Obrázek 10 znázorňuje výsledky indukce c-Ret autofosforylace způsobené GDNF a solubilním GDNFR.

Obrázek 11 znázorňuje výsledky indukce c-Ret autofosforylace způsobené Ret-Fc fúsním proteinem.

Obrázek 12 znázorňuje výsledky indukce c-Ret autofosforylace způsobené GDNF v motorických neuronech.

Obrázek 13 znázorňuje model pro GDNF signalizaci zprostředkovanou GDNFR a Ret.



Neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNF) je silným neurotrofickým faktorem vykazujícím široké spektrum biologických aktivit na různé typy buněk z centrálního i periferního nervového systému. Je to glykosylovaný, disulfidově vázaný dimer, který je vzdáleně příbuzný (méně než 20% homologie) rodině transformačního růstového faktoru β (TGFB). Schopnost GDNF zvyšovat přežívání dopaminergních neuronů a dalších neuronových populací demonstruje jeho terapeutický potenciál pro léčbu Parkinsonovi nemoci, stejně jako pro jiné formy nervového poškození nebo chybné funkce.

Oproti rozsáhlým studiím týkajícím se distribuce a bioaktivity GDNF neexistovaly žádné zprávy týkající se identifikace receptoru nebo receptorů, které zprostředkují vazbu GDNF na buňky a tak přenášení extracelulární signál a zprostředkují buněčnou odpověď. Předkládaný vynález je založen na objevu vysokoafinitního receptoru poprvé objeveného na povrchu kultivovaných retinálních buněk od postnatálních krys. Tyto receptory měly vazebnou afinitu pro GDNF srovnatelnou s afinitou receptorů nalezených v dopaminergních a motorických neuronech; dopaminergních neuronech středního mozku (Lin et al., 1993, výše; Sauer et al., 1995, výše; Kearns and Gash, 1995, výše; Beck et al., 1995, výše; Tomac et al., 1995, výše), faciálních a míšních motorických neuronech (Li et al., 1995, výše; Oppenheim et al., 1995, výše; Yan et al., 1994, výše; Zurn et al., 1994, výše; Henderson et al., 1994, výše). Receptorová molekula byla pojmenována GDNF receptor (GDNFR), protože je první známou složkou receptorového systému pro GDNF. Předkládaný vynález také poskytuje první popis expresního klonování a charakterizace GDNFR proteinu. Buňky modifikované tak, aby exprimovaly rekombinantní receptor, vážou GDNF s vysokou afinitou.



Za použití testu vychytávání dopaminu a (^{125}I) GDNF vazby na kultivované buňky byly vysoce afinitní receptory pro GDNF detekovány na povrchu krysích fotoreceptorových buněk. Jak je dále popsáno v příkladech, studium fotoreceptorových buněk vedlo k izolaci cDNA klonu expresním klonováním GDNF receptoru. Sekvence nukleových kyselin pro GDNFR koduje protein o 468 aminokyselinách s 31 cysteinovými zbytky a třemi potenciálními N-glykosylačními místy. Dále, sekvence nukleových kyselin z krysího cDNA klonu byla použita pro izolaci lidského homologu, který je, jak bylo zjištěno, téměř identický s krysím receptorem na aminokyselinové úrovni. Lidská GDNFR cDNA sekvence koduje protein o 465 aminokyselinách s konzervativním umístěním všech cysteinových zbytků a potenciálních N-glykosylačních míst vzhledem ke krysímu receptoru. Tento vysoký stupeň konzervace primární sekvence ukazuje na významnou roli tohoto receptoru v biologickém účinku GDNF.

Jak bylo uvedeno výše, většina receptorů má tři hlavní domény: extracelulární nebo povrchovou doménu odpovědnou za specifickou vazbu proteinového faktoru; transmembránovou doménu, která překlenuje buněčnou membránu; a intracelulární nebo cytoplasmatickou doménu, které je typicky zapojena v iniciaci přenosu signálu po vazbě proteinového faktoru na extracelulární doménu. Bylo nicméně určeno, že GDNFR není příbuzný z hlediska sekvence nebo strukturálních charakteristik jakémukoliv známému proteinu (jako jsou konsenzuální sekvence nacházené v receptorových kinasách nebo v cytokinových receptorech), nemá cytoplasmatickou doménu, nemá C-koncové nabitě zbytky charakteristické pro transmembránovou doménu a je zakotven v buněčné membráně glykosy-fosfatidylinositolovou vazbou, jak je podrobněji popsáno dále. Ačkoliv absence intracelulární



katalytické domény ukazuje na přímou roli v transmembránové signalizaci, vysoká vazebná afinita a silná evoluční konzervace sekvence naznačují, že tento receptor byl významný pro funkci GDNFR.

GDNFR nemá cytoplasmatickou doménu a proto se soudilo, že tento receptor musí účinkovat ve spojení s jednou nebo více pomocnými molekulami, které mějí úlohu v transmembránové signalizaci. potom bylo zjištěno, že transgenní myši, které nemají gen pro GDNF, umírají a nemají ledviny. Transgenní myši, které nemají gen pro c-ret protoonkogen (Schuchard et al., Nature 367: 380 - 383, 1994) mají podobný fenotyp. c-ret protoonkogen koduje receptorovou tyrosin kinasu (RTK), jejíž normální funkce nebyla dosud určena. Všechny RTk mají podobnou topologii: mají extracelulární vazebnou doménu pro ligand, transmembránovou doménu a cytoplasmatický segment obsahující katalytickou protein tyrosin kinasovou doménu. Vazba ligandu vede k aktivaci kinasové domény a k fosforylaci specifických substrátů v buňce, které zprostředkují intracelulární signalizaci. Předkládaný vynález obsahuje objev toho, že solubilní forma GDNFR může být použita ke zprostředkování vazby GDNF na c-ret protoonkogen a tak může vyvolat buněčnou odpověď na GDNF, stejně jako modifikovat jeho buněčnou specificitu.

Podobné typy, nazývané "receptor alfa" složky, umožňují vazebnou specificitu pro ligand, ale sami o sobě nemají kapacitu pro přenos signálu. Takové složky jsou nacházeny v receptorových systémech pro ciliární neurotrofický faktor (CNTF) a interleukin 6 (IL-6). Podobně jako GDNFR, a v kontrastu k receptoru pro IL-6, váže CNTF receptor svůj ligand s vysokou afinitou, má hydrofobní C konec, nemá cytoplasmatickou doménu a je zakotven v buněčné membráně GPI vazbou (Davis et al., 1991). V komplexu pro



zprostředkování přenosu signálu se váže CNTF nejprve na CNTF receptor, což vytvoří komplex, který je schopen vazby na gp130. Tento inaktivní komplex se potom váže na LIF receptor za vzniku aktivního signalizačního komplexu (Davis et al., Science, 260: 1805 - 1807, 1993). Stejně jako v předkládaném vynálezu musí být CNTF receptor (vazebná složka specifická pro ligand) přítomen pro přenos signálu, ale nemusí být vázán na membránu (Economides et al., Science 270: 1351 - 1353, 1995).

Jak je popsáno dále, GDNFR protein může být zakotven na buněčném povrchu, nebo může být v solubilní formě. V každém případě tvoří GDNFR protein ligandový komplex s GDNF a ligandový komplex se váže na receptor na buněčném povrchu pro zprostředkování intracelulární signalizace. Proto může být solubilní forma GDNFR použita pro potenciaci účinku GDNF a/nebo pro modifikaci jeho buněčné specificity.

GDNFR není příbuzný žádnému známému receptoru. Neexistují žádné jasné odpovídající sekvence v GenBank a Washington University Merck databázích pro příbuzné sekvence. Exprivovaná sekvence smyčky (EST) nalezená ve Washington University Merck EST databázi vykazuje 75% homologii s malou částí kodujícího regionu GDNFR (přibližně 340 nukleotidů z 521 nukleotidů sekvence generované z 5' konce klonu). Tento klon (GenBank řídůstkové č. H12981) byl izolován z oligo-dT "primed" lidské mozkové knihovny a byl klonován přímo do Lafmid BA vektoru (Hillier, L., et al, nepublikovaná data). 3' konec H12981 klonu byl sekvencován, ale nevykazoval homologii s žádnou částí GDNFR. Přítomnost homologie mezi tímto H12981 klonem a GDNFR v krátkém regionu, která potom vymizela, naznačuje, že klon H12981 představuje nesestřižený transkript nebo klonovací artefakt, spíše než bona fide cDNA



transkript.

Tak předkládaný vynález umožňuje klonování GDNFR proteinu tím, že poskytuje způsob pro selekci cílových buněk, které exprivují GDNFR. Tím, že poskytuje prostředky pro obohacení GDNFR kodujících sekvencí předkládaný vynález dále umožňuje přečištění GDNFR proteinu a přímé klonování GDNFR kodující DNA. Předkládaný popis aminokyselinových sekvencí a sekvencí nukleových kyselin pro GDNFR poskytuje informaci potřebnou pro reprodukování těchto entit, stejně jako různých GDNFR analogů. S touto informací může být GDNFR proteinový produkt izolován a generován jakýmikoliv prostředky známými odborníkům v oboru. Jsou popsány různé prostředky pro rekombinantní nebo syntetickou produkci GDNFR proteinu.

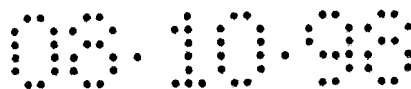
Jak je zde použito zahrnuje termín "GDNFR proteinový produkt" biologicky aktivní přirozený, syntetický nebo rekombinantní GDNFR, analogy GDNFR (t.j. GDNFR homology a varianty včetně inserčních, substitučních a delečních variant) a jeho chemicky modifikované deriváty. GDNFR analoga jsou významně homologní s aminokyselinovými sekvencemi pro GDNFR uvedenými na obrázkách 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4).

Termín "biologicky aktivní", jak je zde použit, znamená, že GDNFR proteinový produkt vykazuje vysoce afinitní vazbu na GDNF a že zprostředkuje nebo zvyšuje signální přenos indukovaný GDNF. Odborníci v oboru mohou podele předkládaného vynálezu určit, zda má GDNFR polypeptidový analog v podstatě stejnou biologickou aktivitu jako GDNFR proteinové produkty uvedené na obrázkách 2 a 4.



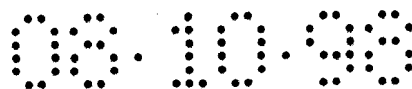
Termín "významně homologní" aminokyselinová sekvence, jak je zde použit, označuje aminokyselinovou sekvenci mající "podobnost" nebo homologii s aminokyselinovými sekvencemi GDNFR uvedenými na obrázcích 2 a 4, takže homologní sekvence mají biologickou aktivitu nebo funkci podobnou aktivitě nebo funkci popisované pro tyto GDNFR aminokyselinové sekvence. Odborníkům v oboru bude jasné, že relativně mnoho jednotlivých nebo skupinových aminokyselinových zbytků může být zaměněno, pozičně vyměněno (například reversně uspořádáno nebo znovuuspořádáno) nebo úplně deletováno v aminokyselinové sekvenci bez ovlivnění trojrozměrného uspořádání nebo aktivity molekuly. Takové modifikace budou odborníkům v oboru jasné po prostudování následujícího popisu. Identifikace a prostředky pro získání takových modifikovaných sekvencí jsou podrobněji popsány dále. Je výhodné, aby stupeň homologie významně homologního proteinu (peptidu) byl rovný nebo přesahoval 70% (t.j. v rozmezí od 70% do 100% homologie). Proto, "významně homologní" GDNFR aminokyselinové sekvence mají stupeň homologie vyšší než nebo rovný 70% vzhledem k aminokyselinovým sekvencím uvedeným v SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Lépe může být stupeň homologie vyšší než nebo rovný 85%. Ještě lépe může být stupeň homologie vyšší než nebo rovný 90%, a nejlépe může být stupeň homologie vyšší než nebo rovný 95%.

Procento homologie jak je zde popsáno je počítáno jako procento aminokyselinových zbytků v jedné proteinové sekvenzi, které lze přiřadit k podobným aminokyselinovým zbytkům ve druhé proteinové sekvenzi. Proto, v případě GDNFR homologie, může být stupeň homologie sekvence určen optimálním seřazením aminokyselinových zbytků srovnávané molekuly k aminokyselinovým zbytkům referenčního GDNFR polypeptidu, jak je polypeptid ukázaný



v SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4 nebo jako jsou ty, které jsou kodované sekvencemi nukleových kyselin ukázanými na obrázcích, s maximalizací odpovídajících párů mezi oběma sekvencemi. Odborníkům v oboru bude jasné, že takové přiřazení může obsahovat vhodné konzervativní substituce aminokyselinových zbytků a že nebude věnován zřetel zkrácením a vnitřním delecím nebo insercím ve srovnávané sekvenci, pomocí vození mezer, jak je potřeba; viz například Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, svazek V, kde se uvádí, že pro provedení přiřazení mohou být vloženy průměrně tři nebo čtyři mezery na délku 100 aminokyselin (str. 124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., 1972; tyto objevy jsou zde uvedeny jako odkaz). Po přiřazení je procento určeno jako počet správně přiřazených zbytků ve srovnávaném polypeptidu děleno celkovým počtem zbytků ve srovnávaném polypeptidu. Dále je předpokládáno, že GDNFR sekvence podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro vytvoření části fúsního proteinu nebo chimerického proteinu, který má alespoň částečnou GDNFR aktivitu. Seřazení a homologie takového proteinu bude určena za použití té části fúsního proteinu nebo chimerického proteinu, které se vztahuje k GDNFR aktivitě.

Zdroje pro takové významně homologní GDNFR proteiny zahrnují GDNFR proteiny od jiných savců, u kterých se očekává, že mají vysoký stupeň homologie s lidským GDNFR proteinem. Například, stupeň homologie mezi krysím a lidským GDNFR proteinem zde popsány je okolo 93%. Významně homologní GDNFR proteiny mohou být izolovány od takových savců pomocí zkřížené reaktivity s protilátkami ke GDNFR aminokyselinovým sekvencím podle SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Alternativně mohou být exprivovány pomocí sekvencí nukleových kyselin, které jsou izolovány pomocí



hybridizace s genem nebo segmenty genu kodujícího GDNFR se SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4. Vhodné hybridizační podmínky jsou podrobněji popsány dále.

Nové GDNFR proteinové produkty jsou typicky izolovány a přečištěny za zisku GDNFR proteinových produktů, které jsou významně prosté nežádoucích substancí, které by mohly ohrozit použití presentovaných polypeptidů pro zamýšlené účely. Například, výhodné GDNFR proteinové produkty mohou být významně prosté jiných lidských (například non-GDNFR) proteinových materiálů nebo patologických agens. Výhodně jsou GDNFR proteinové produkty asi 80% čistoty vzhledem k jiným proteinům, které mohou být přítomny díky technice produkce použité při výrobě GDNFR proteinového produktu. Lépe jsou GDNFR proteinové produkty asi 90% čistoty vzhledem k jiným proteinům, ještě lépe asi 95% čistoty vzhledem k jiným proteinům a nejlépe > 98% čistoty vzhledem k jiným proteinům. Kromě toho, předkládaný vynález poskytuje jedinečnou výhodu poskytnutím polynukleotidových sekvencí pro výrobu homogenních GDNFR proteinů.

Je uvedeno mnoho GDNFR variant, včetně adičních, substitučních a delečních variant. Například, serie delečních variant mohou být vyrobeny odstraněním jednoho nebo více aminokyselinových zbytků z amino a/nebo karboxy konce GDNFR proteinu. Za použití pravidel pro předpovězení štěpení signálního peptidu jak je popisuje von Heijne (von Heijne, Nucl. Acids Research 14: 4683 4690, 1986), je první aminokyselino zbytek GDNFR proteinu, který se může účastnit vazby na GDNF, Ser¹⁸, podle číslování kompletní aminokyselinové sekvence lidského GDNFR na obrázku 2 (SEQ ID NO: 2). Aminokyselinové zbytky Met¹ až Ser¹⁸ jsou v amino-terminálním hydrofobním regionu, který je pravděpodobně částí sekvence



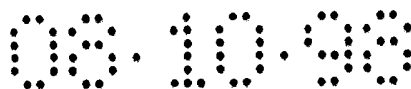
signálního peptidu, a proto nejsou obsaženy ve zralé formě receptorového proteinu. Podobně, posledním aminokyselinovým zbytkem GDNFR proteinu, který je pravděpodobně nezbytný pro vazbu GDNF, je Ser⁴⁴⁶. Aminokyselinové zbytky Leu⁴⁴⁷ až Ser⁴⁶⁵ jsou v karboxyterminálním hydrofobním regionu, který způsobuje GPI vazbu proteinu na buněčný povrch. Proto se předpokládá, že kterýkoliv ze zbytků Met¹ až Ser¹⁸ a/nebo Leu⁴⁴⁷ až Ser⁴⁶⁵ (podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2)) může být odstraněn z proteinu bez ovlivnění vazby GDNF na GDNFR protein, což ponechává "základní" sekvenci Ala¹⁹ až Pro⁴⁴⁶. Za použití známých technik analýzy se dále předpokládá, že N-terminální zkrácení může zahrnovat odstranění jednoho nebo více aminokyselinových zbytků nad a včetně Gly²⁴. Proto, zkrácené analogy GDNFR mohou také obsahovat delece jednoho nebo více aminokyselinových zbytků z jednoho nebo obou konců, takže aminokyselinová sekvence Asp²⁵ až Pro⁴⁴⁶ nebo Leu⁴⁴⁷ tvoří základ pro základní molekulu. Jsou předpokládány další GDNFR analogy obsahující aminokyselinové zbytky Ser¹⁸ až Pro⁴⁴⁹, podle GDNFR aminokyselinové sekvence na obrázku 4 (SEQ ID NO: 4), t.j. mající deleci jednoho nebo více aminokyselinových zbytků z jednoho nebo obou konců obsahujících hydrofobní regiony znázorněné jako aminokyselinové zbytky Met¹ až Ser¹⁸ a/nebo Pro⁴⁴⁹ až Ser⁴⁶⁸.

Kromě toho, předpokládá se, že jeden nebo více aminokyselinových zbytků může být odstraněn z jednoho nebo obou amino a karboxy konců, dokud se nedojde k prvnímu a k poslednímu cysteinovému zbytku kompletní sekvence. Je výhodné zachovat cysteinové zbytky pro správnou intramolekulovou vazbu GDNFR proteinu. Jak je zobrazeno v kompletní aminokyselinové sekvenci lidského GDNFR na obrázku 2 (SEQ ID NO: 2), může být jakýkoliv jeden nebo všechny aminokyselinové zbytky z Met¹ až Asp²⁸

odstraněn z aminokonce bez odstranění prvního cysteinového zbytku, kterým je Cys²⁹. Obdobně může být jakýkoliv jeden nebo všechny aminokyselinové zbytky z Gly⁴³³ až Ser⁴⁶⁵ odstraněn z karboxykonce bez odstranění posledního cysteinového zbytku, kterým je Cys⁴⁴². Mohou být vyrobeny další GDNFR analogy za použití aminokyselinových zbytků Cys²⁹ až Cys⁴⁴³, podle GDNFR aminokyselinové sekvence na obrázku 4 (SEQ ID NO: 4), t.j. mající delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků z terminálních regionů znázorněných jako aminokyselinové zbytky Met¹ až Asp²⁸ a/nebo Ser⁴⁴⁴ až Ser⁴⁶⁸.

Odborníkům v oboru bude jasné, že, ze stejných důvodů, se předpokládá, že tyto identifikované aminokyselinové zbytky mohou být nahrazeny, spíše než deletovány, bez ovlivnění funkce GNFR proteinu. Alternativně mohou být tyto identifikované aminokyselinové zbytky modifikovány intra-zbytkovými insercemi nebo terminálními adicemi bez ovlivnění funkce GNFR proteinu. V ještě jiném provedení může být vytvořena kombinace jedné nebo více delecí, substitucí a adicí.

Předkládané GNFR proteiny nebo nukleové kyseliny mohou být použity pro způsoby léčby, nebo pro způsoby pro výrobu léčiv pro léčbu. Taková léčba je pro stavy charakterizované nadměrnou produkcí GNFR protein, při kterých může předkládaný GDNFR, zejména v soubilní formě, být použit pro tvorbu komplexů a tedy pro inaktivaci GDNFR proteinu. Taková léčba může být provedena přípravou solubilního receptoru (například za použití GDNF vazebné domény) nebo přípravou populace buněk obsahujících takový GDNFR, a transplantací takových buněk jedinci, který potřebuje takovou léčbu. Presentované GDNFR proteinové produkty mohou být také použity pro léčbu jedinců majících defektní GDNF receptory.



Například, mohou být léčeni jedinci mající defektní GDNFR za použití přípravy a podání solubilního receptoru, nebo za použití přípravy populace buněk obsahující takový nedefektní GDNFR a transplatace takových buněk o jedince. Nebo, jedinec může mít inadequate počet GDNF receptorů a buňky obsahující takové receptory mohou být transplantovány pro zvýšení počtu GDNFR u jedince. Takové kompozice mohou být použity spolu s podáním GDNF. Také se předpokládá použití GDNFR proteinového produktu v léčbě stavů reagujících za aktivaci c-ret receptorové tyrosin kinasy.

V ještě jiném aspektu předkládaného vynálezu je další výhodou nových kompozic použití GDNFR pro stabilizaci farmaceutických přípravků obsahujících GDNF protein. V ještě jiném aspektu předkládaného vynálezu může být GDNFR použit pro vyšetřování sloučenin s antagonistickou aktivitou.

Další aspekty a výhody předkládaného vynálezu budou odborníkům v oboru zřejmé, například, další použití zahrnují nové testovací systémy, transgenní zvířata a produkci protilátek.

Pokusné modely

Předkládaný vynález poskytuje testovací systémy, ve kterých může být aktivita GDNF, nebo aktivity podobné aktivitě GDNF vzniklé působením peptidových nebo nepeptidových sloučenin, detekována měřením vyvolané fyziologické odpovědi v buňkách nebo v buněčných liniích, které exprivují GDNFR molekuly podle předkládaného vynálezu. Fyziologická odpověď může zahrnovat jakékoliv biologické účinky GDNF, včetně, ale bez omezení, vychytávání dopaminu, prodlužování neuritů, zlepšené přežívání buněk a růst, stejně jako transkripční aktivaci jistých sekvencí



nukleových kyselin (například promotorových/enhancerových elementů, stejně jako strukturálních genů), zpracování související s GDNF, translaci nebo fosforylaci a indukci sekundárních procesů odpovědi na procesy přímo nebo nepřímo indukované GDNF, nyní málo známé.

Například, může být vytvořen modelový systém, který může být použit pro studium účinků nadměrné aktivity GDNF. V takovém systému může být odpověď buněk na GDNF zvýšena vložением zvýšeného počtu GDNFR do buněk modelového systému, ve srovnání s buňkami, které nebyly takto modifikovány. Může být také vyvinut systém pro selektivní dodání zvýšeného počtu GDNFR buňkám, které normálně exprivují GDNFR. Pro zajištění exprese GDNFR může být gen pro GDNFR umístěn pod kontrolou vhodné promotorové sekvence. Může být žádoucí umístění genu pro GDNFR pod kontrolu konstitutivního a/nebo tkáňově specifického promotoru (včetně, ale bez omezení, promotoru pro neuron specifickou enolasu, neurofilament a tyrosin hydroxylasu), indukovatelného promotoru (jako je promotor pro methalothionein), UV aktivovaného promotoru v dlouhé terminální opakující se sekvenci viru lidské imunodeficiencie (Valeri et al., 1988, Nature, 333: 78 - 81), nebo CMV promotoru (jak je ten, který je obsažen v pCMX, dále) nebo vývojového regulačního promotoru.

Zvýšením počtu buněčných GDNFR může být zvýšena odpověď na endogenní GDNF. Pokud modelový systém obsahuje málo nebo žádný GDNF, může být GDNF přidán do systému. Může být také žádoucí přidání dalšího GDNF doo modelového systému pro hodnocení účinků nadměrné GDNF aktivity. Nadměrná exprese GDNF (nebo sekrece GDNF) může být jednou metodou pro studium účinků zvýšených hladin GDNF na buňky již exprivující GDNFR.

Terapie za použití GDNFR

V jiném aspektu, u některých stavů může být výhodné zvýšení reaktivity na GDNF. Může být proto výhodné zvýšení počtu nebo vazebné afinity GDNFR u pacientů trpících takovými stavy reagujícími na terapii GDNFR. Tohoto může být dosaženo pomocí genové terapie, kdy je dosažena selektivní exprese rekombinantního GDNFR ve vhodných buňkách, například pomocí genů pro GDNFR kontrolovaných tkáňově specifickými nebo indukovatelnými promotory nebo produkcí lokalizované infekce replikace deficientními viry nesoucími rekombinantní gen pro GDNFR.

Předpokládá se, že stavy, u kterých bude výhodné podání GDNFR nebo kombinované podání GDNF/GDNFR zahrnují, ale nejsou omezeny na, onemocnění motorických neuronů včetně amyotrofické laterální sklerosy, neurologická onemocnění spojená s diabetes mellitus, Parkinsonovou nemocí, Alzheimerovou nemocí a Huntingtonovou choreou. Další indikace pro podání GDNFR nebo kombinace GDNF/GDNFR jsou popsány výše a dále obsahují léčbu: glaukomu a jiných onemocnění vyznačujících se degenerací gangliových buněk sítnice; sensorických neuropatií způsobených poškozením, poraněním, nebo degenerací sensorických neuronů; patologických stavů jako je dědičná degenerace sítnice a věk, onemocnění nebo retinopatie asociovaná s poraněním, při kterých se vyskytuje degenerace fotoreceptorů, která je odpovědná za ztrátu zraku; a poranění nebo degenerace sensorických buněk vnitřního ucha, jako jsou vláskové buňky a sluchové neurony pro zabránění a/nebo léčbu ztráty sluchu z nejrůznějších příčin.



Transgenní zvířata

V ještě jiném aspektu může být rekombinantní gen pro GDNFR použit pro inaktivaci nebo "knokautování" endiogenního genu (například homologní rekombinací) a tak pro vytvoření GDNFR deficientních buněk, tkání a zvířat. Například, rekombinantní gen pro GDNFR může být zpracován tak, aby obsahoval inserční mutaci, která inaktivuje GDNFR. Takový konstrukt, pod kontrolou vhodného promotoru, může být vložen do buněk, jako jsou embryonální kmenové buňky, jakoukoliv běžnou technikou, jako je transfekce, transdukce, injekce atd. Buňky obsahující konstrukt mohou být selektovány, například podle resistance na G418. Jsou potom identifikovány buňky, kterým chybí intaktní GDNFR (například Southern blotingem nebo Northern blotingem nebo testy na expresi). Buňky postrádající intaktní gen pro GDNFR mohou být potom fúsovány s časnými embryonálními buňkami pro generování transgenních zvířat deficientních pro GDNFR. Srovnání takových zvířat se zvířaty neexprivujícími endogenní GDNF ukáže, zda si tyto dva fenotypy odpovídají nebo nikoliv, což ukáže na přítomnost dalších GDNF-podobných faktorů nebo receptorů. Taková zvířata mohou být použita pro definování specifických neuronálních populací, nebo jiných in vivo procesů, normálně závislých na GDNF. Proto lze předpokládat, že tyto populace nebo procesy budou narušeny u zvířat, která neexprivují GDNFR a proto nemohou odpovídat na GDNF.

Diagnostické aplikace

Podle předkládaného vynálezu mohou být GDNFR sondy použity pro identifikaci buněk a tkání, které reagují na GDNF u normálních nebo u chorobných stavů. Předkládaný vynález poskytuje metody pro



identifikaci buněk, které reagují na GDNF detekcí exprese GDNFR v takových buňkách. Exprese GDNFR může být prokázána transkripcí GDNFR mRNA nebo produkcí GDNFR proteinu. GDNFR exprese může být detekována za použití sond, které identifikují GDNFR nukleovou kyselinu nebo protein nebo detekcí "smyčkových" sekvencí arteficiálně připojených ke GDNFR proteinu.

Jednou z mnoha sond, které mohou být použity pro detekci exprese GDNFR je nukleokyselinová sonda, která může být použita k detekci GDNFR kodující mRNA pomocí jakékoliv v oboru známé metody, včetně, ale bez omezení, hybridizace in situ, Northern blot analýzy, nebo PCR technik. Produkty nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu mohou být značeny detekovatelným markerem (jako jsou radioizotopy nebo neradioaktivní markery jako je biotin) a mohou být použity v procesu hybridizace pro lokalizaci pozice lidského genu pro GDNFR a/nebo pozice jakékoliv příbuzné genové rodiny v chromosomální mapě. Mohou být také použity pro identifikaci lidských onemocnění genu pro GDNFR na DNA úrovni a mohou být použity jako genové markery pro identifikaci sousedních genů a jejich onemocnění. Též jsou zde obsaženy kity obsahující takové značené materiály.

Polypeptidové produkty podle předkládaného vynálezu mohou být značeny spojením s jakoukoliv detekovatelnou markerovou substancí nebo značkou (například radioaktivním izotopem, fluorescenční nebo chemiluminiscenční chemikálií, enzymem nebo jiným značícím činidlem dostupným v oboru) za zisku činidla, které je užitečné při detekci a kvantifikaci GDNF ve vzorcích tkání a kapalin jako je krev nebo moč. Takové produkty mohou být také použity pro detekci buněk a tkání, které reagují na GDNF při normálních a patologických stavech.



Jiným možným testem pro detekci přítomnosti GDNF v testovaném vzorku je vyšetření přítomnosti GDNF-podobných molekul obsahující kontaktování testovaného vzorku s GDNFR peptidem imobilizovaným na pevné fázi, čímž vznikne vazba GDNF na GDNFR. GDNF navázaný na GDNFR může být volitelně kontaktován s detekčním činidlem, jako je značená protilátka specifická pro GDNF, za vzniku detekovatelného produktu. Takové testy mohou být vyvinuty ve formě testovacích prostředků pro analýzu testovaného vzorku. V základní formě takový prostředek obsahuje pevnou fázi obsahující nebo potaženou GDNFR. Metoda pro analýzu testovaného vzorku na přítomnost GDNF může obsahovat kontaktování vzorku s testovacím činidlem obsahujícím GDNFR protein, kde uvedený GDNFR protein reaguje s GDNF přítomným v testovaném vzorku a produkuje detekovatelný reakční produkt ukazující na přítomnost GDNF.

Testovací činidla zde poskytnutá mohou být také obsažena jako součást kitu nebo výrobku. Je zde obsažen výrobek obsahující obalový materiál a jeden nebo více přípravků předkládaných nukleokyselinových nebo aminokyselinových sekvencí. Takový obalový materiál bude obsahovat označení ukazující, že přípravek je použitelný pro detekci GDNF, GDNFR nebo GDNFR defektů v biologickém vzorku. Kit může dále obsahovat materiály pro provedení takového testování, jako jsou činidla pro provedení proteinové analýzy, DNA nebo RNA hybridizační analýzy nebo PCR analýzy krve, moči nebo tkáňových vzorků.

Protilátka proti GDNFR

Podle předkládaného vynálezu může být GDNFR protein, nebo jeho fragmenty nebo deriváty, použit jako imunogen pro generování anti-GDNFR protilátek. Pro další zvýšení pravděpodobnosti

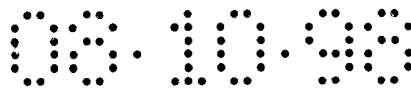


produkce anti-GDNFR imunitní odpovědi může být aminokyselinová sekvence GDNFR analyzována pro identifikaci částí molekuly, které mohou být spojeny se zvýšenou imunogenicitou. Například, aminokyselinová sekvence může být podrobena počítačové analýze pro identifikaci povrchových epitopů, které představují počítačově generované mapy hydrofobicity, povrchové struktury, flexibility, antigenního indexu, amfifilického indexu, amfifilického listu a sekundární struktury GDNFR. Alternativně, mohou být srovnávány aminokyselinové sekvence GDNFR z různých druhů a mohou být identifikovány relativně nehomologní regiony; tyto nehomologní regiony budou s vyšší pravděpodobností imunogenní mezi různými druhy.

Také jsou zde obsaženy polypeptidové fragmenty duplikující pouze část kontinuální aminokyselinové sekvence nebo sekundární konformace v GDNFR, kde tyto fragmenty mohou mít jednu aktivitu savčího GDNFR (například imunologickou aktivitu), ale ne další aktivity (například vazebnou aktivitu pro GDNF protein). Proto může produkce protilátek obsahovat produkci anti-peptidových protilátek. Za použití GDNFR sekvence byly syntetizovány následující příkladné peptidy:

Tabulka 1: GDNFR peptidy

| | | | |
|--------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| SJP-6 | H ₂ N-QSCSTKYRTL-COOH | lidský GDNFR, AA 40-49 | (SEQ ID NO: 25) |
| SJP-7 | H ₂ N-CKRGMKKEKN-COOH | lidský GDNFR, AA 89-98 | (SEQ ID NO: 26) |
| SJP-8 | H ₂ N-LLEDSPYEPV-COOH | lidský GDNFR, AA 115-124 | (SEQ ID NO: 27) |
| SJP-9 | H ₂ N-CSYEERERPN-COOH | kryší GDNFR, AA 223-242 | (SEQ ID NO: 28) |
| SJP-10 | H ₂ N-PAPPVQTTTATTT-COOH | kryší GDNFR, AA 356-369 | (SEQ ID NO: 29) |



Peptidy SJP-6, 7 a 8 jsou identické u krysího a u lidského GDNFR. Peptidy SJP-9 a 10 jsou odvozeny od krysí sekvence a jsou každý odlišný v jedné aminokyselině od lidské sekvence. Mohou být vyrobeny jak polyklonální, tak monoklonální protilátky, pomocí metod známých v oboru, za použití těchto peptidů nebo jiných částí GDNFR.

Monoklonální protilátky proti GDNFR mohou být vyrobeny jakoukoliv známou technikou, které je dostupná pro produkci protilátek kontinuální buněčnou linií v kultuře. Například, může být použita hybridomní technika pro produkci monoklonálních protilátek původně vyvinutá Kohlerem a Milsteinem (Nature 256: 495 - 497, 1975), stejně jako trioma technika, hybridomní technika lidských B-buněk (Kozbor et al., Immunology Today, 4: 72, 1983), EBV-hybridomní technika (Cole et al., v "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., str. 77 - 96, 1985) a podobně.

Lidské monoklonální protilátky nebo chimerické myší-lidské (nebo jiných druhů) monoklonální protilátky mohou být také připraveny pro terapeutické použití a mohou být vyrobeny jakoukoliv z mnoha technik známých v oboru (například Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7308 - 7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 72-79, 1983; Ollson et al., Meth. Enzymol., 92: 3 - 16, 1982). Mohou být připraveny chimerické protilátkové molekuly obsahující myší antigen-vazebnou doménu s lidskými konstantními regiony (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6815, 1984; Takeda et al., Nature 314: 452, 1985).

Různé postupy v oboru známé mohou být použity také pro produkci polyklonálních protilátek. Pro produkci protilátek mohou



být různá hostitelská zvířata, včetně, ale bez omezení, králíků, myší, krys atd., imunizována injekcí GDNFR proteinu nebo jeho fragmentu nebo derivátu. Pro zvýšení imunologické odpovědi mohou být použita různá adjuvans, podle vybraného druhu hostitele. Použitelná adjuvans zahrnují, ale nejsou omezena na, Freundovo (kompletní a nekompletní) adjuvans, minerální geny jako je hydroxid hlinitý, povrchově aktivní substance jako je lysolecitin, pluronické polyoly, polyanionty, peptidy, olejové emulze, přílipkové hemocyaniny, dinitrofenol a lidská adjuvans jako je BCG (Bacil Calmette-Guerin) a Corynebacterium parvum.

Známými technikami může být také připraven molekulární klon protilátek proti GDNFR epitopu. Rekombinantní DNA technika (viz například Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) může být použita pro konstrukci sekvencí nukleových kyselin, které kodují molekulu monoklonální protilátky, nebo její vazebnou část pro antigen.

Molekuly protilátky mohou být přečištěny známými technikami, například imunoabsorpcí nebo imunoafinitní chromatografií, chromatografickými metodami jako je kapalinová chromatografie s vysokou rozlišovací schopností, nebo jejich kombinace atd. Předkládaný vynález poskytuje protilátkové molekuly, stejně jako fragmenty takových protilátkových molekul. Fragmenty protilátek, které obsahují idiotyp molekulu, mohou být generovány známými technikami. Například, takové fragmenty zahrnují, ale nejsou omezeny na: $F(ab')_2$ fragment, který může být produkován pepsinovým trávením protilátkové molekuly; Fab' fragmenty, které mohou být generovány redukcí disulfidových můstků $F(ab')_2$ fragmentu a Fab fragmenty, které mohou být produkovány ošetřením



molekuly protilátky papainem a redukčním činidlem.

Takové selektivní vazebné molekuly mohou být sami o sobě alternativou ke GDNFR proteinu a mohou být formulovány jako farmaceutický přípravek.

Rekombinantní exprese GDNFR proteinu

Předkládaný vynález poskytuje různé polynukleotidy kodující GDNFR proteiny. Produkt exprese a jeho deriváty je charakterizován schopností vazby na GDNF, která je specifická a vysokoafinitní, takže mohou proběhnout další interakce se signálními molekulami, což vyvolává nebo zvyšuje aktivitu GDNF, jako je zvýšené vychytávání dopaminu dopaminergními buňkami. Polynukleotidy mohou být také použity v aplikacích buněčné terapie nebo genové terapie.

Podle předkládaného vynálezu jsou poskytnuty nový GDNFR protein a DNA sekvence kodující všechny části takového receptoru. Nové sekvence nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu jsou použitelné v zajištění exprese polypeptidových produktů v prokaryotických nebo v eukaryotických hostitelských buňkách, kde uvedený peptidový produkt má alespoň část primární strukturální konformace a jednu nebo více biologických vlastností rekombinantního lidského GDNFR. Nukleové kyseliny mohou být přečištěné a izolované, takže je požadovaný kodující region použitelný pro produkci polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Alternativně mohou být sekvence nukleových kyselin použity pro diagnostické účely, jak je podrobněji popsáno dále. Příklady DNA sekvencí podle předkládaného vynálezu jsou sekvence nukleových kyselin kodující aminokyselinové sekvence GDNFR ukázané na



obrázkách 2 a 4 a uvedené v SEQ ID NO: 2 a v SEQ ID NO: 4. Kromě toho, DNA sekvence popsané v předkládaném vynálezu mohou specificky obsahovat: (a) jakoukoliv z DNA sekvencí zobrazených na obrázku 1 a 3 (a komplementárních řetězců); (b) DNA sekvence, které hybridizují (za hybridizačních podmínek popsaných v sekci vyšetřování cDNA knihovny dále, nebo za ekvivalentní podmínek nebo za přísnějších podmínek) na DNA sekvence v podbodu (a) nebo na jejich fragmenty; a (c) DNA sekvence, které i přes degeneraci genetického kodu mohou hybridizovat na DNA sekvence podbodu (a). Specificky jsou v podbodech (b) a (c) obsaženy genomové DNA sekvence kodující alelické varianty lidského GDNFR a/nebo kodující GDNFR z jiných savčích druhů, a vyrobené DNA sekvence kodující GDNFR, fragmenty GDNFR a analogy GDNFR, jejichž DNA sekvence mohou inkorporovat kodony usnadňující transkripci a translaci messengerové RNA v mikrobiálním hostiteli. Takové zpracované sekvence mohou být snadno konstruovány metodami v oboru známými, stejně jako metodami, které jsou zde popsány.

Techniky rekombinantní exprese, provedené podle popisu zde uvedeného nebo podle jiných známých metod, mohou být použity pro produkci těchto polynukleotidů a pro expresi různých GDNFR proteinů. Například, insercí sekvence nukleové kyseliny, která koduje GDNFR protein, do vhodného vektoru, může odborník v oboru snadno produkovat velká množství požadovaný nukleotidové sekvence. Tyto sekvence mohou být potom použity pro generování detekčních sond nebo amplifikačních primerů. Alternativně může být polynukleotid kodující GDNFR protein insertován do expresního vektoru. Vložením expresního vektoru do vhodného hostitele může být produkován GDNFR protein ve velkých množstvích.

Jak je zde dále popsáno, existuje mnoho systémů



vektor/hostitel pro propagaci sekvencí nukleových kyselin a/nebo pro produkci GDNFR proteinů. Tyto zahrnují, ale nejsou omezeny na, plasmidové, virové a inserční vektory, a prokaryotické a eukaryotické hostitele. Odborník v oboru může adaptovat systém vektor/hostitel, který umožňuje propagaci nebo expresi heterologní DNA pro produkci nebo expresi sekvencí podle předkládaného vynálezu.

Pomocí takových rekombinantních technik jsou GDNFR proteiny podle předkládaného vynálezu snadno produkovány v komerčních množstvích s vysokou čistotou. Kromě toho, odborníci ocení, že nové sekvence nukleových kyselin zahrnují degenerované sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR proteiny specificky uvedené v obrázcích, sekvence kodující varianty GDNFR proteinů, a sekvence nukleových kyselin, které hybridizují, výhodně za přísných hybridizačních podmínek, s komplementy těchto sekvencí nukleových kyselin (viz Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, strany 387 až 389 1982). Příkladem přísných hybridizačních podmínek je hybridizace při 4 x SSC při 62 až 67 °C, následovaná promytím v 0,1 x SSC při 62 - 67 °C po dobu přibližně jedné hodiny. Alternativně je příkladem přísných hybridizačních podmínek hybridizace v 45 - 50% formamidu, 4 x SSC při 40-45 °C. DNA sekvence, které hybridizují na komplementární sekvence pro GDNFR protein za uvolněných hybridizačních podmínek a které kodují GDNFR protein podle předkládaného vynálezu jsou zde také obsaženy. Příklady takových hybridizačních podmínek s mírnou přísností jsou 4 x SSC při 45-55 °C nebo hybridizace s 30-40% formamidem při 40-45 °C.



Příprava polynukleotidů kodujících GDNFR

Na základě objevů předkládaného vynálezu mohou být sekvence nukleových kyselin kodující kompletní GDNFR polypeptid nebo jeho fragmenty snadno připraveny nebo získány mnoha způsoby, včetně, ale bez omezení, chemické syntesy, vyšetřováním cDNA nebo genomových knihoven a/nebo PCR amplifikací cDNA. Tyto a jiné metody pro přípravu sekvencí nukleových kyselin jsou v oboru známé a jsou uvedeny například v Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), Ausubel et al., vyd. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press, 1994) a Berger and Kimmel (Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, svazek 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987). Výhodné sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR jsou savčí sekvence.

Chemická syntéza sekvencí nukleových kyselin kodujících GDNFR protein může být také provedena za použití metod známých v oboru, jako jsou ty, které uvádí Engels et al., (Angew Chem. Intl. Ed., 28: 716 - 734, 1989). Tyto metody zahrnují, mimo jiné, fosfodiesterovou, fosforoamiditovou a H-fosfonatovou metodu syntesy sekvencí nukleových kyselin. Výhodnou metodou pro takovou chemickou syntesu je polymery podporovaná syntesa využívající standartní fosforoamiditové chemie. Typicky bude délka DNA kodující požadovaný polypeptid několik stovek bazí (bp) nebo nukleotidů. Sekvence nukleových kyselin delší než asi 100 nukleotidů mohou být za použití těchto metod syntetizovány jako několik fragmentů. Tyto fragmenty mohou být potom ligovány dohromady za zisku sekvence pro expresi kompletního GDNFR polypeptidu nebo jeho části.



Alternativně mohou být vhodné sekvence nukleových kyselin získány vyšetřováním vhodných cDNA knihoven (t.j. knihoven připravených z jedné nebo více tkání, u kterých se předpokládá exprese proteinu) nebo genomových knihoven (knihoven připravených z celkové genomové DNA). Zdrojem cDNA knihovny je typicky tkáň, u které se předpokládá exprese GDNFR v dostatečném množství. Typicky je zdrojem genomové knihovny jakákoliv tkáň od savců, u kterých se předpokládá, že mají gen kodující GDNFR. Knihovna může být potom vyšetřována na přítomnost GDNFR cDNA/genu za použití jedné nebo více sond nukleových kyselin (jako jsou oligonukleotidy, fragmenty cDNA nebo genomové DNA vybrané na základě zde popsaných sekvencí), které budou hybridizovat selektivně s GDNFR cDNA nebo genem přítomným v knihovně. Sondy, které jsou obvykle použité pro vyšetřování takových knihoven obvykle kodují malý region GDNFR sekvence nukleových kyselin ze stejného nebo z podobného druhu, jako je druh, ze kterého byla knihovna připravena. Alternativně může být sonda degenerovaná, jak je zde popsáno.

Vyšetřování knihovny je typicky provedeno tepelným zpracováním oligonukleotidové sondy nebo cDNA s klony v knihovně za podmínek příslnosti, které brání nespecifické vazbě, ale které umožňují vazbu (hybridizaci) těch klonů, které mají signifikantní homologii se sondou nebo primerem. Typické podmínky hybridizační a promývací příslnosti závisí částečně na velikosti (t.j. počtu nukleotidů) cDNA nebo oligonukleotidové sondy a na tom, zda je sonda degenerovaná. Pravděpodobnost získání klonu je také brána v úvahu při vývoji hybridizačního roztoku (například na tom, zda je vyšetřována cDNA nebo genomová knihovna; pokud se jedná o cDNA knihovnu, pak je vyšší pravděpodobnost přítomnosti vyšších hladin požadované cDNA).



Pokud jsou DNA fragmenty (jako je cDNA) použity jako sondy, pak jsou typické hybridizační podmínky takové, jak je uvádí Ausubel et al., vyd., výše. Po hybridizaci je skvrna obsahující knihovnu promyta při vhodné přísnosti, závisující na několika faktorech jako je velikost sondy, očekávaná homologie sondy a klonu, typu vyšetřované knihovny, počtu vyšetřovaných klonů a podobně. Příklady přísných promývacích podmínek (které mají obvykle nízkou iontovou sílu a jsou použity při relativně vysokých teplotách) jsou následující. Jedním takovým promytím za přísných podmínek je 0,015 M NaCl, 0,005 M citratu sodného a 0,1% SDS při 55-65 °C. Jiným takovým pufrem pro přísné promytí je 1 mM Na₂EDTA, 40 mM NaHPO₄, pH 7,2 a 1% SDS při asi 40-50°C. Jiným promytím za přísných podmínek je 0,2 x SSC a 0,1% SDS při asi 50-65 °C.

Jsou zde také uvedeny příklady protokolů pro přísné podmínky promytí v případech, že jsou oligonukleotidové sondy použity pro vyšetřování cDNA nebo genomových knihoven. Například, první protokol používá 6 x SSC s 0,05% pyrofosfatem sodným při teplotě mezi 35 - 65 °C, podle délky sondy. Například, sondy o 14 bazích jsou promyty při 35 - 40 °C, sondy o 17 bazích jsou promyty při 45 - 50 °C, sondy o 20 bazích jsou promyty při 52 - 57 °C a sondy o 23 bazích jsou promyty při 57 - 63 °C. Teplota může být zvýšena o 2-3 °C, pokud je nespécifická vazba pozadí vysoká. Druhý protokol používá pro promytí tetramethylammoniumchlorid (TMAC). Jedním roztokem pro přísné promytí je 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 0,2% SDS.

Jinou vhodnou metodou pro získání sekvencí nukleových kyselin kodujících GDNFR protein je polymerasová řetězová reakce (PCR) V této metodě je poly(A)+RNA nebo celková RNA extrahována z tkáně,



kteřá exprivuje GDNFR. cDNA je potom připravena z RNA za použití enzymu reversní transkriptasa (t.j. RT-PCR). Dva primery, typicky komplementární ke dvěma separátním regionům GDNFR cDNA (oligonukleotidy) jsou potom přidány k cDNA spolu s polymerasou jako je Taq polymerasa a polymerasa amplifikuje cDNA region mezi dvěma primery.

Tam, kde metoda volby pro přípravu sekvencí nukleových kyselin kodujících požadovaný GDNFR protein vyžaduje použití oligonukleotidových primerů nebo sond (například PCR, cDNA nebo vyšetřování genomových knihoven), by měly oligonukleotidové sekvence nebo primery být dostatečné délky a měly by být dostatečně jednoznačné pro minimalizaci množství nespecifické vazby, která proběhne během vyšetřování knihovny nebo během PCR amplifikace. Aktuální sekvence sond nebo primerů je obvykle založena na konzervovaných nebo vysoce homologních sekvencích nebo regionech ze stejného nebo podobného genu z jiného organismu, jako křsíš sekvence nukleových kyselin obsažená v předkládaném vynálezu. Volitelně mohou být sondy nebo primery částečně nebo úplně degenerované, t.j. mohou obsahovat směs sond/primerů, které všechny kodují stejnou aminokyselinovou sekvenci, ale pomocí různých kodonů. Alternativou k přípravě degenerovaných sond je umístění inosinu do některých nebo do všech z těchto kodonů, které se liší mezi druhy. Oligonukleotidové sondy nebo primery mohou být připraveny metodami chemické syntesy DNA, jak byly popsány výše.

GDNFR proteiny založené na sekvencích nukleových kyselin kodujících GDNFR, stejně jako jejich mutantních a variantních sekvencích, také spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Mutantní nebo variantní sekvence zahrnují ty sekvence, které



obsahují jednu nebo více nukleotidových substitucí, delecí a/nebo insercí ve srovnání s přirozenou sekvencí a které vedou k expresi variací v aminokyselinové sekvenci ve srovnání s přirozenou aminokyselinovou sekvencí. V některých případech mohou existovat přirozené GDNFR aminokyselinové mutanty nebo varianty, díky existenci přirozených alelických variací. GDNFR protein vznikající na základě takových přirozeně se vyskytujících mutantů nebo variant také spadá do rozsahu předkládaného vynálezu. Příprava syntetických mutantních sekvencí je také v oboru dobře známá a je popsána například ve Wells et al (Gene 34: 315, 1985) a v Sambrook et al., výše.

V některých případech může být žádoucí příprava nukleokyselinových a/nebo aminokyselinových variant přirozeného GDNFR. Nukleokyselinové varianty (kde se jeden nebo více nukleotidů liší od přirozeného GDNFR) mohou být produkovány za použití místně řízené mutagenese nebo PCR amplifikace, při které má primer požadovanou bodovou mutaci (viz Sambrook et al., výše a Ausubel et al., výše, pro popis technik mutagenese). Chemická syntesa používající metod popsaných v Engels et al., výše, může být také použita pro přípravu takových variant. Stejně tak mohou být použity jiné metody známé odborníkům v oboru. Výhodné varianty nukleových kyselin jsou ty, které obsahují nukleotidové substituce v preferenčním kodonu v hostitelské buňce, která je použita k rekombinantní produkci GDNFR. Jiné výhodné varianty jsou ty, které kodují konzervativní změny aminokyselin (například takové, kde není významně změněn náboj nebo polarita postraního řetězce přirozených aminokyselin substitucí za jinou aminokyselinu) ve srovnání s přirozeným typem, a ty, které jsou vytvořeny tak, aby byla generována nová glykosylační a/nebo fosforylační místa na GDNFR, nebo ty, které jsou generovány tak,

aby byla existující glykosylační a/nebo fosforylační místa na GDNFR deletována.

Vektory

cDNA nebo genomová DNA kodující požadovaný GDNFR protein je insertována do vektoru pro další klonování (amplifikaci DNA) nebo pro expresi. Vhodné vektory jsou komerčně dostupné, nebo mohou být speciálně vytvořeny. Možné vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na, kosmidy, plasmidy nebo modifikované viry, ale vektorový systém musí být kompatibilní s vybranou hostitelskou buňkou. Takové vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na, bakteriofágy jako jsou deriváty lambda, nebo plasmidy jako je pBR322, pUC nebo Bluescript[®] plasmidové deriváty (Stratagene, La Jolla, CA). Rekombinantní molekuly mohou být vloženy do hostitelských buněk pomocí transformace, transfekce, infekce, elektroporace nebo jiných známých technik.

Například, sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR je insertována do klonovacího vektoru, který je použit k transformaci, transfekci nebo infekci vhodných hostitelských buněk, takže je generováno mnoho kopií sekvence nukleových kyselin. Toto může být provedeno ligací DNA fragmentu do klonovacího vektoru, který má komplementární lepivé konce. Pokud nejsou komplementární restrikční místa použita ve fragmentu DNA přítomna v klonovacím vektoru, pak mohou být konce DNA molekul enzymaticky modifikovány. Také může být výhodná inkorporace míst pro štěpení restrikčními endonukleasami do oligonukleotidových primerů použitých v polymerasové řetězové reakci pro usnadnění inserce výsledné sekvence nukleových kyselin do vektoru. Alternativně, jakékoliv požadované místo může být vytvořeno



ligováním nukleotidových sekvencí (linkerů) na DNA konce; tyto ligované linkery mohou obsahovat specifické chemicky syntetizované oligonukleotidy kodující rozpoznávací místa pro restriční endonukleasy. V alternativní metodě může být štěpící vektor a GDNFR kodující sekvence nukleových kyselin modifikována připojením homopolymeru. Ve specifických provedeních umožňuje transformace hostitelských buněk rekombinantními DNA molekulami, které obsahují izolovaný gen pro GDNFR, cDNA nebo syntetizované DNA sekvence generování mnoha kopií genu. Proto může být sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR získána ve velkém množství pomocí kultivace transformantů, izolace rekombinantních DNA molekul z transformantů a - pokud je to nutné - zpětným získáním insertovaného genu z izolované rekombinantní DNA.

Selekce nebo konstrukce vhodného vektoru bude záviset na 1) tom, zda bude použit pro DNA amplifikaci nebo pro DNA expresi; 2) na velikosti DNA, která bude insertována do vektoru; a na hostitelské buňce (například savčí, hmyzí, kvasince, houbě, rostlinné nebo bakteriální buňce), která má být transformována vektorem. Každý vektor obsahuje různé složky v závislosti na své funkci (amplifikace DNA nebo exprese DNA) a jeho kompatibilitě s vybranou hostitelskou buňkou. Pro DNA expresi mohou složky vektoru zahrnovat, bez omezení, jednu nebo více z následujících složek: signální sekvence, zdroj replikace, jeden nebo více selekčních nebo markerových genů, enhancerové elementy, promotory, sekvence ukončující transkripci, a podobně. Tyto složky mohou být získány z přirozených zdrojů nebo mohou být syntetizovány známými postupy. Vektory podle předkládaného vynálezu obsahují sekvence nukleových kyselin, které kodují požadovaný GDNFR protein, operativně navázané na jeden nebo více amplifikačních, kontrolních expresních, regulačních nebo



podobných operačních elementů schopných řízení, kontroly nebo jinak ovlivňujících amplifikaci nebo expresi sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR protein ve vybrané hostitelské buňce.

Expresní vektory obsahující sekvence nukleových kyselin pro GDNFR mohou být identifikovány třemi obecnými způsoby: (a) DNA-DNA hybridizací; (b) přítomností nebo absencí funkce "markerového" genu; a (c) expresí insertovaných sekvencí. V prvním přístupu může být přítomnost cizorodé sekvence nukleových kyselin insertovaných do expresního vektoru identifikována DNA-DNA hybridizací za použití sond obsahujících sekvence, které jsou homologní k insertované sekvenci nukleových kyselin kodující GDNFR. Ve druhém přístupu může být systém rekombinantní vektor/hostitel identifikován a selektován na základě přítomnosti nebo absence jistých funkcí "markerového" genu (například aktivity thymidin kinasy, resistance na antibiotika, transformačního fenotypu, okluse tvorby tělísek v bakuloviru atd.) způsobených insercí cizorodé sekvence nukleových kyselin do vektoru. Například, pokud je sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR insertována spolu se sekvencí markerového genu do vektoru, tak mohou být rekombinanty obsahující GDNFR insert identifikována absencí funkce markerového genu. Ve třetím přístupu může být rekombinantní expresní vektor identifikován detekcí cizorodého proteinového produktu exprivovaného rekombinantní sekvencí nukleových kyselin. Takové testy jsou založeny na fyzikálních nebo na funkčních vlastnostech exprivovaného GDNFR proteinového produktu, například na vazbě GDNFR proteinu na GDNF nebo na protilátku, která přímo rozpoznává GDNFR.

Signální sekvence

Signální sekvence mohou být složkou vektoru, nebo mohou být součástí GDNFR DNA, která je insertována do vektoru. Nativní GDNFR DNA koduje signální sekvence na amino koncové části proteinu, která je štěpena během posttranslačního zpracování proteinu za vzniku zralého GDNFR proteinu. Do rozsahu předkládaného vynálezu spadají GDNFR polynukleotidy s přirozenou signální sekvencí, stejně jako GDNFR polynukleotidy, ve kterých je přirozená signální sekvence deletována a nahrazena heterologní signální sekvencí. Vybraná heterologní signální sekvence by měla být taková, která je rozpoznávána a zpracována, t.j. štěpena signální peptidasou, hostitelskou buňkou. Pro prokaryotické hostitelské buňky, které nerozpoznávají a nezpracovávají přirozenou GDNFR signální sekvenci je signální sekvence substituována prokaryotickou signální sekvencí vybranou například ze skupiny leaderů alkalické fosfatasy, peniciliny nebo termostabilního enterotoxinu II. Pro sekreci z kvasinek může být přirozená GDNFR signální sekvence substituována leadery kvasinkové invertasy, alfa faktoru nebo kyselých fosfatasy. Pro expresi v savčích buňkách je přirozená signální sekvence dostatečná, ačkoliv jsou vhodné i jiné savčí signální sekvence.

Zdroj replikace

Expresní a klonovací vektory obvykle obsahují sekvenci nukleových kyselin, která umožňuje replikaci vektoru v jednom nebo více typech vybraných hostitelských buněk. V klonovacích vektorech je tato sekvence typicky taková, která umožňuje replikaci vektoru nezávislou na chromosomální DNA hostitele a obsahuje zdroj replikace nebo autonomně se replikující sekvence.

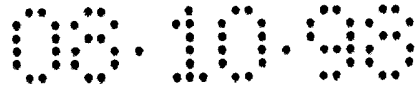


Takové sekvence jsou dobře známé pro mnoho bakterií, kvasinek a virů. Zdroj replikace z plasmidu pBR322 je vhodný pro většinu Gram-negativních bakterií a různé zdroje (například SV40, polyomový, adenovirový, VSV nebo BVP) jsou použitelné pro klonovací vektory v savčích buňkách. Obecně, složka zdroje replikace není nutná pro savčí expresní vektory (například, SV40 zdroj je často používán pouze proto, že obsahuje časný promotor).

Selekční gen

Expresní a klonovací vektory mohou obsahovat selekční gen. Tento gen koduje "markerový" protein nezbytný pro přežití nebo růst transformovaných hostitelských buněk, pokud jsou kultivovány v selektivním kultivačním mediu. Hostitelské buňky, které nebyly transformovány vektorem nebudou obsahovat selekční gen a proto nebudou přežívat v kultivačním mediu. Typické selekční geny kodují proteiny, které (a) způsobují resistenci na antibiotika nebo jiné toxiny, například na ampicilin, neomycin, methotrexat nebo tetracyklin; (b) doplňují auxotrofické deficiencie; nebo (c) doplňují kritické živiny, které nejsou dosažitelné z kultivačního media.

Jiné selekční geny mohou být použity pro amplifikaci genu, který bude exprimován. Amplifikace je proces, při kterém jsou geny, které zvýšeně nutné pro produkci proteinů kritických pro růst opakovány v tandemu v chromosomech následujících generací rekombinantních buněk. Příklady vhodných selektovatelných markerů pro savčí buňky zahrnují dihydrofolatredukasu (DHFR) a thymidin kinasu. Savčí buněčné transformanty jsou umístěny pod selekční tlak, při kterém jsou pouze transformanty jedinečně adaptovány pro přežívání díky markeru přítomnému ve vektoru. Seleční tlak



je dosažen kultivací transformovaných buněk za podmínek, při kterých je koncentrace selekčního činidla v mediu opakovaně měněna, což vede k amplifikaci jak selekčního genu, tak DNA, která koduje GDNFR. Výsledkem je, že jsou syntetizovány zvýšené kvantitativně GDNFR z amplifikované DNA.

Například, buňky transformované DHFR selekčním genem jsou nejprve identifikovány kultivací všech transformantů v kultivačním mediu, které obsahuje methotrexat, který je kompetitivním antagonistou DHFR. Vhodnou hostitelskou buňkou, ve které je přirozený DHFR použit, je ovariální buněčná linie čínské křečka deficientní pro aktivitu DHFR (viz například Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(7): 4216 - 4220, 1980). Transformované buňky jsou potom vystaveny vysokým koncentracím methotrexatu. Toto vede k syntese mnoha kopií DHFR genu a současně ke tvorbě mnoha kopií jiné DNA přítomné v expresním vektoru, jako je DNA kodující GDNFR protein.

Promotor

Expresní a klonovací vektory podle předkládaného vynálezu budou typicky obsahovat promotor, který je rozpoznáván hostitelským organismem a který je operativně navázán na sekvenci nukleových kyselin kodující GDNFR protein. Promotory jsou netranslatované sekvence umístěné "upstream" (5') vzhledem ke start kodonu strukturálního genu (obvykle v rozmezí 100 až 1000 bp), které kontrolují transkripci a translaci určité sekvence nukleových kyselin, jako je sekvence kodující GDNFR. Promotory jsou běžně řazeny do jedné ze dvou skupin, indukovatelných promotorů a konstitutivních promotorů. Indukovatelné promotory iniciují zvýšení hladiny transkripce z DNA, která je pod jejich



kontrolou, v odpovědi na určité změny kultivačních podmínek, jako je přítomnost nebo absence živin nebo změna teploty. Je znám velký počet promotorů, rozpoznávaných mnoha potenciálními hostitelskými buňkami. Tyto promotory jsou operativně navázány na DNA kodující GDNFR odstraněním promotoru ze zdroje DNA restričním trávením a insercí požadované promotorové sekvence do vektoru. Přirozená GDNFR promotorová sekvence může být použita pro řízení amplifikace a/nebo exprese GDNFR DNA. Heterologní promotor je preferován, pokud umožňuje větší míru transkripce a vyšší zisk exprivovaného proteinu ve srovnání s přirozeným promotorem, a pokud je kompatibilní se systémem hostitelské buňky, který byl vybrán pro použití.

Promotory vhodné pro použití u prokaryotických hostitelů zahrnují beta-laktamasový a laktosový promotorový systém; alikalickou fosfatasu, tryptofanový (*trp*) promotorový systém; a hybridní promotory jako je *tac* promotor. Jiné známé bakteriální promotory jsou také vhodné. Jejich nukleotidové sekvence byly publikovány, což umožňuje odborníkovi v oboru jejich ligaci na požadované sekvence DNA, za použití linkerů a adaptorů, podle potřeby, pro vytvoření požadovaných restričních míst.

Vhodné promotorové sekvence pro použití ve kvasinkových hostitelých jsou také v oboru dobře známé. Kvasinkové enhancery jsou výhodně používány s kvasinkovými promotory. Vhodné promotory pro použití v savčích hostitelských buňkách jsou také dobře známé a zahrnují ty, které jsou získány z genomů virů jako je polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (jako je Adenovirus 2), hovězí papiloma virus, virus ptačího sarkomu, cytomegalovirus, retrovirus, virus hepatitidy B a nejlépe Simian Virus 40 (SV40). Další vhodné savčí promotory zahrnují heterologní savčí



promotory, například promotory tepelného šoku a aktinový promotor. Promotor pro možné použití v produkci GDNFR proteinů v CHO buňkách je SRa (viz Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8(1): 466 - 472, 1988). Vhodným expresním vektorem je pDSRa2. pDSRa2 plasmidový konstrukt obsahující vhodnou GDNFR cDNA může být připraven v podstatě podle postupu popsaneho v související U.S. patentové přihlášce pořadové č. 501904, podané 29.3.1990 (viz též Evropská patentová přihláška č. 90305433, publikační č. EP 398753, podaná 18.5.1990 a WO 90/14363 (1990), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz.

Další promotory, které mohou být účinné v kontrole exprese GDNFR zahrnují, ale nejsou omezeny na: region SV40 časného promotoru (Bernoist and Chambon, Nature, 290: 304 - 310, 1981); CMV promotor; promotor obsažený v 3' dlouhém opakujícím se úseku viru Rousova sarkomu (Yamamoto et al., Cell, 22: 787 - 797, 1980); herpesový promotor thymidin kinasy (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 144 - 1445, 1981); regulační sekvence genu pro methalothionin (Brinster et al., Nature 296: 39 - 42, 1982); prokaryotické expresní vektory jako je bat-laktamasový promotor (Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727 - 3731, 1978), nebo tac promotor (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21 - 25, 1983). Také použitelné jsou následující zvířecí transkripční kontrolní regiony: kontrolní region genu pro elastasu I, který je aktivní v buňkách acinů slinivky břišní (Swift et al., Cell, 38: 639 - 646, 1984; Ornitz et al., Cold Sprin Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399 - 409, 1986; MacDonald, Hepatology, 7: 425 - 515, 1987); kontrolní region genu pro insulin, který je aktivní v β -buňkách slinivky břišní (Hanahan, Nature 315: 115 - 122, 1985); kontrolní region imunoglobulinového genu, který je aktivní v lymfoidních buňkách



(Grosschedl et al., Cell, 38: 647 - 658, 1984; Adames et al., Nature, 318: 533 - 538, 1985; Alexander et al., Mol. Cell. Biol. 7: 1436 - 1444, 1987); kontrolní region viru nádoru mléčné žlázy u myši, který je aktivní testikulárních, prsních, lymfoidních a žírných buňkách (Leder et al., Cell, 45: 485 - 495, 1986); kontrolní region genu pro albumin, který je aktivní v játrech (Pinkert et al., Genes and Devel. 1: 268 - 276, 1987); kontrolní region genu pro alfa fetoprotein, který je aktivní v játrech (Krumlauf et al., Mol. Cell Biol. 5: 1639 - 1648, 1985; Hammer et al., Science 235: 53 - 58, 1987); kontrolní region genu pro alfa-1-antitrypsin, který je aktivní v játrech (Kelsey et al., Genes and Devel. 1: 161 - 171, 1987); kontrolní region genu pro beta-globin, který je aktivní v myeloidních buňkách (Mogram et al., Nature 315: 338 - 340; Kollias et al., Cell 46: 89 - 94, 1986); kontrolní region genu pro myelinový bazický protein, který je aktivní v oligodendrocytech mozku (Readhead et al., Cell 48: 703 - 712, 1987); kontrolní region genu pro lehký řetězec 2 myosinu, který je aktivní v kosterním svalu (Sani, nature 314: 283 - 286, 1985); a kontrolní region genu pro hormon uvolňující gonadotropin, který je aktivní v hypothalamu (Mason et al., Science 234: 1372 - 1378, 1986).

Enhancerové elementy

Enhancerové sekvence mohou být insertovány do vektoru pro zvýšení transkripce DNA sekvence kodující GDNFR protein podle předkládaného vynálezu vyššími eukaryoty. Enhancery jsou cis-působící elementy DNA, obvykle délky okolo 10 až 300 bp, které působí na promotor, aby zvyšoval transkripci. Enhancery mají relativní orientaci a nezávislou pozici. Byly nalezeny 5' i 3' od transkripční jednotky. Je známo několik enhancerových



sekvencí dosatupných ze savčích genů (například pro globin, elastasu, albumin, alfa-fetoprotein a inzulin). Obvykle bude nicméně použit virový enhancer. SV40 enhancer, enhancer časného promotoru cytomegaloviru, polyoma enhancer, a adenovirové enhancery jsou příklady "posilujících" elementů pro aktivaci eukaryotických promotorů. Ačkoliv enhancer může být vložen do vektoru v pozici 5' nebo 3' ke GDNFR DNA, obvykle je umístěn 5' od promotoru.

Ukončení transkripce

Expresní vektory použité v eukaryotické hostitelské buňce (kvasince, houbě, hmyzí, rostlinné, zvířecí, lidské buňce nebo jaderné buňce z jakéhokoliv mnohobuněčného organismu) budou také obsahovat sekvence nutné pro ukončení transkripce a pro stabilizaci mRNA. Takové sekvence jsou běžně dostupné z 5' a 3' netranslatovaných regionů eukaryotických DNA nebo cDNA. Tyto regiony obsahují nukleotidové segmenty transkribované jako polyadenylované fragmenty v netranslatované části mRNA kodující GDNFR.

Konstrukce vhodných vektorů obsahujících jednu nebo více z výše uvedených složek spolu se sekvencí kodující GDNFR je provedena standartními ligačními technikami. Izolované plasmidy nebo DNA fragmenty jsou štěpeny, upraveny a znovu ligovány v požadovaném pořadí za vzniku požadovaného plasmidu. Pro potvrzení toho, že byly konstruovány správné sekvence mohou být ligační směsi použity pro transformaci *E. coli* a úspěšné transformanty mohou být selektovány pomocí známých technik, jako je resistance na ampicilin nebo na tetracyklin jak je popsáno výše. Plasmidy z transformantů mohou být potom připraveny, analyzovány trávením



restrikčními endonukleasami a/nebo sekvencovány pro potvrzení přítomnosti požadovaného konstruktů.

Mohou být také použity vektory umožňující přechodnou expresi DNA kodující GDNFR v savčích buňkách. Obecně, přechodná exprese vyžaduje použití expresního vektoru, který je schopen účinné replikace v hostitelské buňce, takže se v jedné hostitelské buňce akumuluje mnoho kopií expresního vektoru a , nakonec, se syntetizují vysoké hladiny požadovaného proteiny kodovaného expresním vektorem. Přechodné expresní systémy, obsahující vhodný expresní vektor a hostitelskou buňku, umožňují výhodnou pozitivní identifikaci proteinů kodovaných klonovanou DNA, stejně jako umožňují rychlé vyšetřování takových proteinů na jejich biologické nebo fyzikální vlastnosti. Proto jsou přechodné expresní systémy zejména výhodné v identifikaci variant proteinů.

Selekce a transformace hostitelských buněk

Hostitelské buňky (například bakteriální, savčí, hmyzí, kvasinky, nebo rostlinné buňky) transformované sekvencemi nukleových kyselin pro použití v expresi rekombinantního GDNFR proteinu jsou také poskytnuty předkládaným vynálezem. Transformovaná hostitelská buňka je kultivována za vhodných podmínek umožňujících expresi sekvence nukleových kyselin. Výběr vhodných hostitelských buněk a způsobů pro transformaci, kultivaci, amplifikaci, vyšetřování a produkci produktu a přečištění produktu je v oboru dobře znám. Viz například Gething and Sambrook, Nature 293: 620 - 625 (1981), nebo alternativně Kaufman et al., Mol. Cell. Biol. 5(7): 1750 - 1759 (1985) nebo Howley et al., U.S. patent č. 4419446. Další příklady materiálů a způsobů jsou zde uvedeny. Transformovaná hostitelská buňka může



být kultivována ve vhodném mediu a exprivovaný GDNFR protein je potom volitelně získán, izolován a přečištěn z kultivačního media (nebo z buněk, pokud je exprivován intracelulárně) vhodnými prostředky známými odborníkům v oboru.

Různé hostitelské buňky mají charakteristické a specifické mechanismy pro translaci a pro posttranslační zpracování a modifikaci (například glykosylaci, štěpení) proteinů. Vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy mohou být vybrány pro zajištění požadovaných modifikací a zpracování exprivovaného cizorodého proteinu. Například, exprese v bakteriálním systému může být použita pro produkci neglykosylovaného základního proteinového produktu. Exprese v kvasinkách může být použita pro produkci glykosylovaného produktu. Exprese v savčích buňkách může být použita pro zajištění "přirozené" glykosylace heterologního GDNFR proteinu. Kromě toho, různé expresní systémy vektor/hostitel mohou provádět zpracovací reakce jako je proteolytické štěpení v různém rozsahu.

Vhodné hostitelské buňky pro klonovací nebo expresní vektory zde popsané jsou prokaryotické, kvasinkové, nebo vyšší eukaryotické buňky. Eukaryotické mikroby jako jsou vláknité houby mohou být vhodnými hostiteli pro expresi GDNFR proteinů. *Saccharomyces cerevisiae*, nebo běžná pekařská kvasinka, je nejběžněji používaná z nižších eukaryotických hostitelských mikroorganismů, ale mnoho jiných rodů, druhů a kmenů jsou dobře známé a běžně dostupné.

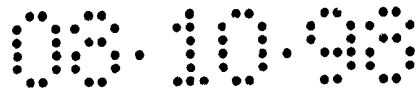
Hostitelské buňky, které jsou použity pro expresi glykosylovaného GDNFR proteinu, jsou také odvozeny od mnohobuněčných organismů. Takové hostitelské buňky jsou schopné



komplexního zpracování a glykosylačních aktivit. V zásadě může být použita jakákoliv kultura vyšších eukaryotických buněk, ať taková kultura obsahuje buňky od obratlovců nebo od bezobratlých, včetně rostlinných a hmyzích buněk. Propagace buněk od obratlovců v kultuře (tkáňové kultuře) je dopře známým postupem. Příklady použitelných savčích hostitelských buněčných linií zahrnují, ale nejsou omezeny na, CV1 linii opičích ledvin transformovanou SV40 (COS7), lidskou linii embryonálních ledvin (293 nebo 293 buňky subklonované pro růst v suspensní kultuře), buňky ledvin křečků a ovariální buňky čínského křečka. Další vhodné savčí buněčné linie zahrnují, ale nejsou omezeny na, HeLa, myší L929 buňky, 3T3 linie odvozené od Swiss, Balb-b nebo NIH myší, BHK nebo HaK křeččí buněčné linie.

Vhodné hostitelské buňky také zahrnují prokaryotické buňky. Prokaryotické buňky zahrnují, ale nejsou omezeny na, bakteriální buňky, jako jsou Gram-negativní nebo Gram-pozitivní organismy, například *E. coli*, *Bacilli* jako je *B. subtilis*, *Pseudomonas species* jako je *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans*. Například, různé kmeny *E. coli* (například HB101, DH5a, DH10 a MC1061) jsou dobře známé jako hostitelské buňky v oblasti biotechnologie. Různé kmeny *Streptomyces spp.* a podobně mohou být také použity. V současnosti jsou preferovanými hostitelskými buňkami pro produkci GDNFR proteinů bakteriální buňky (například *Escherichia coli*) a savčí buňky (například ovariální buňky čínského křečka, COS buňky atd.).

Hostitelské buňky jsou transfektovány a preferovaně transformovány výše popsánymi expresními nebo klonovacími vektory a jsou kultivovány v běžném živném mediu. Medium může být podle potřeby modifikováno pro indukci promotorů, selekci transformantů

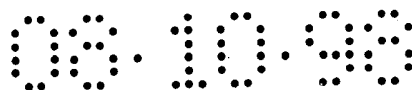


nebo pro amplifikaci genů kodujících požadované sekvence. Transfekce a transformace jsou provedeny za použití standartních technik, které jsou odborníkům v oboru dobře známé a které jsou vybrány tak, aby byly vhodné pro použitou hostitelskou buňku. Například, pro savčí buňky bez buněčné stěny může být použita metoda srážení fosforečnanem vápenatým. Také může být použita elektroporace, mikroinjekce a další známé techniky.

Kultivace hostitelských buněk

Transformované hostitelské buňky použité pro produkci GDNFR proteinu podle předkládaného vynálezu jsou kultivovány ve vhodném mediu. Medium může být doplněno podle potřeby hormony a/nebo jinými růstovými faktory (jako je inzulin, transferin, nebo epidermální růstový faktor), solemi (jako je chlorid sodný, vápník, hořčík a fosfor), pufrů (jako je HEPES), nukleosidy (jako je adenosin a thymidin), antibiotiky (jako je gentamycin), stopovými prvky (definovanými jako anorganické sloučeniny obvykle přítomné v konečných koncentracích v řádu mikromolů), a glukosou nebo jiným zdrojem energie. Mohou být také obsaženy další doplňky, ve vhodných koncentracích, podle uvážení odborníka v oboru. Vhodné kultivační podmínky, jako je teplota, pH a podobně, jsou také odborníkům v oboru použití vybraných hostitelských buněk dobře známé.

Jakmile je GDNFR protein produkován, může být izolován a přečištěn standartními technikami včetně chromatografie (například iontové výměnné, afinitní, a chromatografie na koloně s vylučováním podle velikosti), centrifugace, diferenciální rozpustnosti nebo jinými technikami pro přečištění proteinů. Konkrétně, GDNFR protein může být izolován vazbou na afinitní



kolonu obsahující GDNF nebo anti-GDNFR protilátku navázanou na stacionární nosič.

Homologní rekombinace

Dále je uvedeno, že GDNFR proteiny mohou být produkovány homologní rekombinací, nebo metodami rekombinantní produkce využívajícími kontrolní elementy zavezené do buněk již obsahujících DNA kodující GDNFR. Například, metoda homologní rekombinace může být použita pro modifikaci buněk, které obsahují normálně transkripčně silentní gen pro GDNFR nebo málo exprivovaný gen a tak je možné dosáhnout produkce buněk, které exprivují GDNFR. Homologní rekombinace je technika původně vyvinutá pro zaměření genů pro indukci nebo korekci mutací v transkripčně aktivních genech (Kucherlapati, Prog. In Nucl. Acid Res and Mol. Biol., 36: 301, 1989). Základní technika byla vyvinuta jako metoda pro zavedení specifických mutací do specifických regionů savčího genomu (Thomas et al., Cell 44: 419 - 428, 1986; Thomas and Capechi, Cell 51: 503 - 512, 1987; Doetschman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8583 - 8587, 1988) nebo pro korekci specifických mutací v defektních genech (Doetschman et al., Nature 330: 576 - 578, 1987). Příklady technik homologní rekombinace jsou popsány v U.S: 5272071 (EP 91 90 3051, EP přihláška č. 505 500; PCT/US90/07642, Mezinárodní přihláška č. WO 91/09955), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz.

Pomocí homologní rekombinace může být DNA sekvence, která má být insertována do genomu, zaměřena na specifický region požadovaného genu připojením na zaměřovací DNA. Zaměřovací DNA je DNA, která je komplementární (homologní) k regionu genomové DNA.



Malé úseky zaměřovací DNA, které jsou komplementární k specifickému regionu v genomu, jsou uvedeny do kontaktu s původním řetězcem během procesu replikace DNA. Obecnou vlastností DNA, která byla insertována do buňky je, že hybridizuje, a proto rekombinuje, s jinými úseky endogenní DNA díky společným homologním regionům. Pokud je komplementární řetězec připojen na oligonukleotid, který obsahuje mutace nebo odlišné sekvence DNA, tak je také inkorporován do nově vzniklého řetězce v důsledku rekombinace. V důsledky kontrolované čtecí funkce je možné, aby nové sekvence DNA sloužily jako templát. Tak je přenesená DNA inkorporována do genomu.

Když je sekvence určitého genu známá, jako je sekvence nukleových kyselin, pre-pro sekvence nebo expresní kontrolní sekvence GDNFR podle předkládaného vynálezu, může být syntetizován nebo jinak získán úsek DNA, který je komplementární k vybranému genu, pomocí například vhodné restrikce přirozené DNA ve specifických rozpoznávacích místech v požadovaných regionech. Tyto úseky slouží jako zaměřovací sekvence při inserci do buněk a budou hybridizovat na svůj homologní region v genomu. Pokud hybridizace proběhne během DNA replikace, pak bude tento úsek DNA, a další sekvence na něj připojené, působit jako Okazaki fragment a bude štěpován do nově syntetizovaného dceřiného řetězce DNA.

Na tyto úseky zaměřovací DNA jsou připojeny regiony DNA, které mohou interagovat s expresí GDNFR proteinu. Například, promotorový/enhancerový element, supresor, nebo exogenní transkripční modulační element je insertován do genomu vybrané hostitelské buňky v blízkosti a ve správné orientaci pro ovlivnění transkripce DNA kodující požadovaný GDNFR protein.



Kontrolní elementy nekodují GDNFR, ale kontrolují úseky DNA přítomné v genomu hostitelské buňky. Proto může být exprese GDNFR proteinů dosaženo nejenom transfekcí DNA, která koduje gen pro GDNFR samotný, ale také za použití zaměřovací DNA (obsahující regiony homologie s požadovaným endogenním genem) spojené s DNA regulačními segmenty, které poskytují endogenní genové sekvence s rozpoznávacím signálem pro transkripci GDNFR proteinu.

A. Varianty GDNFR

Jak bylo uvedeno výše, termín "analogy GDNFR" jak je zde použit zahrnuje polypeptidy, ve kterých byly aminokyseliny deletovány z ("deleční varianty"), insertovány do ("adiční varianty"), nebo substituovány za ("substituční varianty") zbytky v aminokyselinové sekvenci přirozených GDNFR polypeptidů reprezentovaných těmi, které jsou zobrazeny na obrázcích 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4). Takové varianty jsou připraveny vložením vhodných nukleotidových změn do DNA kodující polypeptid nebo chemickou syntesou požadovaného polypeptidu in vitro. Odborníkům v oboru bude jasné, že může být provedeno mnoho kombinací delecí, insercí a substitucí aminokyselinové sekvence zralého lidského GDNFR takových, že konečná molekula bude mít aktivitu GDNFR.

Na základě předloženého popisu aminokyselinových sekvencí GDNFR je možné snadno navrhnout a vyrobit mnoho sekvencí nukleových kyselin vhodných pro použití v rekombinantní (například mikrobiální) expresi polypeptidů majících primární konformaci, která se liší od konformace ukázané na obrázcích ve smyslu identity nebo umístění jednoho nebo více zbytků. Techniky mutagenese pro nahrazení, insercí nebo delecí jednoho nebo více



vybraných aminokyselinových zbytků kodovaných sekvencemi nukleových kyselin znázorněnými na obrázcích 2 a 4 jsou odborníkům v oboru dobře známé (například US patent č. 4518584, jehož objev je zde uveden jako odkaz). Existují dvě základní proměnné při konstrukci variant: lokalizace mutovaného místa a charakter mutace. Při vývoji substitučních variant GDNFR bude výběr mutačního místa a charakter mutace záviset na modifikované charakteristice GDNFR. Místa pro mutaci mohou být modifikována individuálně nebo v serii, například (1) nejprve substitucí konzervativní aminokyselinovou modifikací a potom radikálnějším výběrem podle dosaženého výsledku, (2) delecí cílového aminokyselinového zbytku, nebo (3) insercí aminokyselinového zbytku sousedícího s lokalizovaným místem. Výhodné jsou konzervativní změny od 1 do 30 sousedních aminokyselin. Proteolytickými enzymy mohou být také vytvořeny GDNFR proteinové varianty s N-koncovou a C-koncovou delecí.

Pro GDNFR deleční varianty jsou delece obvykle v rozsahu od 1 do 30 sousedních zbytků, častěji od 1 do 10 sousedních zbytků a typicky od 1 do 5 sousedních zbytků. N-koncové, C-koncové a vnitřní intrasekvenční delece jsou zde také obsaženy. Delece mohou být provedeny v regionech molekuly, které mají nízkou homologii s non-lidským GDNFR pro modifikaci aktivity GDNFR. Delece v oblastech s významnou homologií s non-lidskými GDNFR sekvencemi budou s vyšší pravděpodobností signifikantně modifikovat biologickou aktivitu GDNFR. Počet delecí bude typicky vybrán tak, aby byla zachována terciální struktura GDNFR proteinového produktu v postižené doméně, například zkřížena vazba mezi cysteiny. Nelimitující příklady delečních variant zahrnují GDNFR proteinový produkt bez N-koncových nebo C-koncových aminokyselinových zbytků. Například, může být



připraven solubilní receptor eliminací peptidového regionu účastnícího se glykosyl-fosfatidylinositolového (GPI) zakotvení GDNFR receptoru v cytoplasmatické membráně.

Pro GDNFR adiční varianty typicky obsahují adice aminokyselinové sekvence N- a/nebo C-koncové fúze nebo koncové adice v délce od jednoho zbytku až do polypeptidů obsahujících stovky nebo více zbytků, stejně jako vnitřní nebo střední adice jednoho nebo více aminokyselinových zbytků. Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou také obsahovat počáteční methioninový aminokyselinový zbytek (v pozici -1 s ohledem na první aminokyselinový zbytek požadovaného polypeptidu). Vnitřní adice mají obvykle rozsah od 1 do 10 sousedících zbytků, častěji od 1 do 5 sousedících zbytků, a nejčastěji od 1 do 3 aminokyselinových zbytků. Příklady N-koncových adičních variant obsahují GDNFR s heterologní N-koncovou signální sekvencí připojenou k N-konci GDNFR pro usnadnění sekrece zralého GDNFR z rekombinantní hostitelské buňky a tak usnadnění získávání a nebo biodostupnosti. Takové signální sekvence budou obvyčejně získány z vybrané hostitelské buňky a proto budou homologní. Adice mohou také zahrnovat aminokyselinové sekvence odvozené ze sekvence jiných neurotrofických faktorů. Například, předpokládá se produkce fúsního proteinu GDNF a GDNFR, s nebo bez vazebné sekvence, za vzniku jedné terapeutické molekuly.

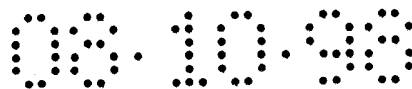
GDNFR substituční varianty mají jeden nebo více aminokyselinových zbytků aminokyselinové sekvence GDNFR odstraněn a jiný zbytek insertován místo tohoto zbytku. Takové substituční varianty zahrnují alelické varianty, které jsou charakterizovány přirozenými změnami nukleotidové sekvence v populaci druhu, které mohou nebo nemusí vést k aminokyselinovým změnám. Stejně jako v



jiných formách variant mohou substituční varianty obsahovat nahrazení jedné nebo více sousedících aminokyselinových zbytků v jedné nebo v různých lokalizacích.

Specifické mutace GDNFR aminokyselinové sekvence mohou obsahovat modifikace glykosylačního místa (například serinu, threoninu nebo asparaginu). Absence glykosylace nebo pouze částečná glykosylace vzniklá v důsledku aminokyselinové substituce nebo delece v jakémkoliv na asparagin vázaném glykosylačním místě nebo v jakémkoliv místě molekuly, které je modifikované adicí O-vázaného uhlovodanu. Glykosylační místo vázané na asparagin obsahuje tripeptidovou sekvenci, které je specificky rozpoznávána vhodnými buněčnými glykosylačními enzymy. Tyto tripeptidové sekvence jsou buď Asn-Xaa-Thr, nebo Asn-Xaa-Ser, kde Xaa je aminokyselina jiná než prolin. Mnoho aminokyselinových substitucí nebo delecí v jedné nebo v obou z první a třetí pozice glykosylačního místa (a/nebo aminokyselinová delece druhé pozice) vede k chybění glykosylace na modifikované tripeptidové sekvenci. Proto exprese vhodných pozměněných nukleotidových sekvencí produkuje varianty, které nejsou glykosylované v tomto místě. Alternativně, aminokyselinové sekvence GDNFR může být modifikována přidáním glykosylačních míst.

Jedna metoda pro identifikaci aminokyselinových zbytků nebo regionů GDNFR vhodných pro mutagenesi se nazývá "alaninová skenovací mutagenese", jak ji popisuje Cunningham a Wells (Science 244: 1081 - 1085, 1989). V této metodě jsou identifikovány aminokyselinové zbytky nebo skupiny cílových zbytků (například zbytky s nábojem jako jsou Arg, Asp, His, Lys a Glu) a jsou nahrazeny neutrálními nebo negativně nabitými



aminokyselinami (nejlépe alaninem nebo polyalaninem) pro ovlivnění interakce aminokyselin s okolním vodným prostředím v buňce nebo mimo buňku. Ty domény, které vykazují funkční sensitivitu na substituce mohou být potom dále upraveny vložением dalších nebo alternativních zbytků v místě substituce. Tak je určeno cílové místo pro vložení variací aminokyselinové sekvence, na korespondujícím cílovém kodonu nebo regionu DNA sekvence je provedena alaninová skenovací nebo náhodná mutagenese a exprivované varianty GDNFR jsou vyšetřovány na optimální kombinaci požadované aktivity a stupně aktivity.

Nejzajímavějšími místy pro substituční mutagenesi jsou ta místa, ve kterých se aminokyseliny přítomné v GDNFR proteinu od různých druhů významně liší ve smyslu objemu postraního řetězce, náboje a/nebo hydrofobicity. Jiná zajímavá místa jsou ta, ve kterých jsou určité zbytky proteinů podobných GDNFR, získaných z různých druhů, identická. Takové pozice jsou obvykle významné pro biologickou aktivitu proteinu. Nejprve jsou tato místa substituována relativně konzervativním způsobem. Takové konzervativní substituce jsou ukázány v tabulce 2 pod sloupcem výhodné substituce. Pokud takové substituce vedou ke změně biologické aktivity, pak mohou být vloženy zásadnější změny (příkladné substituce), a/nebo mohou být provedeny jiné adice nebo delece, a vzniklé produkty jsou vyšetřovány na aktivitu.



Tabulka 2 - Aminokyselinové substituce

| Původní zbytek | Výhodná substituce | Příkladné substituce |
|----------------|--------------------|---------------------------------------|
| Ala (A) | Val | Val, Leu, Ile |
| Arg (R) | Lys | Lys, Gln, Asn |
| Asn (N) | Gln | Gln, Lys, His, Arg |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Glu (E) | Asp | Asp |
| Gly (G) | Pro | Pro |
| His (H) | Arg | Asn, Gln, Lys, Arg |
| Ile (I) | Leu | Leu, Val, Met, Ala, Phe norleucin |
| Leu (L) | Ile | norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe |
| Lys (K) | Arg | Arg, Gln, Asn |
| Met (M) | Leu | Leu, Phe, Ile |
| Phe (F) | Leu | Leu, Val, Ile, Ala |
| Pro (P) | Gly | Gly |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr | Tyr |
| Tyr (Y) | Phe | Trp, Phe, Thr, Ser |
| Val (V) | Leu | Ile, Leu, Met, Phe, Ala norleucin |

Konzervativní modifikace aminokyselinové sekvence (a odpovídající modifikace kodující sekvence nukleových kyselin) by

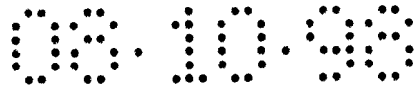


měly produkovat GDNFR proteinové produkty mající funkční a chemické charakteristiky podobné charakteristikám přirozeného GDNFR. Naopak, významné modifikace funkčních a/nebo chemických charakteristik GDNFR proteinových produktů mohou být provedeny výběrem substitucí, které se významně liší ve svém účinku na udržení (a) struktury polypeptidového skeletu v oblasti substituce, například konformace šroubovice nebo listu, (b) náboje nebo hydrofobicity molekuly v cílovém místě, nebo (c) objemu postraního řetězce. Přirozené zbytky mohou být rozděleny do skupin na základě společných vlastností postraního řetězce:

- 1) hydrofobní: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile
- 2) neutrální hydrofilní: Cys, Ser, Thr
- 3) kyselé: Asp, Glu
- 4) basické: Asn, Gln, His, Lys, Arg
- 5) zbytky, které ovlivňují orientaci řetězce: Gly, Pro
- 6) aromatické: Trp, Tyr, Phe.

Nekonzervativní substituce obsahují výměnu člena jedné z těchto skupin za člena z jiné z těchto skupin. Takové substituované zbytky mohou být vloženy do regionů lidského GDNFR proteinu, které jsou homologní s non-lidskými GDNFR proteiny, nebo do nehomologních regionů molekuly.

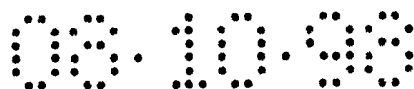
Proto, GDNFR proteiny, analogy nebo deriváty zahrnují, ale nejsou omezeny na, ty biologicky aktivní molekuly, které obsahují, jako primární aminokyselinovou sekvenci, celou nebo část aminokyselinové sekvence jak je znázorněna na obrázcích 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4). Proteiny budou obsahovat pozměněné sekvence, ve kterých jsou biologicky ekvivalentní aminokyselinové zbytky substituovány za zbytky v sekvenci za



vzniku silentních změn. Například, jeden nebo více aminokyselinových zbytků v sekvenci může být substituován jinou aminokyselinou podobné polaroty, která působí jako funkční ekvivalent, což vede ke vzniku silentní alterace. Substituenty pro aminokyseliny v sekvenci mohou být vybrány z jiných členů skupiny, ke kterým substituovaná aminokyselina náleží. Například, nepolární (hydrofobní) aminokyseliny zahrnují alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. Polární neutrální aminokyseliny zahrnují glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. Pozitivně nabitě (bazické) aminokyseliny zahrnují arginin, lysin a histidin. Negativně nabitě (kyselé) aminokyseliny zahrnují kyselinu asparagovou a kyselinu glutamovou. Také se předpokládá, že GDNFR proteiny, analogy, nebo jejich fragmenty nebo deriváty mohou být různě modifikovány po translaci, například fosforylací, glykosylací, zkříženou vazbou, acylací, proteolytickým štěpením, vazbou na protilátkovou molekulu, membránovou molekulu nebo na jiný ligand.

B. Deriváty GDNFR

Chemicky modifikované deriváty GDNFR nebo GDNFR analogů mohou být odborníkem v oboru připraveny na základě předkládaného vynálezu. Chemické skupiny nejvhodnější pro derivatizaci zahrnují ve vodě rozpustné polymery. Ve vodě výhodný polymer je výhodný proto, že protein, na který je připojen, se nesráží ve vodném prostředí, jako je fyziologické prostředí. Výhodně bude polymer farmaceuticky přijatelný pro přípravu terapeutických produktů nebo kompozic. Odborník v oboru bude schopen vybrat požadovaný polymer na základě takových úvah, jako je to, zda konjugát protein/polymer bude použit terapeuticky, a pokud ano, tak v jaké

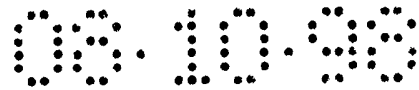


dávce, požadované době cirkulace, resistance na proteolýzu a podobně. Účinnost derivatizace může být určena podáním derivátu, požadovaným způsobem (například osmotickou pumpou, nebo lépe injekcí nebo infusí, nebo dále formulovaného pro orální, plicní nebo jiné způsoby podání) a určením jeho účinnosti.

Vhodné ve vodě rozpustné polymery zahrnují, ale nejsou omezeny na, polyethylenglykol, kopolymery ethylenglykol/propylenglykol, karboxymethylcelulosu, dextran, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, ethylen/kopolymer anhydridu kyseliny maleinové, polyaminokyseliny (buďhomopolymery nebo náhodné kopolymery) a dextran nebo poly(n-vinylpyrrolidon)polyethylenglykol, homopolymery propylenglykolu, kopolymery polypropylenoxid/ethylenoxid, polyoxyethylované polyoly (například glycerol), polyvinylalkohol, a jejich směsi. Polyethylenglykolpropionaldehyd má ve výrobě výhodu své stability ve vodě.

Polymery mohou mít jakoukoliv molekulovou hmotnost a mohou být rozvětvené nebo nerozvětvené. Pro polyethylenglykol je výhodná molekulová hmotnost mezi asi 2 kDa a asi 100 kDa pro snadné zpracování a manipulaci (termín "asi" znamená, že v přípravku polyethylenglykolu mohou mít některé molekuly hmotnost vyšší a některé nižší než je uvedená molekulová hmotnost). Mohou být použity jiné velikosti, podle požadovaného terapeutického profilu (například trvání zpomaleného uvolňování; účinnosti biologické aktivity, pokud je nějaká; snadnosti zpracování; stupni nebo chybění antigenicity nebo jiných známých účinků polyethylenglykolu na terapeutický protein nebo variantu).

Počet takto připojených polymerových molekul se bude lišit a



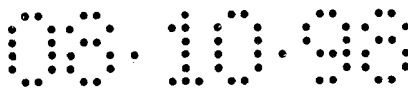
odborník v oboru bude schopen zajistit jejich účinek na funkci. Mohou být vytvořeny mono-derivatizace, nebo di-, tri-, tetra- nebo jiné kombinace derivatizace, se stejnými nebo s různými chemickými skupinami (například polymery, jako jsou polyethylenglykoly o různé molekulové hmotnosti). Poměr polymerových molekul k molekulám proteinu (nebo peptidu) se bude lišit, stejně jako jejich koncentrace v reakční směsi. Obecně, optimální poměr (ve smyslu účinnosti reakce, kde není přebytek nezreagovaného proteinu nebo polymeru) bude určen faktory, jako je požadovaný stupeň derivatizace (například mono-, di-, tri-, atd.), molekulovou hmotností vybraného polymeru, rozvětvenosti nebo nerozvětvenosti polymeru a na reakčních podmínkách.

Molekuly polyethylenglykolu (nebo jiných chemických skupin) by měly být připojeny na protein po zvážení jejich účinků na funkční nebo antigenní domény proteinu. V oboru existuje mnoho metod pro připojení. Viz například EP 0401384, jejíž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz (připojování PEG na G-CSF), viz též Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028 - 1035, 1992 (popisující pegylaci GM-CSF za použití tresylchloridu). Například, polyethylenglykol může být kovalentně navázán na aminokyselinové zbytky přes reaktivní skupiny, jako je volná amino nebo karboxylová skupina. Reaktivní skupiny jsou ty, na které může být připojena reaktivní molekula polyethylenglykolu. Aminokyselinové zbytky mající volnou amino skupinu zahrnují lysinové zbytky a N-koncové aminokyselinové zbytky. Zbytky mající volnou karboxylovou skupinu zahrnují kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou a C-koncové aminokyselinové zbytky. Sulfhydrylové skupiny mohou být také použity jako reaktivní skupiny pro připojení polyethylenglykolových molekul. Pro terapeutické účely je preferováno připojení na amino skupinách, jako je připojení na



N-koncové nebo lysinové skupině. Pokud je požadována receptorová vazba, pak by mělo být vyloučeno připojení na zbytky významné pro receptorovou vazbu.

Může být specificky požadován N-koncově chemicky modifikovaný protein. Za použití polyethylenglykolu jako ilustrace presentovaných kompozic je možný výběr z mnoha polyethylenglykolových molekul (podle molekulové hmotnosti, větvení atd.), poměrů polyethylenglykolových molekul k molekulám proteinu (nebo peptidu) v reakční směsi, typů provedené pegylační reakce, a způsobu pro získání vybraného N-koncově pegylovaného proteinu. Způsob pro získání N-koncově pegylovaného proteinu (t.j. separování této skupiny od jiných monopegylovaných skupin, pokud je to nutné) může být přečištění N-koncově pegylovaného materiálu od populace pegylovaných proteinových molekul. Selektivní N-koncová chemická modifikace může být provedena redukční alkyací, která využívá různé reaktivity různých typů primárních amino skupin (lysinové versus N-koncové) dostupných pro derivatizaci určitého proteinu. Za vhodných podmínek je dosažena v podstatě selektivní derivatizace proteinu na N-konci s polymerem obsahujícím karbonylovou skupinu. Například, je možné selektivně N-koncově pegylovat protein provedením reakce při pH, které umožňuje využít výhodu rozdílu pKa mezi ϵ -amino skupinou lysinu a α -amino skupinou N-koncového zbytku proteinu. Takovou selektivní derivatizací je kontrolováno připojení polymeru rozpustného ve vodě na protein: konjugace s polymerem probíhá přednostně na N-konci proteinu a neprobíhají žádné signifikantní modifikace jiných reaktivních skupin, jako jsou amino skupinu postraních řetězců lysinu. Při použití redukční alkylace může být polymer rozpustný ve vodě stejného typu jako je popsáno výše a měl by mít jednu reaktivní aldehydovou skupinu pro připojení na



protein. Může být použit polyethylenglykolpropionaldehyd, obsahující jeden reaktivní aldehyd.

Předkládaný vynález předpokládá použití derivátů, kterými jsou GDNFR exprimované v prokaryotech, nebo jeho varianta, navázaná na alespoň jednu molekulu polyethylenglykolu, stejně jako použití GDNFR nebo jeho variant připojených na jednu nebo více molekul polyethylenglykolu prostřednictvím acylové nebo alkylové vazby.

Pegylace může být provedena jakoukoliv z pegylačních reakcí známých v oboru. Viz například: Focus on Growth Factors 3(2): 4 - 10, 1992; EP 0154316, jejíž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz; EP 0401384; a jiné publikace zde citované, které se týkají pegylace. Pegylace může být provedena pomocí acylační reakce nebo alkylační reakce s reaktivní molekulou polyethylenglykolu (nebo analogicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě).

Pegylace acylací obecně vyžaduje reakci aktivního esterového derivátu polyethylenglykolu (PEG) s GDNFR proteinem nebo variantou. Jakákoliv známá nebo v budoucnu objevená reaktivní PEG molekula může být použita pro provedení pegylace GDNFR proteinu nebo varianty. Výhodným aktivovaným PEG esterem je PEG esterifikovaný na N-hydroxysukcimid (NHS). Jak je zde uvedeno, zahrnuje termín "acylace" bez omezení následující typy vazby mezi terapeutickým proteinem a polymerem rozpustným ve vodě jako je polyethylenglykol: amidovou, karbamatovou, urethanovou a podobně. Viz Bioconjugate Chem., 5: 133 - 140, 1994. Reakční podmínky mohou být vybrány z jakýchkoliv podmínek známých, nebo v budoucnosti vyvinutých, v oboru pegylace, ale nemohou být použity podmínky jako je teplota, rozpouštědlo, a pH, které by mohly inaktivovat modifikovaný GDNFR protein nebo variantu.



Pegylace acylací obecně povede ke vzniku poly-pegylovaného GDNFR proteinu nebo varianty. Výhodně bude spojovací vazba amidová. Také výhodně bude vzniklý produkt v podstatě pouze (například > 95%) mono, di- nebo tri-pegylován. Nicméně, mohou být vytvořeny některé druhy s vyšším stupněm pegylace, v množství závislejícím na specifických použitých reakčních podmínkách. Pokud je to žádoucí, může být více přečištěných pegylovaných druhů separováno ze směsi, zejména nereagované směsi, standartními technikami přečištění, včetně, mimo jiné, dialýzy, vysolování, ultrafiltrace, iontové výměnné chromatografie, gelové filtrační chromatografie a elektroforesy.

Pegylace alkylací obecně vyžaduje reakci koncového aldehydového derivátu polyethylenglykolu s GDNFR proteinem nebo variantou za přítomnosti redukčního činidla. Pegylace alkylací obecně povede ke vzniku poly-pegylovaného GDNFR proteinu nebo varianty. Kromě toho, je možné upravit reakční podmínky tak, aby byla umožněna pegylace v podstatě pouze na α -amino skupině N-konce GDNFR proteinu nebo varianty (t.j. mono-pegylovaný protein). At v případě monopegylace nebo polypegylace, PEG skupiny jsou výhodně připojeny na protein prostřednictvím $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ skupiny. Vzhledem k $-\text{CH}_2-$ skupině je zde tento typ vazby označován jako "alkylová" vazba.

Derivatizace redukční alkylací k produkci monopegylovaných produktů využívá různé reaktivity různých typů primárních aminoskupin (lysinové versus N-koncové) dostupných pro derivatizaci. reakce je provedena při pH, které umožňuje využít výhodu rozdílu pKa mezi ϵ -amino skupinou lysinu a α -amino skupinou N-koncového zbytku proteinu. Takovou selektivní derivatizací je kontrolováno připojení polymeru rozpustného ve



vodě na protein: konjugace s polymerem probíhá přednostně na N-konci proteinu a neprobíhají žádné signifikantní modifikace jiných reaktivních skupin, jako jsou amino skupiny postraních řetězců lysinu. V jednom důležitém aspektu obsahuje předkládaný vynález použití v podstatě homogenního přípravku molekul konjugátu monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta) (což znamená GDNFR protein nebo varianta, na který byla molekula polymeru připojena v podstatě pouze (t.j. > 95%) v jedné lokalitě). Přesněji, pokud je použit polyethylenglykol, tak předkládaný vynález také obsahuje použití pegylovaného GDNFR proteinu nebo varianty bez možných antigenních skupin a s molekulou polyethylenglykolu přímo připojenou na GDNFR protein nebo variantu.

Tak GDNFR proteinové produkty podle předkládaného vynálezu zahrnují pegylovaný GDNFR protein nebo varianty, ve kterých je PEG skupina(y) připojena(y) prostřednictvím acylových nebo alkylových skupin. Jak bylo uvedeno výše, takové produkty mohou být mono-pegylované nebo polypegylované (například obsahující 2 - 6, výhodně 2 - 5, PEG skupin). PEG skupiny jsou obvykle připojeny na protein na α - nebo ϵ -amino skupinách aminokyselin, ale také se předpokládá, že PEG skupiny mohou být připojeny na jakékoliv amino skupiny připojené na protein, které jsou dostatečně reaktivní pro připojení PEG skupin za vhodných reakčních podmínek.

Polymerové molekuly použité v přístupu acylace i alkylace mohou být vybrány z mnoha polymerů rozpustných ve vodě, jak je popsáno výše. Vybraný polymer by měl být modifikován tak, aby měl jednu reaktivní skupinu, jak je aktivní aktivní ester pro acylaci nebo aldehyd pro alkylici, výhodně, tak, aby mohl být kontrolován



stupeň polymerizace, jak je poskytnuto pro předkládané metody. Příkladem reaktivního PEG aldehydu je polyethylenglykolpropionaldehyd, který je stabilní ve vodě, nebo jeho mono C1-C10 alkoxy nebo aryloxy deriváty (viz US patent 5252714). Polymer může být rozvětvený nebo nerozvětvený. Pro acylační reakce by vybraný polymer měl mít jednu reaktivní esterovou skupinu. Pro redukční alkylation by vybraný polymer měl mít jednu reaktivní aldehydovou skupinu. Obecně, polymery rozpustné ve vodě nebudou vybrány z přirozeně se vyskytujících glykosylových zbytků, protože tyto jsou častěji výhodně vyráběny savčími rekombinantními expresními systémy. Polymer může být jakékoliv molekulové hmotnosti a může být rozvětvený nebo nerozvětvený.

Příkladem polymeru rozpustného ve vodě, který je zde použit, je polyethylenglykol. Jak je zde použito, znamená polyethylenglykol jakoukoliv formu PEG, která byla použita pro derivatizaci jiných proteinů, jako je mono-(C1-C10)alkoxy- nebo aryloxy-polyethylenglykol.

Obecně, chemická derivatizace může být provedena za jakýchkoliv vhodných podmínek použitých pro reakci biologicky aktivních sloučenin s aktivovanou molekulou polymeru. Způsoby pro přípravu pegylovaného GDNFR proteinového produktu budou obecně obsahovat kroky: (a) reakce GDNFR proteinového produktu s polyethylenglykolem (jako je reaktivní ester nebo aldehydový derivát PEG) za podmínek, kdy se protein připojuje na jednu nebo více PEG skupin, a (b) získání reakčního produktu. Obecně, optimální reakční podmínky pro acylační reakce budou určeny případ od případu podle známých parametrů a požadovaných výsledků. Například, čím vyšší poměr PEG:protein, tím vyšší

procento polyegylovaného produktu.

Redukční alkylace použitá k produkci v podstatě homogenní populace mono-polymer/GDNFR proteinový produkt bude obecně obsahovat kroky: (a) reakci GDNFR proteinu nebo varianty s reaktivní PEG molekulou za podmínek redukční alkylace, při pH vhodném pro selektivní modifikaci α -amino skupiny na amino-konci uvedeného GDNFR proteinu nebo varianty; a (b) získání reakčního produktu.

Pro v podstatě homogenní populaci mono-polymer/GDNFR proteinový produkt jsou podmínky redukční alkylace takové, které umožňují selektivní připojení skupiny polymeru rozpustného ve vodě na N-konec GDNFR proteinu nebo varianty. Takové reakční podmínky obvykle umožňují využití rozdílu v pK_a mezi lysinovou amino skupinou a α -amino skupinou v N-konci (pK_a je pH, při kterém je 50% aminoskupin protonováno a 50% nikoliv). pH také ovlivňuje použitý poměr polymeru ku proteinu. Obecně, pokud je pH, pak bude nutný vyšší poměr polymeru ku proteinu (t.j. čím méně reaktivních N-koncových α -amino skupin, tím více polymeru je potřeba pro dosažení optimálních podmínek). Pokud je pH vyšší, pak nemusí být poměr polymer:protein tak vysoký (t.j. čím více reaktivních skupin, tím méně je potřeba molekul polymeru). Pro účely předkládaného vynálezu bude pH obvykle v rozmezí 3 - 9, výhodně 3 - 6.

Jinou významnou vlastností je molekulová hmotnost polymeru. Obecně, čím vyšší molekulová hmotnost polymeru, tím méně molekul polymeru může být připojeno na protein. Podobně musí být při optimalizaci parametrů vzato v úvahu větvení polymeru. Obecně, čím vyšší molekulová hmotnost (nebo vyšší větvení), tím vyšší

poměr polymer:protein. Obecně, pro pegylační reakce podle předkládaného vynálezu je výhodná průměrná molekulová hmotnost asi 2 kDa až 100 kDa. Výhodná průměrná molekulová hmotnost je asi 5 kDa až asi 50 kDa, zejména výhodná je molekulová hmotnost asi 12 kDa až 25 kDa. Poměr polymeru rozpustného ve vodě k GDNFR proteinu nebo variantě bude obvykle v rozsahu od 1:1 do 100:1, výhodně (pro polypegylaci) 1:1 až 20:1 a (pro monopegylaci) 1:1 až 5:1.

Za použití podmínek ukázaných výše umožní redukční alkylace selektivní připojení polymeru na jakýkoliv GDNFR protein nebo variantu mající α -amino skupinu na amino konci, a umožní přípravu v podstatě homogenního konjugátu monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta). Termín "konjugát monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta)" jak je zde použit označuje kompozici složenou z jedné molekuly polymeru připojené na molekulu GDNFR proteinu nebo varianty GDNFR proteinu. Konjugát monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta) bude typicky mít polymer umístěný na N-konci, ale ne na amino skupině postraního řetězce lysinu. Přípravek by měl být více než z 90% konjugát monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta) a lépe více než z 95% konjugát monopolymer/GDNFR protein (nebo varianta), kde zbývající pozorovatelné molekuly nejsou zreagovány (t.j. jde o protein bez polymerové skupiny). Také se předpokládá, že GDNFR proteinový produkt může obsahovat přípravu pegylované molekuly obsahující fúsní protein nebo navzájem vázané molekuly GDNF a GDNFR.

Pro předkládanou redukční alkylici by mělo být redukční činidlo stabilní ve vodném roztoku a mělo by být schopné redukovat pouze Schiffovu bazi tvořenou v počátku procesu redukční alkylace. Vhodné redukční činidlo může být vybráno z



borohydrid sodný, kyanoborohydrid sodný, dimethylaminboran, trimethylaminboran a pyridin boran. Zejména vhodným redukčním činidlem je kyanoborohydrid sodný. Další reakční parametry, jako je rozpouštědlo, reakční doby, teploty atd, a prostředky pro přečištění produktů, mohou být určeny případ od případu na základě publikací týkajících se derivatizace proteinů s polymery rozpustnými ve vodě (viz publikace zde citované).

C. Farmaceutické přípravky GDNFR proteinového produktu

Farmaceutické přípravky GDNFR proteinového produktu typicky obsahují terapeuticky nebo profylakticky účinné množství GDNFR proteinového produktu ve směsi s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými formulačními materiály vybranými podle způsobu podání. Vhodné formulační materiály zahrnují, ale nejsou omezeny na, antioxidační činidla, konzervační činidla, barviva, ochucovací a ředící činidla, emulsifikační činidla, suspendační činidla, rozpouštědla, plnidla, objemová činidla, pufry, vehikula pro podání, ředidla, přísady a/nebo farmaceutická adjuvans. Například, vhodným vehikulem může být voda pro injekce, fyziologický roztok, nebo arteficiální mozkomíšní mok, podle potřeby doplněná dalšími materiály běžnými v přípravcích pro parenterální podání. Neutrální pufrovaný salinický roztok nebo salinický roztok smísený se sérovým albuminem jsou další příklady vehikul. Termín "farmaceuticky přijatelný nosič", jak je zde použito, označuje formulační materiál vhodný pro provedení nebo zlepšení podání GDNFR proteinového produktu jako farmaceutického přípravku.

Primární rozpouštědlo ve vehikulu může být vodného nebo nevodného charakteru. Kromě toho, vehikulum může obsahovat další

formulační materiály pro modifikaci nebo pro udržení pH, osmolarity, viskozity, čirosti, barvy, sterility, stability, rychlosti rozpouštění nebo zápachu formulace. Podobně, vehikulum může obsahovat další formulační materiály pro modifikaci nebo pro udržení rychlosti uvolňování GDNFR proteinového produktu, nebo pro absorpci nebo penetraci GDNFR proteinového produktu přes hematoencefalickou bariéru.

Po formulování farmaceutického přípravku může být přípravek uskladněn ve sterilních fíolách jako roztok, suspenze, gel, emulze, pevná látka, nebo dehydratovaný nebo lyofilizovaný prášek. Takové formulace mohou být uskladněny buď ve formě připravené pro použití, nebo ve formě (například lyofilizované), která vyžaduje rekonstituci před podáním.

Optimální farmaceutická formulace bude odborníkem v oboru určena na základě zamýšleného způsobu podání a požadované dávky. Viz například Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), strany 1435 - 1712, která je zde uvedena jako odkaz. Takové přípravky mohou ovlivňovat fyzikální stav, stabilitu, rychlost in vivo uvolňování a rychlost in vivo klírens proteinů a derivátů podle předkládaného vynálezu.

Také jsou navrženy účinné formy pro podání, jako jsou (1) přípravky s prodlouženým uvolňováním, (2) inhalační aerosoly, nebo (3) orálně aktivní přípravky. Farmaceutické přípravky GDNFR proteinového produktu mohou být také formulovány pro parenterální podání. Takové farmaceutické přípravky pro parenterální podání jsou typicky apyrogenní, parenterálně přijatelné vodné roztoky obsahující GDNFR proteinový produkt ve farmaceuticky přijatelném

vehikulu. Jedním výhodným vehikulem je fyziologický roztok. Farmaceutické přípravky GDNFR proteinového produktu mohou také obsahovat jednotlivé přípravky polymerických sloučenin jako je polymléčná kyselina, kyselina polyglykolová atd. nebo mohou obsahovat liposomy. Může být také použita kyselina hyaluronová a ta může zajistit prodlouženou dobu cirkulace.

Zejména vhodným vehikulem pro parenterální podání je sterilní destilovaná voda, ve které je GDNFR proteinový produkt formulován jako sterilní, izotonický roztok, který je řádně konzervován. Ještě jiný přípravek může obsahovat formulaci GDNFR proteinového produktu s činidlem, jako jsou injikovatelne mikrosféry nebo liposomy, které zajistí zpomalené uvolňování proteinu, který může být potom podán jako depotní injekce. Jiné vhodné prostředky pro podání GDNFR proteinového produktu zahrnují implantovatelné prostředky pro podání léčiva, které obsahují GDNFR proteinový produkt.

Přípravky podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat další složky, například parenterálně přijatelná konzervační činidla, tonizující činidla, pomocná rozpouštědla, zvlhčovací činidla, činidla podporující tvorbu komplexů, pufry, antimikrobiální činidla, antioxidanty a surfaktanty, které jsou v oboru dobře známé. Například, vhodná činidla zvyšující tónicitu zahrnují halidy alkalických kovů (výhodně chlorid sodný nebo draselný), manitol, sorbitol, a podobně. Vhodná konzervační činidla zahrnují, ale nejsou omezena na, benzalkoniumchlorid, thimerosal, fenethylalkohol, methylparaben, propylparaben, kyselinu sorbovou a podobně. Peroxid vodíku může být také použit jako konzervační činidlo. Vhodná pomocná rozpouštědla jsou například glycerin, propylenglykol a polyethylenglykol. Vhodná činidla podporující

tvorbu komplexů jsou například coffein, polyvinylpyrrolidon, beta-cyklodextrin nebo hydroxypropyl-beta-cyklodextrin. Vhodné surfaktanty nebo zvlhčující činidla jsou například estery sorbitanu, polysorbáty jako je polysorbat 80, tromethamin, lecitin, cholesterol, tyloxapal a podobně. Pufry mohou být běžné pufry jako je boritanový, citratový, fosfatový, bikarbonatový nebo Tris-HCl.

Složky přípravku jsou v koncentracích, které jsou přijatelné pro místo podání. Například, pufry jsou použité pro udržení přípravku při fyziologickém pH nebo při mírně nižším pH, typicky při pH v rozmezí od 5 do 8.

Farmaceutické přípravky mohou být formulovány pro inhalaci. Například, GDNFR proteinový produkt může být formulován jako suchý prášek pro inhalaci. Inhalační roztoky GDNFR proteinového produktu mohou být také formulovány v hnací kapalina pro podání ve formě aerosolu. V ještě jiném provedení může být roztok nebulizován.

Také se předpokládá, že některé formulace obsahující GDNFR proteinový produkt budou podány orálně. GDNFR proteinový produkt, který je podán tímto způsobem, může být formulován s nebo bez nosičů, které jsou běžně používány pro přípravu pevných dávkových forem jako jsou tablety a kapsle. Například, může být navržena kapsle, která bude uvolňovat aktivní část formulace v místě gastrointestinálního traktu, ve kterém je biodostupnost maximalizována a pre-systemová degradace je minimalizována. Mohou být obsaženy další formulační materiály pro usnadnění absorpce GDNFR proteinového produktu. Také mohou být použita ředidla, ochucovací činidla, vosky s nízkou teplotou tání, rostlinné

oleje, lubrikanty, suspenzační činidla, činidla podporující rozpadavost tablet a pojiva.

Jiný přípravek může obsahovat účinné množství GDNFR proteinového produktu ve směsi s netoxickou přísadou, která je vhodná pro přípravu tablet. Rozpuštěním tablet ve sterilní vodě, nebo v jiném vhodném vehikulu, může být připraven roztok v jednotkové dávkové formě. Vhodné přísady zahrnují, ale nejsou omezeny na, inertní ředidla, jako je uhličitan vápenatý, uhličitan sodný nebo bikarbonat, laktosa, nebo fosforečnan vápenatý; nebo pojiva jako je škrob, želatina nebo akacie; nebo lubrikační činidla jako je stearan hořečnatý, kyselina stearová nebo talek.

Další formulace GDNFR proteinového produktu budou odborníkům v oboru zřejmé, včetně formulací obsahujících GDNFR proteinový produkt v kombinaci s GDNF proteinovým produktem. Techniky pro formulování mnoha dalších prostředků se zpomaleným nebo kontrolovaným uvolňováním, jako jsou liposomové nosiče, bioerodovatelné mikročástice nebo porosní korálky a depotní injekce, jsou také odborníkům v oboru známé. Viz například Supersaxo et al., který popisuje porosní polymerické mikročástice s kontrolovaným uvolňováním pro podání farmaceutických přípravků (Mezinárodní přihláška č. WO 93/15722; Mezinárodní přihláška č. PCT/US93/00829), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz.

D. Podání GDNFR proteinového produktu

GDNFR proteinový produkt může být podán parenterálně mnoha způsoby, včetně subkutáního, intramuskulárního, intravenosního, transpulmonálního, transdermálního, intrathekálního a

intracerebrálního podání. Kromě toho, proteinové faktory, které neprocházejí snadno přes hematoencefalickou bariéru, mohou být podány přímo intracerebrálně nebo jinak spolu s dalšími elementy, které je budou transportovat přes bariéru. Například, GDNFR proteinový produkt může být podán intracerebroventrikulárně nebo do mozkového nebo míšního subarachnoidálního prostoru. GDNFR proteinový produkt může být také podán intracerebrálně přímo do mozkového parenchymu. GDNFR proteinový produkt může být podán extracerebrálně ve formě, která byla chemicky modifikována nebo která byla obalena tak, že prostupuje hematoencefalickou bariérou, s jedním nebo s více činidly, které podporují penetraci GDNFR proteinového produktu přes bariéru. Například, bylo prokázáno, že konjugát NGF a monoklonálních protilátek proti receptoru pro transferin je transportován do mozku pomocí vazby na receptory pro transferin.

Pro dosažení požadovaných hladin GDNFR proteinového produktu mohou být podány opakované denní nebo méně časté injekce, nebo může být GDNFR proteinový produkt podán infusí kontinuálně nebo periodicky pomocí implantované pumpy s konstantním nebo programovatelným průtokem. GDNFR proteinový produkt může být také podán pomocí implantátů se zpomaleným uvolňováním obsahujících neurotrofní faktor zanořený do biodegradovatelné polymerové matrice. Frekvence a dávkování bude záviset na farmakokinetických parametrech formulace GDNFR proteinového produktu a na způsobu a místě podání.

Bez ohledu na způsob podání může být vypočítána specifická dávka podle tělesné hmotnosti, povrchu těla nebo podle velikosti orgánu. Další úprava výpočtu nezbytného pro určení vhodných dávek pro léčbu každou z výše uvedených formulací je odborníky běžně



prováděna a patří k úkonů, které jsou jimi běžně prováděny. Vhodné dávky mohou být ozřejměny použitím vhodných dat dávka - odpověď.

Konečný dávkový režim v metodách pro léčbu specifického poranění nebo onemocnění bude určen ošetřujícím lékařem. Obecně, účinné množství presentovaných GDNFR polypeptidů bude určeno po zvážení různých faktorů, které modifikují účinek léku, například věku, zdravotního stavu, pohlaví a dietních návyků pacienta, závažnosti jakékoliv infekce, době podání a jiných klinických faktorů. Viz Remington's Pharmaceutical Sciences, výše, strany 697 - 773, která je zde uvedena jako odkaz. Předpokládá se, že pokud je GDNFR použit pro zvýšení účinku GDNF, pak je dávka GDNFR vybrána tak, aby byla podobná dávce nutné pro GDNF terapii; pokud je GDNFR použit k antagonizaci účinku GDNF, pak je dávka GDNFR vybrána tak, aby byla několikanásobně vyšší než dávka GDNF. Dávkování může být jedenkrát nebo vícekrát denně, nebo méně často, a může být provedeno ve spojení s jinými přípravky, které jsou zde popsány. Mělo by být uvedeno, že předkládaný vynález není omezen zde uvedenými dávkami.

Předpokládá se, že kontinuální podání nebo zpomalené podání GDNFR proteinového produktu může být výhodné pro danou léčbu. Ačkoliv může být kontinuální podání provedeno pomocí mechanických prostředků, jako je infusní pumpa, předpokládá se možnost použití jiných způsobů pro kontinuální nebo téměř kontinuální podání. Například, chemická derivatizace nebo enkapsulace může vést ke vzniku forme proteinu se zpomaleným uvolňováním, které zajistí kontinuální přítomnost proteinu v krvi, v předpověditelných množstvích, na základě určeného dávkového režimu. Proto zahrnují GDNFR proteinové produkty proteiny derivatizované nebo jinak



formulované pro zajištění takového kontinuálního podání. Formy GDNFR proteinového produktu se zpomaleným uvolňováním budou formulovány tak, aby dodaly požadovanou denní nebo týdenní účinnou dávku.

Dále je předpokládáno, že GDNFR proteinový produkt může být podán v kombinované formě spolu s GDNF. Alternativně mohou být GDNFR proteinový produkt a GDNF proteinový produkt podány separovaně, buď sekvenčně nebo simultáně.

GDNFR proteinový produkt podle předkládaného vynálezu může být také použit, samostatně nebo v kombinaci s jinými růstovými faktory, při léčbě nervových onemocnění. Kromě toho, jiné faktory nebo molekuly, včetně chemických kompozic, mohou být použity spolu s GDNFR proteinovým produktem. Při léčbě Parkinsonovi nemoci se předpokládá, že GDNFR proteinový produkt může být použit samostatně nebo v kombinaci s podáním levodopy, kdy bude GDNFR zvyšovat aktivitu endogenního GDNF a tak zvyšovat vychytávání zvýšených koncentrací dopaminu neurony.

Jak bylo uvedeno výše, také se předpokládá, že další neurotrofické nebo neurony podporující faktory budou užitečné nebo nezbytné pro léčbu některých neuronálních populací nebo některých typů poškození nebo onemocnění. Další faktory, které mohou být použity spolu s GDNFR nebo kombinací GDNF a GDNFR zahrnují, ale nejsou omezeny na: mitogeny jako je inzulin, inzulinu podobné růstové faktory, epidermální růstový faktor, vazoaktivní růstový faktor, pituitární adenylat cyklastu aktivující polypeptid, interferon a somatostatin; neurotrofické faktory jako je nervový růstový faktor, neurotrofický faktor odvozený z mozku, neurotrofin 3, neurotrofin 4/5, neurotrofin 6,



inzulinu podobný růstový faktor, ciliární neurotrofický faktor, kyselý a bazický fibroblastový růstový faktor, fibroblastový růstový faktor 5, transformující růstový faktor- β , kokainem-amfetaminem regulovaný transkript/CART; a další růstové faktory jako je epidermální růstový faktor, leukemický inhibiční faktor, interleukiny, interferony a kolonie stimulující faktory, stejně jako molekuly a materiály, které jsou funkčními ekvivalenty těchto faktorů.

Buněčná a genová terapie GDNFR proteinovým produktem

Buněčná terapie GDNFR proteinovým produktem, například intracerebrální implantace buněk produkujících GDNFR proteinový produkt, je také předpokládána. Toto provedení bude obsahovat implantaci buněk pacientovi, kde tyto buňky jsou schopné syntetizování a sekrece biologicky aktivní formy GDNFR proteinového produktu. Takové buňky produkující GDNFR proteinový produkt mohou být buňky, které přirozeně produkují GDNFR proteinový produkt, nebo to mohou být buňky, jejichž schopnost produkovat GDNFR proteinový produkt byla zvýšena transformací genem kodujícím požadovaný GDNFR proteinový produkt. Taková modifikace může být provedena pomocí vektoru vhodného pro přenesení genu, stejně jako pro navození jeho exprese a sekrece. Pro minimalizaci potenciálních imunologických reakcí u pacientů, kterým je podán GDNFR proteinový produkt cizího druhu je výhodné, aby byly buňky přirozeně produkující GDNFR proteinový produkt lidského původu a aby produkovaly lidský GDNFR proteinový produkt. Podobně, je výhodné, aby rekombinantní buňky produkující GDNFR proteinový produkt byly transformovány expresním vektorem obsahujícím gen kodující lidský GDNFR proteinový produkt.



Implantované buňky mohou být enkapsulované pro zamezení infiltrace okolní tkáně. Lidské nebo non-lidské zvířecí buňky mohou být pacientům implantovány v biokompatibilních, semipermeabilních kontainerech nebo membránách, které umožní uvolňování GDNFR proteinového produktu, ale zabrání destrukci buněk imunitním systémem pacienta nebo škodlivými faktory z okolní tkáně. Alternativně, vlastní buňky pacienta, transformované ex vivo tak, aby produkovaly GDNFR proteinový produkt, mohou být implantovány pacientovi přímo bez takové enkapsulace.

Techniky pro enkapsulaci živých buněk jsou odborníkům v oboru dobře známé a příprava enkapsulovaných buněk a jejich implantace pacientovi může být provedena bez zbytečného experimentování. Například, Baetge et al. (Mezinárodní přihláška č. WO 95/05452; Mezinárodní přihláška č. PCT/US94/09299, jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz) popisuje biokompatibilní kapsle obsahující geneticky zpracované buňky pro efektivní podání biologicky aktivních molekul. Kromě toho, viz US patenty č. 4892538, 5011472 a 5106627, které jsou zde uvedeny jako odkaz. Systém pro enkapsulaci živých buněk je popsán v PCT přihlášce WO 91/10425 od Aebischer et al., která je zde uvedena jako odkaz. Viz též PCT přihláška WO 91/10470 od Aebischer et al., Winn et al., *Exper. Neurol.* 113: 322 - 329, 1991; Aebischer et al., *Exper. Neurol.* 111: 269 - 275, 1991; Tresco et al., *ASAI0* 38: 17 - 23, 1992, které jsou zde uvedeny jako odkaz.

Také se předpokládá in vivo a in vitro genová terapie způsobující podání GDNFR proteinového produktu. In vitro genová terapie může být provedena vložením genu kodujícího GDNFR proteinový produkt do cílových buněk pomocí lokální injekce

konstrukt nukleové kyseliny nebo jiného vhodného přepravního vektoru. (Hefti, J. Neurobiol. 25: 1418 - 1435, 1994). Například, sekvence nukleových kyselin kodující GDNFR proteinový produkt může být obsažena v adeno-asociovaném virovém vektoru pro přenos do cílových buněk (například Johnson, Mezinárodní přihláška č. WO 95/34670; Mezinárodní přihláška č. PCT/US95(07178, jejíž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz). Alternativní virové vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na, retrovirové, adenovirové, herpes simplex a papilomavirové vektory. Fyzikální přenos, ať in vivo, nebo ex vivo, může být dosažen liposomy zprostředkovaným přenosem, přímou injekcí (holá DNA), receptory zprostředkovaným přenosem (komplex ligand-DNA), elektroporací, srážením fosforečnanem vápenatým a nebo ostřelováním mikročásticemi (genové dělo).

Také se předpokládá, že genová terapie GDNFR proteinovým produktem nebo buněčná terapie může dále obsahovat podání GDNF proteinového produktu. například, hostitelská buňka může být modifikována tak, aby exprivovala jak GDNFR proteinový produkt, tak GDNF proteinový produkt. Alternativně mohou být GDNF a GDNFR proteinový produkt exprivovány a uvolňovány z různých buněk. Takové buňky mohou být separovaně vloženy do pacienta, nebo mohou být obsaženy v jediném implantovatelném prostředku, jako je enkapsulovaná membrána popsaná výše.

Mělo by být uvedeno, že formulace GDNFR proteinového produktu zde popsané mohou být použity pro veterinární aplikace, stejně jako pro aplikace u lidí, a že termín "pacient" není v tomto smyslu omezující. V případě veterinárních aplikací mohou být dávky určeny podle výše uvedeného popisu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Identifikace buněk exprimujících vysokoafinitní vazebná místa pro GDNF

Expresní klonování obsahovalo selekci zdrojemRNA, který pravděpodobně obsahuje signifikantní hladiny cílového transkriptu. Fotoreceptorové buňky sítnice byly identifikovány jako reaktivní na GDNF při velmi nízkých koncentracích, což ukazuje na existenci funkčního, vysokoafinitního receptoru. Pro potvrzení toho, že krysí fotoreceptorové buňky exprimují vysokoafinitní receptory pro GDNF byla provedena analýza vazby (^{125}I)GDNF a fotografické emulze.

Kultury kryších buněk sítnice

Neurální sítnice 5-dní starých C57B1/6 myších mláďat nebo 3-dny starých Sprague-Dawley krys (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA) byly pečlivě odebrány a odříznuty od pigmentového epitelu, nastříhány na 1 mm^2 fragmenty a umístěny do ledového fosfátem pufrovaného fyziologického salinického roztoku (PBS). Sítnice byly potom přeneseny do 10 ml Hankova vyváženého solného roztoku (HBSS) obsahujícího 120 jednotek papainu a 2000 jednotek DNAasy a byly inkubovány po dobu 20 minut při $37\text{ }^\circ\text{C}$ na rotační plošné třepačce při asi 200 rpm. Buňky byly potom dispersovány triturací přes ožehnuté Pasteurovy pipety, prosety přes $20\text{ }\mu\text{m}$ Nitex nylonové síto a centrifugovány po dobu 5 minut při 200 x g . Vzniklá buněčná peleta byla resuspendována do HBSS obsahujícího 1% ovalbumin a 500 jednotek DNAasy, převrstvena na



hladině 4% roztokem ovalbuminu (v HBSS) a centrifugována po dobu 10 minut při 500 x g. Konečná peleta byla resuspendována v kompletním kultivačním mediu (viz dále), upravena na asi 15000 buněk/ml a umístěna v 90 μ l aliquotách na tkáňové kultivační plotny potažené polyornitinem a lamininem, jak bylo popsáno dříve (Louis et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 262: 1274 - 1283, 1992).

Kultivační medium se skládalo z 1:1 směsi Dulbeccova modifikovaného Eaglova media (DMEM) a F12 media, a bylo doplněno 2,5% teplem inaktivovaným koňským sérem (Hyclone, Logan, UT), B27 doplňkem pro media (GIBCO, Grand Island, NY), D-glukosou (konečná koncentrace 5 mg/ml), L-glutaminem (konečná koncentrace 2 mM), 20 mM HEPES, hovězím inzulinem a lidským transferinem (konečná koncentrace 2,5 a 0,1 mg/ml, v příslušném pořadí).

Imunocytochemická identifikace fotoreceptorů

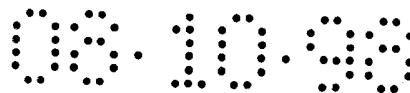
Fotoreceptory byly identifikovány barvením na arestin, antigen specifický pro tyčinky. Kultury fotoreceptorů byly fixovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě 4% paraformaldehydem v PBS, pH 7,4, a potom následovaly tři promytí v PBS. Fixované kultury byly potom inkubovány v Superblock blokovacím pufrem (Pierce, Rocford, IL) obsahujícím 1% Nonidet P-40 pro zvýšení penetrace protilátky. Znti-arestinové protilátky (polyklonální králičí protilátky proti syntetické peptidové sekvenci arestinu: Val-Phe-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Gln-Asn-Leu-Lys-Cys) byly potom aplikovány v ředění asi 1:2000 ve stejném pufrem, a kultury byly inkubovány po dobu jedné hodiny při 37 °C na rotační třepačce. Po třech promytích v PBS byly kultury inkubovány po dobu jedné



hodiny při 37 °C s kozím anti-králičím IgG (Vectastain kit od Vector Laboratories, Burlingham, CA) v ředění 1:500. Po třech promytích v PBS byly potom sekundární protilátky značeny komplexem avidin-biotin-peroxidasa ředěným 1:500 (45 minut při 37 °C). Po třech dalších promytích v PBS byly značené buněčné kultury reagovány po dobu 5 - 20 minut v roztoku 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 obsahujícím 0,04% 3',3'-diaminobenzidín-(HCl)₄, 0,06% NiCl₂ a 0,02% peroxid vodíku. Podle arestinové imunoreaktivity bylo okolo 90% buněk v kulturách tyčinkovými fotoreceptory.

Životaschopnost fotoreceptorů byla určena vyšetřováním arestinem barvených kultur světelným mikroskopem při 200-násobném zvětšení. Počet arestin pozitivních receptorů byl počítán na jednu proužku 1 x 6 mm, představujícím 20% celkové povrchové oblasti 6 mm jamky. Životaschopné fotoreceptory byly charakterizovány jako mající řádně tvarované buněčné tělo, obvykle s krátkými axonům podobnými výběžky. Fotoreceptory vykazující známky degenerace, jako je nepravidelné, vakuolizované perikaryum nebo fragmentované neurity, byly vyloučeny z počítání (většina degenerovaných fotoreceptorů byla nicméně oddělena do kultivačního substrátu). Počet buněk byl vyjádřen jako buňky/6 mm jamku.

Kultivované krysí buňky sítnice obohacené o fotoreceptory (10000/6 mm jamku) byly ošetřeny lidským rekombinantním GDNF (10-násobné seriové ředění v rozmezí od 10 ng/ml do 1 pg/ml). Kultura byla fixována po šesti dnech a byla imunobarvena na arestin, antigen specifický pro fotoreceptory tyčinek. V kulturách, které nebyly ošetřeny GDNF, se počet fotoreceptorů rovnoměrně snižoval s časem doku nedosáhl asi 25% počáteční hodnoty po 6 dnech kultivace. Ošetření kultur GDNF vedlo asi ke



dvojnásobně vyššímu počtu životaschopných arestin-pozitivních fotoreceptorů po šesti dnech kultivace. Účinek GDNF byl maximální při asi 200 pg/ml, s ED_{50} okolo 30 pg/ml. Kromě podpory životaschopnosti fotoreceptorů stimuloval GDNF také prodlužování axonům podobných výběžků, což prokazuje účinek na morfologický vývoj fotoreceptorů (průměrná délka neuritů fotoreceptorů při GDNF: 68 μ , oproti $27 \pm 18 \mu$ m v kontrolních kulturách).

Pro potvrzení toho, že buňky krysí sítnice exprivují vysokoafinitní GDNF receptory byla provedena analýza (125 I)GDNF vazby a fotografické emulse. Postnatální krysí fotoreceptorové buňky byly umístěny v plastových nádobkách (Nunc) v hustotě 2800 buněk/mm², tři až čtyři dny před pokusem. Buňky byly promyty jedenkrát ledově chladným promývacím pufrem (Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium (DMEM) obsahující 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonovou kyselinu (HEPES), pH 7,5). Pro kompetitivní vazbu byly buňky inkubovány s různými koncentracemi (125 I)GDNF ve vazebném pufru (DMEM obsahující 25 mM HEPES, pH 7,5 a 2 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA)) za přítomnosti nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF při 4 °C po dobu 4 hodin. Buňky byly promyty čtyřikrát ledově chladným pufrem, byly lyzovány v 1 M NaOH a radioaktivita navázaná na buňky byla určena v gamma kameře. Signifikantní množství (125 I)GDNF se vážalo na fotoreceptorové buňky i při nízkých koncentracích ligandu (jako je 30 pM) a tato vazba byla zcela inhibována přítomností nadbytku neznačeného GDNF.

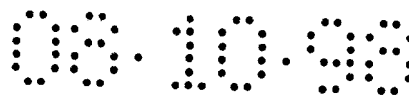
Pro detekci ve fotografické emulsi byly buňky inkubovány s 50 pM (125 I)GDNF ve vazebném pufru za přítomnosti nebo za absence neznačeného GDNF při 4 °C po dobu 4 hodin. Buňky byly promyty šestkrát ledově chladným pufrem, byly fixovány 2,5%

glutaraldehydem a byly sekvenčně dehydratovány 50% a 70% ethanolem, a byly ponořeny do NTB-2 fotografické emulze (Eastman Kodak, Rochester, NY). Po pěti dnech expozice byly desky vyvíjeny a vyšetřovány. Analýza fotografické emulze prokázala asociaci (^{125}I)GDNF na některé fotoreceptorové buňky, což ukazuje na přítomnost receptoru pro GDNF. Tato asociace, nicméně, byla účinně blokována přidáním neznačeného GDNF.

Příklad 2 - Expresní klonování GDNFR z fotoreceptorových buněk

Krysí fotoreceptorové buňky byly vybrány jako možný zdroj vysokoafinitních receptorů pro GDNF na základě jejich povrchové vazby radioaktivně značeného GDNF a na základě jejich schopnosti reagovat na velmi nízké koncentrace ligandu, jak je popsáno v příkladu 1. Pro identifikaci receptoru byla konstruována cDNA knihovna podle vybraných velikostí o přibližně 50000 nezávislých klonů za použití savčího expresního vektoru (derivátu pSR, Takebe et al., výše) a mRNA izolované z kultivovaných postnatálních krysích fotoreceptorových buněk, za použití metody popsané dále. Knihovna byla rozdělena do skupin o asi 1500 až 2000 nezávislých klonů a byla vyšetřována za použití zavedeného přístupu expresního klonování Gearing et al., EMBO Journal, 8: 3667 - 3676, 1989). Plasmidová DNA představující každou skupinu knihovny byla připravena a transfektována do COS7 buněk kultivovaných v plastové mikroskopické nádobce (Nunc, Naperville, IL).

Transfektované buňky byly ošetřeny (^{125}I)GDNF, fixovány glutaraldehydem, dehydratovány a ponořeny do fotografické emulze pro autoradiografii. Po expozici 5 dní byly desky vyvíjeny a vyšetřovány na přítomnost stříbrných granulí, která ukazovala na

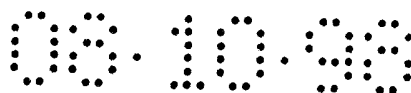


přítomnost vazby (^{125}I)GDNF na buněčný povrch v důsledku buněčné exprese receptoru pro GDNF. Buňky transfektované EGF receptorem ošetřené (^{125}I)EGF byly použity jako pozitivní kontrola.

Jedna z 27 skupin (F8-11) vyšetřovaných tímto způsobem vykazovala 19 pozitivních buněk po transfekci. Tak byla identifikována jediná skupina cDNA knihovny, která obsahovala cDNA klon, který exprivoval GDNFR. Tato skupina byla rozdělena do 60 menších podskupin o 100 klonech/skupinu, které byly vyšetřovány stejným způsobem, jako byl popsán výše. Pět z těchto skupin bylo identifikováno jako pozitivní a dvě z pěti skupin byly dále rozděleny za zisku jediného klonu odpovědného za vazebnou aktivitu pro GDNF. Transfekce plasmidové DNA z jediného klonu do COS7 buněk vedla k vazbě (^{125}I)GDNF na přibližně 15% buněk. Tato vazba byla specificky inhibována nadbytkem neznačeného GDNF.

Konstrukce expresních cDNA knihoven

Krysí buňky sítnice byly získány z krys stáří 3 - 7 dní a byly umístěny do kultivačních disků potažených lamininem a polyornitinem v hustotě přibližně 5700 buněk/mm². Po 3 - 4 dnech v kultuře bylo vyhodnoceno, že populace obsahuje asi 80% fotoreceptorových buněk. Celková DNA byla připravena z této kultury standartními metodami, a polyA+RNA byla přečištěna za použití poly-A-tract kitu (Promega, Madison, WI). cDNA knihovna byla konstruována z krysí fotoreceptorové polyA+RNA za použití Gibco Superscript Choice System (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD). Dva mikrogramy polyA+RNA byly smíseny s 50 ng náhodných hexamerů, zahřáty na 70 °C na dobu 10 minut a potom rychle ochlazeny na ledu. Syntesa prvního řetězce byla provedena za použití 400 U

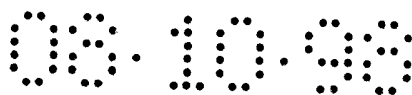


Superscript II RT při 37 °C po dobu 1 hodiny. Syntesa druhého řetězce byla provedena ve stejné tubě po přidání dNTP, 10 U E. coli DNA ligasy, 40 U E. coli DNA polymerasy I a 2U E. coli RNasy H. Po 2 hodinách při 16 °C byly konce cDNA tupě zakončeny ošetřením 10 U T₄polymerasy po dalších 5 minut při 16 °C. Po srážení isopropanolem byly k cDNA přidány EcoRI klonovací místa ligací přes noc s 10 µg nefosforylovanými EcoRI adapterovými oligonukleotidy.

EcoRI adaptovaná cDNA byla potom fosforylována a aplikována do Sephacryl S-500 HR kolony frakcionací podle velikosti. Po naplnění byla kolona promyta 100 µl aliquotami TEN pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 25 mM NaCl) a byly odebrány 30 µl frakce. Frakce 6 až 8, které obsahovaly přibližně 34 ng cDNA o vysoké molekulové hmotnosti, byly shromážděny a vysráženy. Získaná EcoRI adaptovaná cDNA byla ligována přes noc s 50 ng EcoRI tráveného vektoru pBJ5. Aliquoty ligační směsi každá obsahující okolo 15 ng cDNA byly potom transformovány do kompetentních buněk (E. coli kmen DH10B; GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) elektroporací. Transformační směs byla titrována a potom umístěna na 27 Amp/LB plotny v hustotě 1500 kolonií na plotnu. Kolonie byly seškrábnuty z každé plotny a byly odebrány do 10 ml Luria bujonu (LB) za vytvoření 27 skupin po 1500 nezávislých klonech. Část buněk z každé skupiny byla zmrazena v glycerolu a zbývající buňky byly použity pro izolaci plasmidové DNA za použití Qiagen tip-500 kitu (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

Transfekce COS buněk a analýza fotografické emulze

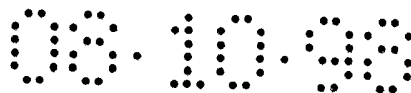
COS7 buňky byly umístěny (220000 buněk/nádobku) v plastových nádobkách (Nunc) potažených ProNectin (10 µg/ml ve fosfátem



pufrovaném salinickém roztoku (PBS)) jeden den před transfekcí. Pro transfekci bylo 700 μ l OptiMEMI (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) obsahující 2 μ g cDNA jemně smíšeno s 35 μ l DEAE Dextran roztoku (10 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO) v Eppendorfově tubě. Buňky byly promyty dvakrát PBS a inkubovány s transfekční směsí po dobu 30 minut při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Po inkubaci bylo do každé nádoby přidáno 3 ml DMEM media obsahujícího 10% fetální telecí sérum (FCS) a 80 nM Chloroquinu (Sigma, St. Louis, MO) Buňky byly dále inkubovány po dobu 3,5 hodin, vystaveny šoku s 10% dimethylsulfoxidem v DMEM při pokojové teplotě po dobu 2 minut, promyty jedenkrát PBS a nechaly se růst v DMEM obsahujícím 10% FCS. Po 48 hodinách byly transfektované COS7 buňky promyty jedenkrát ledově chladným promývacím pufrem (DMEM obsahující 25 mM HEPES, pH 7,5) a byly inkubovány v ledově chladném vazebném pufru (DMEM obsahující 25 mM HEPES, pH 7,5 a 2 mg/ml BSA) doplněném 50 pM (¹²⁵I)GDNF při 4 °C po dobu 4 hodin. Buňky byly promyty šestkrát v ledově chladném promývacím pufru, byly fixovány 2,5% glutaraldehydem při pokojové teplotě po dobu 5 minut, byly sekvenčně dehydratovány 50% a 70% ethanolem a potom ponořeny do NTB-2 fotografické emulze (Eastman Kodak). Po 4-5 denní expozici při 4 °C ve tmě byly desky vyvíjeny a vyšetřovány normální a kontrastní mikroskopií.

Další dělení pozitivních skupin

Byla identifikována jedna skupina, která obsahovala domnělý klon GDNF receptoru. Klony z této skupiny byly umístěny na 60 plotnách v hustotě 100 kolonií na plotnu. Buňky byly seškrábnuty z každé plotny, umístěny do LB a nechaly se růst po dobu 4-5 hodin při 37 °C. Z každé skupiny byly vyrobeny zmrazené zásobníky a přípravky DNA, stejně jako dříve, pro generování 60 podskupin



obsahujících každá 100 nezávislých klonů. Dvě z těchto skupin byly umístěny na plotnu v nízké hustotě pro umožnění izolace jednotlivých kolonií.

Jednotlivé kolonie (384) byly seškrábnuty z každé ze dvou podskupin a byly kultivovány po dobu 6 hodin v 200 μ l LB v 96 jamkových plotnách. Pro selekci jednotlivých kolonií exprivujících GDNFR byly čtyři 96 jamkové plotny uspořádány do jedné velké matrice skládající se z 16 řad a 24 sloupců. Buňky z jamek v každém sloupci a v každé řadě byly kombinovány za zisku celkem 40 směsí. Tyto směsi byly kultivovány přes noc v 10 ml LB/Amp (100 μ l/ml) a celková DNA byla připravena za použití Qiagen tip-20 kitu. Při analýze na domnělé GDNFR receptorové klony dávaly tři řady směsí a tři sloupce pozitivní signály, což ukazuje na devět potenciálně pozitivních jednotlivých kolonií. DNA z každého z potenciálně pozitivních klonů byla připravena a byla trávena EcoRI a PstI. DNA ze tří z devíti jednotlivých klonů vykazovala identický charakter restrikce, zatímco dalších šest bylo nepříbuzných, což naznačuje, že tyto tři představují autentické klony obsahující GDNFR.

Příklad 3

DNA sekvencování a analýza sekvence

DNA z pozitivních, jednotlivých kolonií byla připravena a sekvencována za použití automatizovaného ABI373A DNA sekvenátoru (Perkin/Elmer Applied Biosystems, Santa Clara, CA) a dideoxy-dye-terminátorů, podle návodu výrobce. Srovnání sekvence GDNF receptoru s dostupnými veřejnými databazemi bylo provedeno za použití FASTA (Pearson and Lipman, Proceedings of The National

Academy Of Sciences USA 85: 2444 - 2448, 1988) programového algoritmu jak je popsáno v University of Wisconsin Genetics Computer Group balíčku (Program Manual for the Wisconsin Package, Verse 8, září 1994, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin).

Charakterizace sekvence krysího GDNFR

Byla připravena plasmidová DNA z klonů popsaných v příkladu 2, výše, a byla podrobena analýze DNA sekvence. Analýza nukleotidové sekvence klonované krysí cDNA o 2138 bp ukázala jeden rozsáhlý otevřený čtecí rámeček kodující translační protein o 468 aminokyselinových zbytcích (obrázek 3).

Kodující sekvence je obklopena 5'-netranslatovaným regionem o 301 bp a 3' - netranslatovaným regionem o 430 bp, který neobsahuje potenciální polyadenylační místo. Přítomnost nitrorámečkového stop kodonu "upstream" od prvního ATG na páru bazí 302 a související okolní nukleotidy naznačují, že tento methioninový kodon je nejpravděpodobněji iniciátorovým místem translace (Kozak, Nucleic Acids Research 15: 8125 - 8148, 1987).

Žádný polyadenylační signál nebyl nalezen v 430 nukleotidech 3'-netranslatované sekvence v klonu krysí cDNA. Toto není překvapivé, protože data získaná z Northern blotu ukazují, že nejkratší mRNA transkripty jsou dlouhé přibližně 3,6 kb.

GDNFR polypeptidová sekvence má N-koncový hydrofobní region o přibližně 19 zbytcích (methionin-1 až alanin-19, obrázek 3) s charakteristikami sekrečního signálního peptidu (von Heijne, Protein Sequences And Data Analysis, 1: 41 - 42, 1987; von Neijne, Nucleic Acids Research 14: 4683 - 4690, 1986). Nebyla

nalezena žádná vnitřní hydrofobní doména, která by mohla sloužit jako transmembránová doména. Místo toho je přítomen karboxy-koncový hydrofobní region o 21 zbytcích (leucin-448 až serin-468, obrázek 3) a může se účastnit glykosyl-fosfatidylinositolového (GPI) zakotvení receptoru v cytoplasmatické membráně. Kromě přítomnosti tří potenciálních N-vázaných glykosylačních míst nebyly nalezeny žádné konzervované sekvence nebo strukturální motivy. Protein je mimořádně bohatý na cystein (31 z 468 aminokyselinových zbytků), ale jejich rozložení není shodné s doménami bohatými na cystein v extracelulárních částech známých receptorů.

Sekvence GDNFR byla srovnávána se sekvencemi v dostupných veřejných databázích za použití FASTA. Průzkum neukázal signifikantní homologii s jinými publikovanými sekvencemi. Po získání krysího cDNA klonu byl tento klon radioaktivně značen a byl použit pro sondování cDNA knihovny připravené ze substantia nigra lidského mozku jak je to popsáno dále v příkladu 5.

Příklad 4

Vazba GDNF na buňky exprivující GDNFR

Test vazby byl proveden podle testovací metody, kterou dříve popsal Jing et al. (Journal of Cell Biology 110: 283 - 294, 1990). Test obsahoval vazbu (^{125}I)GDNF na krysí fotoreceptorové buňky, COS7 buňky nebo 293T buňky, které byly transfektovány tak, aby exprivovaly GDNFR. Rekombinantní GDNFR exprivovaný na povrchu 293T buněk byl schopen specifické vazby na GDNF s afinitou srovnatelnou a afinitou pozorovanou pro vazebná místa pro GDNF na buňkách krysí sítnice.

Kryší fotoreceptorové buňky byly připraveny jak je popsáno v příkladu 1, výše, a byly umístěny v hustotě $5,7 \times 10^5$ buněk/cm² dva až tři dny před testováním ve 24-jamkových Costar tkáňových kultivačních plotnách předem potažených polyornitinem a lamininem. COS buňky byly umístěny v hustotě $2,5 \times 10^4$ buněk/cm² jeden den před testem a byly transfektovány 10 až 20 μ g plasmidové DNA za použití DEAE-dextran-chlorochinové metody (Aruffo and Seed, Proceedings of The National Academy Of Sciences USA 84: 8573 - 8577, 1987). Buňky z každé plotny byly odebrány a byly přemístěny do 30 jamek 24-jamkových Costar tkáňových kultivačních ploten 24 hodin po transfekci a ponechaly se růst po dobu dalších 48 hodin. Buňky se potom ponechaly na ledu po dobu 5 až 10 minut, promyly se jedenkrát ledově chladným promývacím pufrem a inkubovaly se s 0,2 ml vazebného pufru obsahujícího různé koncentrace (¹²⁵I)GDNF s nebo bez neznačeného GDNF při 4 °C po dobu čtyř hodin. Buňky byly promyty čtyřikrát 0,5 ml ledově chladného promývacího pufru a byly lyzovány 0,5 ml 1 M NaOH. Lyzáty byly počítány v 147 Wizard Automatic Gamma Counter.

Pro některé vazebné pokusy byly použity přechodně transfektované 293T buňky (transfekce 293T buněk viz níže). Dva dny po transfekci byly buňky odebrány z ploten za použití 2x versinu. Buňky byly peletovány, promyty jedenkrát ledově chladným vazebným pufrem a byly resuspendovány v ledevě chladném vazebném pufru v hustotě 3×10^5 buněk/ml. Buněčná suspence byla rozdělena do aliquot obsahujících $1,5 \times 10^5$ buněk/vzorek. Buňky byly potom peletovány a inkubovány s různými koncentracemi (¹²⁵I)GDNF za přítomnosti nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF při 4 °C po dobu 4 hodin při jemném třepáním. Buňky byly promyty čtyřikrát ledově chladným promývacím pufrem a byly resuspendovány v 0,5 ml promývacím pufrem. Dvě 0,2 ml aliquoty suspence byly počítány

v gamma čítači pro určení množství (^{125}I)GDNF asociovaného s buňkami.

Ve všech testech byla nespecifická vazba určena za použití dvojích vzorků, z nichž jeden obsahoval 500 nM neznačeného GDNF. Hladina nespecifické vazby se pohybovala od 10% do 20% specifické vazby měřené za absence neznačeného GDNF a byla odečtena od specifické vazby. Test prokázal, že buňky nevážou GDNF, pokud nebyly transfektovány GDNFR cDNA.

Příklad 5

Tkáňová distribuce GDNFR mRNA

Charakter exprese GDNFR mRNA u embryonálních myší, dospělých myší, krys a lidských tkání byl vyšetřován Northern blot analýzou. Klonovaná krysí GDNFR cDNA byla značena za použití Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) podle návodu výrobce. Skvrny krysí, myší a lidské tkáňové mRNA (získané od Clontech, Palo Alto, CA) byly hybridizovány sondou a promyty za použití činidel z ExpressHyb Kit (Clontech) podle návodu výrobce.

Tkáňové Northern bloty připravené z dospělé krysí, myší a lidské tkáně ukázaly, že GDNFR mRNA je v nejvyšších hladinách exprimována v játrech, mozku a ledvinách. Vysoká hladina exprese mRNA byla také detekována v plicích, a nižší nebo nedetekovatelná hladina byla detekována ve slezině, střevu, varlatech a kosterním svalu. Ve skvrnách získaných z mRNA izolované z myšího embrya byla exprese nedetekovatelná v embryonální den 7, stala se detekovatelnou v den E11 a byla velmi vysoká v den E17. GDNFR

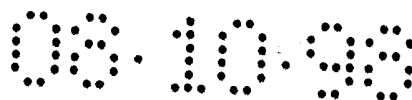
mRNA byla exprivována ve tkáních izolovaných z několika podoblastí lidského mozku v relativně stejných hladinách. Expresse GDNFR mRNA v lidském mozku vykazovala malou specificitu pro jakýkoliv jednotlivý region.

Ve většině tkání byly přítomny transkripty dvou různých velikostí. V myších a lidských tkáních byly nalezeny transkripty o 8,5 a 4,4 kb, zatímco u krys byly transkripty 8,5 a 3,6 kb. Relativní množství většího a menšího transkriptu se lišilo podle typu tkáně, kdy menší transkript dominoval v játrech a v ledvinách a větší byl hojnější v mozku. Vazba GDNF na 293T buňky transfektované GDNFR cDNA klonem v pBKRSV vektoru byla vyšetřována Scatchardovou analýzou. Byly detekovány dvě třídy vazebných míst, jedno s vazebnou afinitou v nízkém řádu pikomolů a druhé s afinitou okolo 500 pM.

Příklad 6

Rekombinantní lidský GDNFR

cDNA knihovna lidské substantia nigra od dospělého jedince (5'-úsek plus cDNA knihovna, Clontech, Palo Alto, CA) klonovaná v bakteriofágu gt10 byla vyšetřována za použití krysího GDNFR cDNA klonu podle příkladu 1 jako sondy. Sonda byla značena (^{32}P) dNTP za použití Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) podle návodu výrobce. Přibližně $1,2 \times 10^6$ gt10 fágů z lidské cDNA knihovny substantia nigra bylo umístěno na 15 cm agarosových plotnách a byly replikovány na dvojích nitrocelulosových filtrech. Filtry byly potom vyšetřovány hybridizací z radioaktivně značenou sondou. Filtry byly předem hybridizovány v 200 ml 6 x SSC, 1 x Denhartův roztok, 0,5% SDS,



50 $\mu\text{g/ml}$ lososí spermatické DNA při 55 °C po dobu 3,5 hodiny. Po přidání 2×10^8 radioaktivně značené sondy pokračovala hybridizace po dobu 18 hodin. Filtry byly potom promyty dvakrát po dobu 30 minut každý v 0,5% SSC, 0,1% SDS při 55 °C a byly exponovány na RTG filmu přes noc s intenzifikovaným snímáním.

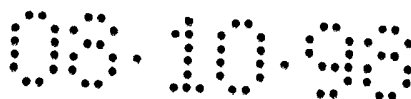
Bylo izolováno pět pozitivních plaků, jejichž cDNA inserty představovaly části lidské GDNFR cDNA. Při srovnání se sekvencí nukleových kyselin krysího GDNFR ukázané na obrázku 3 (bp 0 až 2140) bylo zjištěno pět lidských GDNFR klonů obsahujících následující sekvence:

Tabulka 3

| | |
|-----------|------------------------------|
| Klon 2 | 1247 až 2330 (SEQ ID NO: 21) |
| Klon 9 | 1270 až 2330 (SEQ ID NO: 23) |
| Klon 21-A | -253 až 1692 (SEQ ID NO: 9) |
| Klon 21-B | -237 až 1692 (SEQ ID NO: 11) |
| Klon 29 | 805 až 2971 (SEQ ID NO: 15) |

Seřazení a srovnání sekvencí, jak je uvedeno na obrázku 5, umožnilo sestrojení konsenzuální sekvence pro lidský GDNFR. Translační produkt určený lidskou cDNA sekvencí se skládal ze 465 aminokyselin a byl z 93% identický s krysím GDNFR.

Pro generování lidské cDNA kodující kompletní GDNFR byly části klonu 21B a 2 sestřiženy dohromady ve vnitřním BglII místě a byly subklonovány do savčího expresního vektoru pBKRSV (Stratagene, La Jolla, CA).



Rekombinantní lidské GDNFR expresní vektory mohou být připraveny pro expresi v savčích buňkách. Jak je ukázáno výše, exprese může být také provedena v nesavčích buňkách, jako jsou bakteriální buňky. Sekvence nukleových kyselin zde popsané mohou být umístěny do komerčně dostupného savčího vektoru (například CEP4, Invitrogen) pro expresi v savčích buňkách, včetně komerčně dostupné lidské buněčné linie embryonálních ledvin "293". Pro expresi v bakteriích bude typicky eliminována část kodující leaderovou sekvenci (například nukleové kyseliny 1 - 590 podle obrázku 1). Pro bakteriální expresi je možné přidat další methionyl na N-konci. Dále je možné substituovat přirozenou leaderovou sekvenci jinou leaderovou sekvencí, nebo jinou sekvencí pro štěpení pro usnadnění exprese.

Příklad 7

Konstrukty solubilního GDNFR

Byly vyrobeny solubilní lidské GDNFR proteinové produkty. Následující příklady poskytují čtyři různé formy, lišící se pouze v karboxy konci, ukázané v číslování zbytků podle obrázku 2. Dvě jsou solubilní formy zkrácené v různých bodech ihned "upstream" od hydrofobního konce a "downstream" od posledního cysteinového zbytku. Další dvě jsou formy se stejným zkrácením, ale s adicí FLAG sekvence, oktapeptidu, ke kterému je komerčně dostupná protilátka (Eastman Kodak). FLAG sekvence je H2N-DYKDDDDK-COOH.

Metoda

Lambda fág klon č. 21, obsahující téměř celý kodující region pro lidský GDNFR, byl tráven EcoRI pro excidování cDNA insertu.



Tento fragment byl přečištěn a ligován do pBKRSV vektoru sestřiženého EcoRI (Stratagene, La Jolla, CA) za produkce klonu 21-B-3/pBKRSV. Primery 1 a 2 jak jsou ukázány níže byly použity pro PCR reakce s lidským GDNFR klonem 21-B-3/pBKRSV jako templátem. Podmínky PCR byly 94 °C, pět minut následovaných 25 cykly 94 °C, jedna minuta; 55 °C, jedna minuta; 72 °C, dvě minuty a konečná extenze pět minut při 72 °C. Tento produkováný fragment se skládal z nukleotidů 1265 - 1868 lidského GDNFR klonu plus terminačního kodonu a HindIII restrikčního místa dodaného primerem 2. Tento fragment byl tráven restrikčními enzymy HindIII (obsaženo v primeru 2) a BglII (pozice 1304 v lidském GDNFR) a vzniklý 572 nukleotidový fragment byl izolován gelovou elektroforesou. Tento fragment obsahoval hGDNFR kodující region od izoleucinu-255 do glycinu-443. Podobná strategie byla použita s primery 1 a 3 k produkci fragmentu s BglII a HindIII konci, které kodují izoleucin-255 až prolin-446. Primery 4 a 5 byly navrženy pro produkci fragmentů kodujících stejné regiony hGDNFR jako primery 1 a 3, ale s adicí kodující sekvence Flag peptidu (IBI/Kodak, New Haven, CN). Sekvence Flag peptidu se skládá z osmi aminokyselin (H₂N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-COOH), ke kterým jsou komerčně dostupné protilátky. Primery 1 a 4 nebo 1 a 5 byly použity v PCR reakcích se stejnými templáty jako výše, a byly tráveny HindIII a BglII jako výše. Tento postup produkoval fragmenty kodující izoleucin-255 až glycin-443 a izoleucin-255 až prolin-446, ale s adicí Flag peptidu na jejich karboxy konci.

Primery

- 1) 5'-CTGTTTGAATTTGCAGGACTC-3' (SEQ ID NO:30)
- 2) 5'-CTCCTCTCTAAGCTTCTAACCACAGCTTGGAGGAGC-3' (SEQ ID NO:31)
- 3) 5'-CTCCTCTCTAAGCTTCTATGGGCTCAGACCACAGCTT-3' (SEQ ID NO:32)
- 4) 5'-CTCCTCTCTAAGCTTCTACTTGTTCATCGTCGCCTTGTAGTCACCACAGCTTGGAGGAGC-3' (SEQ ID NO:33)
- 5) 5'-CTCCTCTCTAAGCTTCTACTTGTTCATCGTCGCCTTGTAGTCTGGCTCAGACCACAGCTT-3' (SEQ ID NO:34)

Všechny čtyři fragmenty, produkované jak bylo popsáno výše, byly přeneseny zpět do 21-B-3/pBKRSV. 21-B-3/pBKRSV klon byl tráven BglII a HindIII a byl ošetřen telecí střevní alkalickou fosfatasou (CIAP). Větší fragment obsahující vektor a lidský GNDFR kodující region nad BglII místem byl přečištěn na gelu a byl extrahován z gelu. Každý ze čtyř BglII/HindIII fragmentů produkovaný postupem uvedeným výše byl ligován do tohoto vektoru za vzniku následujících konstruktů v pBKRSV vektoru:

Tabulka 4

| | |
|------------------------------|--|
| 1) GDNFR/gly-443/pBKRSV | hGDNFR končící v glycinu 443, následovaném stop kodonem |
| 2) GDNFR/pro-446/pBKRSV | hGDNFR končící v prolinu 446, následovaném stop kodonem |
| 3) GDNFR/gly-443/Flag/pBKRSV | hGDNFR končící v glycinu 443 s C-koncovou Flag sekvencí, následovanou stop kodonem |
| 4) GDNFR/pro-446/Flag/pBKRSV | hGDNFR končící v prolinu 446 s C-koncovou Flag sekvencí, následovanou stop kodonem |

Správná konstrukce všech klonů byla potvrzena DNA sekvencováním. Inserty z pBKRSV klonů byly přeneseny do jiných expresních vektorů za použití enzymových míst přítomných v pBKRSV polylinkerové sekvenci jak je popsáno dále. Solubilní GDNFR (například sGDNFR/gly a sGDNFR/pro) byly také přeneseny do vektorů pro přechodnou expresi a do pDSR-2 pro stabilní expresi v CHO buňkách.

pDSR α 2 + PL klony:

Vhodný pBKRSV klon je tráven XbaI a SalI. Insert je ligován do pDSR α 2+PL, který je nastřižen stejným enzymem a ošetřen CIAP. Tento konstrukt může být použit pro stabilní expresi GDNFR v CHO buňkách.

pCEP4 klony:

Vhodný pBKRSV klon je tráven SpeI a XhoI. Insert je ligován do pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), který je tráven NheI (SpeI konce) a XhoI, který je ošetřen CIAP. Tento konstrukt může být použit pro přechodnou expresi GDNFR.

Plasmidový konstrukt pDSR-2 je připraven v podstatě podle postupu popsáno v související U.S. patentové přihlášce pořadové č. 501904 podané 29.3.1990 (viz též Evropská patentová přihláška č. 90305433, přihláška č. EP 398753, podaná 18.5.1990 a WO 90/14363 (1990), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz). Odborníkům v oboru bude jasné, že může být použito mnoho sekvencí nukleových kyselin kodujících analogy GDNFR.

Jiným konstruktem je pDSR α 2, derivát plasmidu pCD (Okayama and Berg, Mol. Cell Biol. 3: 280 - 289, 1983) se třemi hlavními modifikacemi: (i) SV40 polyadenylační signál byl nahrazen signálem z α -podjednotky hovězího folikulárního stimulačního hormonu, α -bFSH (Goodwin et al., Nucl. Acids Res. 11: 6873 - 6882, 1983); (ii) minigen myší dihydrofolatreduktasy (Gasser et al., Proceedings of The National Academy Of Sciences USA 79: 6522 - 6526, 1982) byl insertován downstream od expresní kazety pro umožnění selekce a amplifikace transformantů; a (iii) 267 bp fragment obsahující "R-element" a část "U5" sekvence dlouhé koncové opakující se sekvence (LTR) lidského viru T-buněčné leukemie typ I (HTLV-I) byl klonován a insertován mezi SV40 promotor a sestřihovací signál jak bylo popsáno dříve (Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8: 466 - 472, 1988).

Expresse GDNFR v CHO buňkách byla potvrzena vazbou jodinovaného

GDNF na povrch buněk. Jak bylo uvedeno výše, rekombinantně exprivovaný GDNFR proteinový produkt může být použit pro potenciaci aktivity nebo buněčné specificity pro GDNF. Solubilní GDNFR v detekovatelných hladinách může být také použit v diagnostických aplikacích jak bylo uvedeno výše.

Příklad 8

Chemická zkřížená vazba mezi GDNF a GDNFR

Pro studium vazebných vlastností a molekulární charakteristik byl GDNFR přechodně exprivován na povrchu 293T buněk transfekcí krysím cDNA klonem. Transfekce 293T buněk byla provedena za použití Calcium Phosphate Transfection System (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) podle návodu výrobce. Dva dny po transfekci byly buňky odebrány pomocí 2 x ošetření versinem, byly jedenkrát promyty v promývacím pufru a byly resuspendovány v promývacím pufru v hustotě 2×10^6 buněk/ml. Dvojí sady buněk byly inkubovány s 0,5 u/ml PI-PLC při 37 °C po dobu 30 minut před vazbou (^{125}I)GDNF. Tyto buňky byly promyty třikrát ledově chladným vazebným pufrům a potom byly inkubovány s 1 až 3 nM (^{125}I)GDNF spolu s dalšími buňkami při 4 °C po dobu 4 hodin. Buňky byly promyty čtyřikrát ledově chladným pufrům, byly resuspendovány v promývacím pufru doplněném 1 mM bis-suberatu pro provedení zkřížené vazby (BS³ Pierce, Rockford, IL) a byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po třech promytích v TBS byly dvojí skupiny vzorků ošetřeny 0,5 u/ml PI-PLC při 37 °C po dobu 30 minut. Tyto buňky byly peletovány a byly odebrány supernatanty. Buňky byly potom promyty v promývacím pufru a lyzovány spolu s dalšími buňkami pomocí 2 x SDS-PAGE vzorkového pufru. Buněčné lyzáty a odebrané

supernatanty byly odděleny na 7,5% SDS-PAGE.

Buněčná suspence byla rozdělena do aliquot obsahujících $1,5 \times 10^5$ buněk/vzorek. Buňky byly potom peletovány a inkubovány s různými koncentracemi (^{125}I)GDNF za přítomnosti nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF při 4 °C po dobu 4 hodin s mírným třepáním. Buňky byly promyty čtyřikrát ledově chladným promývacím pufrem a byly resuspendovány v 0,5 ml promývacím pufrem. Dvě 0,2 ml aliquoty suspence byly počítány v gamma čítači pro určení množství (^{125}I)GDNF asociovaného s buňkami.

Ačkoliv falešně transfektované 293T buňky nevykazovaly jakoukoliv vazebnou kapacitu pro GDNF, vázaly GDNFR transfektované buňky silně (^{125}I)GDNF i v pikomolární koncentracích. Tato vazba byla téměř zcela inhibována 500 nM neznačeného GDNF, což ukazuje na specifickou vazbu přirozeného GDNF na exprivované receptory.

GDNFR exprivovaný 293T buňkami může být uvolněn z buněk ošetřením fosfatidylinositol-specifickou fosfolipasou C (PI-PLC, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Ošetření transfektovaných buněk PI-PLC před vazbou ligandu téměř zcela eliminuje vazebnou kapacitu buněk pro GDNF. Kromě toho, ošetření transfektovaných buněk po zkřížené vazbě uvolňuje většinu produktů se zkříženou vazbou do media. Tyto výsledky významně ukazují, že GDNFR je zakotven v membráně prostřednictvím GPI vazby.

Data získaná ze zkřížené vazby dále ukazují, že molekulová hmotnost GDNFR je přibližně 50 - 65 kDa, což ukazuje, že je zde nízká hladina glykosylace. Ačkoliv má většina zkříženě vázaných druhů molekulovou hmotnost odpovídající monomeru receptoru, byla

také nalezena menší část s molekulovou hmotností odpovídající dimeru.

Příklad 9

GDNF signalizace je zprostředkována komplexem GDNFR a tyrosin kinasou krysího receptorového proteinu

Úvod

Myši mající cílovou nullující mutaci genu pro GDNF vykazují různé defekty ve tkáních odvozených od buněk neurální lišty, v autonomním nervovém systému a v motorických neuronech trigeminu a míchy. Nejzávažnějšími defekty jsou absence ledvin a kompletní chybění enterálních neuronů v zažívacím traktu. Fenotyp GDNF knokautovaných myší je velmi podobný fenotypu c-ret knokautovaných myší (Schuchard et al., 1994), což naznačuje možnou vazbu mezi přenosem signálu GDNF a c-ret.

Protoonkogen c-ret byl identifikován za použití sond odvozených z onkogenu izolovaného v pokus genového přenosu (Takahashi et al., Cell. 42: 581 - 588, 1985; Takahashi and Cooper, Mol. Cell Biol. 7: 1378 - 1385, 1987). Analýza sekvence c-ret DNA ukázala velký otevřený čtecí rámeček kodující novou receptorovou protein-tyrosin kinasu (PTK). Rodina receptorových PTK byla rozdělena do skupin podle struktury extracelulární domény a podle homologie sekvence s intracelulární kinasovou doménou (van der Geer et al., 1994). Jedinečná struktura extracelulární domény Ret ji zařazuje mimo jakoukoliv známou podskupinu receptorových PTK; obsahuje signální peptid, cadherinu podobný motiv, a region bohatý na cystein (van Heyningen, Nature,

367: 319 - 320, 1994; Iwamoto et al., 1993). In situ hybridizace a imunohistochemická analýza ukázala vysokou hladinu exprese ret mRNA a proteinu ve vyvíjejícím se centrálním a periferním nervovém systému a v exkretčním systému myšního embrya (Pachnis et al., 1993; Tsuzuki et al., *Oncogene* 10: 191 - 198, 1995), což ukazuje na úlohu Ret receptoru buď ve vývoji, nebo při funkci těchto tkání. Funkční ligand Ret receptoru nebyl identifikován, což omezuje další pochopení molekulárního mechanismu Ret signalizace. Mutace v c-ret jsou spojeny s dědičnou predispozicí k familiárnímu medulárnímu karcinomu štítné žlázy (FMTC) a k mnohotné endokrinní neoplasii typu 2a (MEN2A) a 2B (MEN2B). Tato onemocnění jsou pravděpodobně způsobena mutací "získání funkce", která trvale aktivuje Ret kinasu (Donis-Keller et al., *Hum. Mol. Genet.* 2: 851 - 856, 1993; Hofstra et al., *Nature* 367: 375 - 376, 1994; Mulligan et al., *Nature* 363: 458 - 460, 1993; Santoro et al., *Science* 267: 381 - 383, 1995). Tyto mutace způsobují predispozici k malignitám specificky ve tkáních odvozených z neurální lišty, ve kterých je ret normálně exprimován v období časného vývoje. Jiné genetické onemocnění asociované s ret, Hirschprungova choroba (HSCR), je charakterizována kongenitální absencí parasymptické inervace dolního trávicího traktu (Edery et al., *Nature* 367: 378 - 380, 1994; Romeo et al., 1994). Nejpravděpodobnější příčinou HSCR jsou nesmyslné mutace, které vedou k produkci zkráceného Ret proteinu bez kinasové domény nebo chybné mutace, které inaktivují Ret kinasu. Jak bylo uvedeno výše, záměrné narušení c-ret protoonkogenu u myší vede k agenesi ledvin nebo k závažné dysgenesi a k chybění enterálních neuronů v zažívacím traktu (Schuchardt et al., 1994). Tento fenotyp je velmi podobný fenotypu GDNF knokautovaných myší. Dohromady tato data naznačují, že jak Ret, tak GDNF jsou zapojeny do signální dráhy zásadní pro vývoj ledvin a enterálního nervového systému.

Jakým způsobem jsou Ret a GDNF zapojeny není, nicméně, dosud známo.

Izolace a charakterizace cDNA pro GDNFR expresním klonováním, jak bylo popsáno výše, vedla k expresi GDNFR v transformované 293T buněčné linii lidských embryonálních ledvin. Transformace vedla ke vzniku jak vysoce (K_a přibližně 2 pM), tak nízko (K_a přibližně 200 pM) afinitních vazebných míst. Vysoce afinitní vazebná místa mohla být složena z homodimerů nebo homo-oligomerů GDNFR samotného, nebo z heterodimerů nebo hetero-oligomerů GDNFR s jinými molekulami. Jak bylo uvedeno výše, jelikož GDNFR nemá cytoplasmatickou doménu, musí působit prostřednictvím jedné nebo více pomocných molekul, aby mohl působit v GDNF přenosu signálu. V této studii jsme potvrdili, že, za přítomnosti GDNFR, se GDNF asociuje s Ret protein-tyrosin kinasovým receptorem a rychle indukuje autofosforylaci Ret.

Výsledky

Neuro-2a buňky exprivující GDNFR vážou GDNF s vysokou afinitou

Neuro-2a je myší neuroblastomová buněčná linie, která endogenně exprivuje vysoké hladiny Ret proteinu (Ikeda et al., *Oncogene* 5: 1291 - 1296; Iwamoto et al., *Oncogene* 8: 1087 - 1091, 1993; Takahashi and Cooper, 1987), ale neexprivuje detekovatelné hladiny GDNFR mRNA, jak je potvrzeno Northern blottingem. Pro určení toho, zda Ret může asociovat s GDNF za přítomnosti GDNFR byla provedena studie pro vyšetření vazby (^{125}I)GDNF na Neuro-2a buňky upravené tak, aby exprivovaly GDNFR. Neuro-2a buňky byly transfektovány savčím expresním vektorem obsahujícím GDNFR cDNA (jako je expresní plasmid popsáný výše). Tři klonální linie,

NGR-16, NGR-33 a NGR-38 byly testovány na jejich schopnost vázat (^{125}I)GDNF. Nenavázaný (^{125}I)GDNF byl odstraněn na konci inkubace a bylo určeno množství radioaktivity asociované s buňkami jak je popsáno v experimentálních postupech. Všechny tři linie byly schopné specificky vázat (^{125}I)GDNF, zatímco původní Neuro-2a buňky vykazovaly malou nebo žádnou vazbu (^{125}I)GDNF (obrázek 6). Vazba mohla být účinně inhibována přidáním 500 nM neznačeného GDNF. Tyto výsledky ukazují, že Ret receptor exprivovaný na Neuro-2a buňkách není schopen vázat GDNF za absence GDNFR a jsou v souladu s dřívějším pozorováním, že GDNFR není exprivován ve významných hladinách na Neuro-2a buňkách.

Rovnovážná vazba (^{125}I)GDNF na NGR-38 buňky byla vyšetřována v širokém rozmezí koncentrace ligandu (0,5 pM až 1 nM (^{125}I)GDNF za přítomnosti nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF) (viz obrázek 7A). Po inkubaci byl nenavázaný (^{125}I)GDNF odstraněn a radioaktivita asociovaná s buňkami byla určena jak je popsáno v experimentálních postupech. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 7: (A) rovnovážná vazba (^{125}I)GDNF na NGR-38 buňky (kolečka) a Neuro-2a buňky (čtverečky) za přítomnost (prázdné čtverečky a prázdná kolečka) nebo za absence (plné kolečka a plné čtverečky) neznačeného GDNF; (B) Scatchardova analýza vazby (^{125}I)GDNF na NGR-38 buňky. Neuro-2a buňky vykazovaly nízkou vazbu i v koncentracích 1 nM (^{125}I)GDNF a tato vazba nebyla ovlivněna přidáním nadbytku neznačeného GDNF. Vazba na NGR-38 buňky byla analyzována Scatchardovým grafem jak je ukázáno na obrázku 7B. Byly detekovány dvě třídy vazebných míst, jedno s $K_d = 1,5 \pm 0,5$ pM a druhé s $K_d = 332 \pm 53$ pM. Tyto disociační konstanty byly velmi podobné hodnotám získaným pro vysoko a nízko afinitní vazebná místa na 293T buňkách přechodně exprivujících GDNFR, jak bylo popsáno výše.

GDNF asociuje s Ret v Neuro-2a buňkách exprimujících GDNFR

Pro určení toho, zda Ret receptorová PTK může asociovat s GDNF v buňkách exprimujících GDNFR byl proveden pokus zkřížené vazby za použití NGR-38 a původních Neuro-2a buněk. NGR-38 buňky byly inkubovány s (^{125}I)GDNF, ošetřeny činidlem pro zkříženou vazbu a potom lyzovány buď přímo v SDS-PAGE vzorkovém pufru, nebo v Triton X-100 pufru pro lýzu a potom byly imunoprecipitovány s anti-Ret protilátkou jak je popsáno v postupech pro pokusy. Imunoprecipitáty byly analyzovány SDS-PAGE za absence (NR) nebo za přítomnosti (R) -merkaptoethanolu. Lyzáty byly ošetřeny Ret specifickou protilátkou, imunoprecipitovány a analyzovány SDS-PAGE za redukčních podmínek (viz obrázek 8, proužky jsou označeny následovně: ≈ 75 kDa, plné trojúhelníčky; ≈ 150 kDa, prázdné trojúhelníčky; ≈ 185 kDa, plné šipky; ≈ 250 kDa, hvězdičky; ≈ 400 kDa, prázdné šipky). Nejviditelnějšími zkříženě vázanými typy byly ≈ 75 kDa a ≈ 185 kDa, s méně intenzivními proužky ≈ 150 kDa a ≈ 250 kDa. Také byl viditelný velmi slabý proužek ≈ 400 kDa (obrázek 8, linie 2). Když byly imunoprecipitáty analyzovány neredukční SDS-PAGE, tak byly ≈ 75 kDa, ≈ 150 kDa a ≈ 185 kDa proužky přítomné asi ve stejné intenzitě jako v redukčním gelu, ale množství ≈ 400 kDa proužku se dramaticky zvýšilo (obrázek 8, linie 4). Také se stal výraznějším proužek o ≈ 250 kDa.

Jak za redukčních, tak za neredukčních podmínek byly při použití původních Neuro-2a buněk místo NGR-38 buněk pozorovány proužky stejné molekulové hmotnosti, ale výrazně redukované intenzity (obrázek 8, linie 1 a 3). ≈ 75 kDa a ≈ 150 kDa proužky pravděpodobně představují zkříženě vázané komplexy GDNF a GDNFR, protože proužky se stejnou molekulovou hmotností jsou produkovány

zkříženou vazbou v 293T buňkách, které neexprimují Ret. Kromě toho, vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost Ret je 170 kDa, musí mít jakýkoliv komplex obsahující Ret nejméně tuto hmotnost.

Skutečnost, že tyto komplexy jsou imunoprecipitovány anti-Ret protilátkou naznačuje, že to jsou produkty asociace mezi Ret a GDNF/GDNFR komplexy, která byla narušena při podmínkách gelové analýzy. Předpokládá se, že široký proužek ≈ 185 kDa se pravděpodobně skládá z molekuly Ret (170 kDa) zkříženě vázané s molekulou monomerního rekombinantního GDNF (15 kDa), ačkoliv mohou být obsaženy některé dimerické GDNF. Přítomnost Ret v tomto typu byla potvrzena separátním pokusem, ve kterém byl pozorován proužek stejné molekulové hmotnosti, když byl neznačený GDNF zkříženě vázán na NGR-38 buňky a produkty byly vyšetřovány Western blottingem s anti-Ret protilátkou (data nejsou ukázána).

≈ 400 kDa proužek nebyl spolehlivě identifikován, částečně z důvodů obtížného hodnocení jeho molekulové hmotnosti. Skutečnost, že je výrazný pouze za neredukčních podmínek naznačuje, že to je disulfidově vázaný dimer jednoho nebo více typů pozorovaných za redukčních podmínek. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že představuje dimer typu o 185 kDa, ačkoliv může být směsí komplexů o vyšší molekulové hmotnosti skládajících se ze dvou Ret, jednoho nebo dvou GDNFR a jednoho nebo dvou GDNF. Přesná identita ≈ 250 kDa proužku nebyla dosud určena. Jednou možností je, že představuje zkříženě vázané heterodimery ≈ 75 kDa (GDNF + GDNFR) ≈ 185 kDa (GDNF + Ret) komplexů.

GDNF stimuluje autofosforylaci Ret v Neuro-2a buňkách exprimujících GDNFR

Schopnost Ret receptorové protein tyrosin kinasy asociovat s GDNF za přítomnosti GDNFR vedla ke studiu GDNF stimulace autofosforylace Ret. NGR-38 buňky byly ošetřeny GDNF, lyzovány a lyzáty byly imunoprecipitovány s anti-Ret protilátkou. Imunoprecipitáty byly analyzovány Western blottingem za použití anti-fosfotyrosinových protilátek jak je popsáno v postupech pro pokusy. Když byly NGR-38 buňky (obrázek 9A, linie 2 - 4) ošetřeny přečištěným rekombinantním GDNF produkovaným buď v savčích (CHO buňky; obrázek 9A, linie 4) nebo E. coli buňkách (obrázek 9A, linie 1, 3), tak byl pozorován silný proužek při 170 kDa, ukazující na autofosforylaci tyrosinových zbytků ve zralé formě Ret. O mnoho slabší odpovídající proužek byl pozorován u GDNF ošetřených Neuro-2a buněk (obrázek 9A, linie 1). Žádná fosforylace nebyla pozorována na alternativně glykosylované 150 kDa prekursorové formě Ret (obrázek 9A). Indukce Ret autofosforylace GDNF byla závislá na dávce. Závislost na dávce a kinetika GDNF indukované Ret tyrosinové fosforylace v NGR-38 buňkách jsou ukázány v panelech B a C. Ve všech panelech jsou proužky 170 kDa Ret s fosforylovaným tyrosinem ukázány plnou šipkou. Množství Ret proteinu zavedeného v každé linii, jak je určeno opětovným sondováním imunoblotů anti-Ret protilátkou (Santa-Cruz, C-19, kat. č. sc-167) je ukázáno na pravé straně panelu A. Proužek \approx 150 kDa představuje alternativně glykosylovanou nezralou formu Ret, která se neautofosforyluje. Jak je ukázáno na obrázku 9B, stimulace Ret autofosforylace v NGR-38 buňkách může být detekována 50 pg/ml GDNF a odpověď byla saturována při 20 - 50 ng/ml GDNF. Stimulace Ret autofosforylace přečištěným rekombinantním GDNF v NGR-38 buňkách v průběhu 0

- 20 minut po ošetření je ukázána na obrázku 9C. Zvýšené hladiny Ret autofosforylace mohou být pozorovány během jedné minuty po ošetření GDNF a jsou maximální v 10. minutě po ošetření (obrázek 9C).

GDNF a solubilní GDNFR indukují Ret autofosforylaci v Neuro-2a buňkách

Jak bylo uvedeno výše, GDNFR je připojen na cytoplasmatickou membránu GPI vazbou a může být uvolněn fosfatidylinositol-specifickou fosfolipasou C (PI-PLC). Když byly NGR-38 buňky inkubovány s PI-PLC, tak byla GDNF indukovaná receptorová autofosforylace Ret zrušena (obrázek 10A; PI-PLC ošetřené (linie 1) nebo neošetřené (linie 2 a 3) NGR-38 buňky byly inkubovány s (linie 1 a 3) nebo bez (linie 2) GDNF a byly analyzovány na Ret autofosforylaci imunoblotingem jak je popsáno v postupech pro pokusy).

Obrázek 10B znázorňuje původní Neuro-2a buňky ošetřené (linie 2, 4, 6, 8) nebo neošetřené (linie 1, 3, 5, 7) GDNF za přítomnosti (linie 5 - 8) nebo za absence (linie 1 - 4) PI-PLC/CM získaného z Neuro-2a nebo z NGR-38 buněk, jak je analyzováno pro Ret autofosforylaci imunoblotingem jak je popsáno v postupech pro pokusy. NGR-38 buňky ošetřené GDNF byly použity jako pozitivní kontrola. V obou panelech jsou proužky 170 kDa Ret s fosforylovaným tyrosinem ukázány plnou šipkou. Když bylo kondicionované medium obsahující solubilní GDNFR uvolněný ošetřením NGR-38 buněk PI-PLC (PI-PLC/CM) přidáno k původním Neuro-2a buňkám spolu s GDNF, tak byla pozorována autofosforylace Ret receptoru srovnatelná s autofosforylací získanou při GDNF ošetření NGR-38 buněk (obrázek 10B, linie 2 a 8). Pouze hladiny

pozadí Ret autofosforylace byly pozorovány pokud nebyl přidán GDNF, nebo pokud bylo testováno kondicionované medium odvozené od PI-PLC ošetření Neuro-2a buněk (obrázek 10B, linie 3-7).

Ret-Fc fúsní protein blokuje Ret fosforylaci indukovanou GDNF a solubilním GDNFR

Pro potvrzení toho, že Ret fosforylace indukovaná GDNF za přítomnosti GDNFR je důsledkem autofosforylace receptoru byla provedena studie pro určení toho, zda může fúsní protein Ret extracelulární doména/immunoglobulinový Fc (Ret-Fc) blokovat aktivaci Ret. Vzhledem k technické obtížnosti blokování velkého počtu GDNF alfa receptorů exprivovaných na NGR-38 buňkách byl test Ret fosforylace proveden za použití Neuro-2a jako cílových buněk a kultivačního media odebraného z NGR-38 buněk ošetřených PI-PLC jako zdroje GDNFR. Buňky byly ošetřeny směsí obsahující různé kombinace GDNF (50 ng/ml), media obsahujícího solubilní GDNFR (například PI-PLC/CM odvozeného od NGR-38 buněk) a různých koncentrací Ret-Fc fúsního proteinu samotného nebo v různých kombinacích jak je ukázáno na obrázku 11. Neuro-2a buňky byly ošetřeny GDNF, mediem obsahujícím solubilní GDNFR, Ret-Fc nebo předem inkubovanými směsmi. Buňky byly potom lyzovány a lyzáty byly analyzovány na c-Ret autofosforylaci pomocí imunoprecipitace za použití anti-Ret protilátky jak je popsáno v postupech pro pokusy. Imunoprecipitáty byly analyzovány Western blottingem za použití anti-fosfotyrosinové protilátky.

Předem inkubované směsi GDNF a media obsahujícího solubilní GDNFR indukovaly fosforylaci tyrosinu na Ret receptorech exprivovaných na Neuro-2a v hladinách srovnatelných s GDNF-ošetřenými NGR-38 kontrolními buňkami (obrázek 11, linie 7 a

2). Pozice autofosforylovaného 170 kDa Ret proužku jsou označeny plnou šipkou. Když byl Ret-Fc fúsní protein obsažen v pre-inkubované GDNF/GDNFR směsi, tak byla Ret fosforylace inhibována způsobem závislým na dávce (obrázek 11, linie 8-10). Toto naznačuje, že Ret fosforylace je výsledkem GDNF/Ret interakce zprostředkované GDNFR. V neošetřených Neuro-2a buňkách nebo v buňkách ošetřených jakoukoliv kombinací GDNF nebo Ret-Fc fúsního proteinu za absence GDNFR byly pozorovány pouze základní hladiny fosforylace Ret (obrázek 11, linie 3-6).

GDNF indukuje autofosforylaci c-Ret exprivovaného v embryonálních motorických neuronech

Míšní motorické neurony jsou jedním z hlavních cílů účinku GDNF in vivo (Henderson et al., Science 266: 1062 - 1064, 1994; Li et al., Proceedings of The National Academy Of Sciences USA 92: 9771 - 9775, 1995; Oppenheim et al., Nature 373: 344 - 346, 1995; Yan et al., Nature 373: 341 - 344, 1995; Zurn et al., Neuroreport 6: 113 - 118, 1995). Pro testování schopnosti GDNF indukovat autofosforylaci Ret v těchto buňkách byly embryonální krysy míšní motorické neurony ošetřeny s (linie 2 a 4) nebo bez (linie 1 a 3) 20 ng/ml GDNF, po čemž následovala lýza buněk, imunoprecipitace anti-Ret protilátkou a analýza Western blottingem s anti-fosfotyrosinovou protilátkou jak je popsáno v postupech pro pokusy. V lyzátu buněk ošetřených GDNF byl pozorován proužek proteinu fosforylovaného na tyrosinu s molekulovou hmotností \approx 170 kDa (obrázek 12, linie 2). Žádný takový signál nebyl pozorován u buněk ošetřených vazebným pufrem samotným (obrázek 12, linie 1). Když byl stejný Western blotový filtr rozstříhán a znovu sondován anti-Ret protilátkou (t.j. bylo určeno množství c-Ret proteinu zavedené do každé linie opětovným sondováním

imunoblotů anti-Ret protilátkou), tak se v obou vzorkách objevily proužky se stejnou molekulovou hmotností a stejnou intesitou (obrázek 12, linie 3 a 4). Fosfotyrosinový proužek v GDNF ošetřených buňkách migroval současně s proužkem Ret-proteinu, což ukazuje, že GDNF stimuloval autofosforylaci Ret. Autofosforylované Ret proužky (linie 1 a 2) a odpovídající proteinové proužky (linie 3 a 4) jsou označeny plnou šipkou.

Diskuse

Polypeptidové růstové faktory způsobují svůj účinek prostřednictvím na své odpovídající povrchové buněčné receptory. Receptory mohou být rozděleny do několika skupin na základě jejich struktury a mechanismu účinku. Tyto klasifikace zahrnují proteinové tyrosin kinasy (PTK), serin/threonin kinasy a cytokinové receptory. Receptorová PTK signalizace je zahájena přímou interakcí s ligandem, která indukuje dimerizaci nebo oligomerizaci receptoru, která potom vede k autofosforylaci receptoru. Aktivovaný receptor potom vychytává a fosforyluje intracelulární substráty, čímž spouští kaskádu dějů, které vrcholí v biologické odpovědi (Schlessinger and Ullrich, Neuron 9: 383 - 391, 1992). Naopak, signální přenos serin/threoninovou kinasou nebo cytokinovými receptory často vyžaduje tvorbu mnoha-složkových receptorových komplexů, ve kterých se odlišují složky vazby ligandu a přenosu signálu. Příkladem jsou TGF-receptorový komplex, serin/threonin kinasový receptor skládající se z separátní vazebné (typ II) a signalizační (typ I) složky a CNTF rodina. CNTF, interleukin 6 (IL-6) a leukocytární inhibiční faktor (LIF) mají společnou signální složku, gp130 a/nebo LIFR, ve svých příslušných receptorových komplexech. Zatímco specificita pro ligand těchto komplexů je určena

specifickou vazebnou podjednotkou pro každý jednotlivý ligand, přenos signálu vyžaduje asociaci počátečního komplexu ligandu a vazebné podjednotky pro ligand s další receptorovou podjednotkou, která nemůže přímo vázat ligand (Ip et al., Cell 69: 1121 - 1132, 1992). V CNTF receptorovém komplexu je složkou pro vazbu ligandu CNTF receptor (CNTFR), který je podobný GDNFR, což je GPI vázaný membránový protein. Předkládaný vynález obsahuje popis prvního příkladu receptorové PTK, jejíž autofosforylace je závislá na asociaci s oddělenou ligand-specifickou vazebnou složkou.

Předkládaná studie potvrdila, že GDNFR, GPI-vázaný membránový protein, který váže GDNF s vysokou afinitou, je nutný pro účinnou asociaci GDNF s Ret receptorovou PTK. Za absence GDNFR není GDNF schopen vazby na Ret nebo stimulace autofosforylace Ret receptoru. Za přítomnosti GDNFR asociuje GDNF rychle s Ret a rychle indukuje autofosforylaci Ret způsobem závislým na dávce. GDNFR je schopen působit jak ve formě vázané na membránu, tak v solubilní formě (obrázek 11), jak bylo uvedeno výše. Koncentrace GDNF 50 pg/ml (1,7 pM) jsou schopné aktivovat Ret tyrosin kinasu v buňkách exprimujících GDNFR. Toto je v souladu s disociační konstantou (1,5 pM) zjištěnou pro vysokoafinitní GDNF vazebná místa na NGR-38 buňkách. Rychlá indukce Ret fosforylace GDNF (detekovatelná jednu minutu po ošetření) a schopnost Ret-Fc blokovat autofosforylaci naznačují, že Ret je aktivován přímo, spíše než v důsledku fosforylace některých jiných receptorů.

Studie zkřížené vazby podporují hypotézu, že účinná asociace Ret s GDNF závisí na GDNFR. Zkřížená vazba GDNF na Ret v NGR-38 buňkách, které exprimují vysoké hladiny GDNFR je masivní, ale v původních Neuro-2a buňkách jsou zkříženě vázané produkty stěží detekovatelné. Ačkoliv je jednoznačná identifikace všech zkříženě

vázaných komplexů obtížná, data jasně ukazují asociaci Ret s GDNF, která je závislá na GDNFR a ukazují, že GDNFR je obsažen v některých z těchto zkříženě vázaných produktů. Důvod pro přítomnost menších zkříženě vázaných typů v Neuro-2a buňkách není jasný. Ačkoliv exprese GDNFR mRNA v Neuro-2a buňkách nemůže být detekována Northern blottingem, je možné, že GDNFR je v těchto buňkách exprimován ve velmi nízkých hladinách.

Skutečnost, že Ret může být aktivován GDNF v kultivovaných krysích embryonálních míšních motorických neuronech dále demonstruje biologický význam Ret/GDNF interakce. Tyto buňky jsou primárním cílem GDNF in vivo a bylo prokázáno, že reagují na nízké dávky GDNF in vitro (Henderson et al., 1994). Stimulace Ret fosforylace byla zrušena, když byly motorické neurony předem ošetřeny PI-PLC (data nejsou ukázána), což naznačuje, že aktivace Ret GDNF vyžaduje GDNFR.

Ačkoliv je vazba ligandu na extracelulární doménu receptoru prvním krokem v aktivaci jiných známých receptorových PTK, předkládaná data naznačují, že toto není případ GDNF a Ret. Obrázek 13 ukazuje model pro vazbu GDNF a GDNFR na Ret a následnou aktivaci Ret PTK v odpovědi na GDNF. Počátečním dějem v tomto procesu je vazba disulfidově vázaného GDNF na GDNFR buď v monomerní, nebo v dimerické formě. Ačkoliv v současnosti neexistuje přímý důkaz pro existenci dimerického GDNFR, byly při transfekci 293T buněk GDNFR cDNA pozorovány dvě třídy vazebných míst. Nejjednodušším vysvětlením pro toto pozorování je existence monomerního a dimerického GDNFR, každého s vlastní vazebnou afinitou pro ligand. Toto je v souladu s objevem, že vazebné afinity pro GDNF jsou jasně neovlivněny přítomností Ret. Protože předkládané pokusy nebyly adresovány otázce, zda je dimerický

GDNFR v rovnováze se svým monomerem za absence GDNF nebo zda je dimerizace indikována vazbou GDNF, jsou zde tyto možnosti prezentovány jako alternativní dráhy. Komplex složený z dimerického GDNFR a dimerického GDNF může vázat dvě molekuly Ret, za vytvoření aktivního signálního komplexu. Stejně jako u jiných PTK, těsný kontakt mezi intracelulárními katalytickými doménami dvou Ret vede pravděpodobně k autofosforylaci receptoru. Tato úvaha, že Ret působí tímto mechanismem, je podporována skutečností, že MEN2A mutace, která způsobuje rovnovážný stav dimerizace Ret, vede ke konstitutivní aktivaci Ret kinasy (Santoro et al., 1995).

Bylo popsáno, že motorické neurony odpovídají na GDNF s ED_{50} i 5 fM (Henderson et al., 1994). Ačkoliv je obtížné srovnávat vazebnou afinitu s ED_{50} vzhledem k biologické odpovědi, je možné, že na těchto buňkách existují GDNF vazebná místa s velmi vysokou afinitou. U dalších buněk, jako jsou například embryonální kuřecí sympatické neurony, byla popsána vazba GDNF s K_d 1 - 5 nM (Trupp et al., Journal of Cell Biology 130: 137 - 148, 1995). Je nepravděpodobné, že GDNFR je obsažen v receptorovém komplexu pro takové nízkoafinitní místa, ale může zde být přítomna slabá přímá interakce mezi GDNF a Ret.

Expresce c-ret byla pozorována během embryogeneze v mnoha buněčných liniích vyvíjejícího se centrálního a periferního nervového systému, včetně buněk centrálního nervového systému (Pachnis et al., Development 119: 1005 - 1017, 1993; Tsuzuki et al., 1995). Mimo nervový systém byla expresce c-ret detekována ve Wolffiiho duktu, epitelu ureterálního pupenu a sběrných kanálků ledvin (Pachnis et al., výše; Tsuzuki et al., 1995). Ret expresce byla také detekována ve všech neuroblastomových buněčných liniích.

odvozených z neurální lišty (Ikeda et al., 1990) a z chirurgicky resekovaných neuroblastomů (Nagao et al., 1990; Takahashi and Cooper, 1987). GDNF exprese byla pozorována v CNS i PNS, stejně jako v non-neuronálních tkáních v průběhu embryonálního vývoje. Hladiny GDNF exprese nalezené v mnoha non-neuronálních tkáních byly vyšší než v nervovém systému (Choi-Lundberg and Bohn, Brain Res. Dev. Brain. Res. 85: 80 - 88, 1995). Ačkoliv exprese GDNFR nebyla ve větší míře studována, primární Northern blot analýzy detekovaly přítomnost vysokých hladin GDNFR mRNA v játrech, mozku a ledvinách dospělých krys a myší. Podobnost charakteru exprese ret, GDNF a GDNFR ve vyvíjejícím se nervovém systému a ledvinách je v souladu s jejich kombinovaným účinkem v průběhu vývoje.

Vývoj savčích ledvin byl určen jako důsledek recipročních interakcí mezi metanefronem a vyvíjejícím se ureterem, větvi vzniklou z kaudální části Wolffova vývodu (Saxen, Organogenesis of the kidney, Development and Cell Biology Series, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1987). Zatímco exprese Ret byla zjištěna v ureterálním pupenu, ale nikoliv v okolním mesenchymu vyvíjejících se embryí, exprese GDNF byla detekována v nediferencovaném, ale ne v dospělém metanefrickém kalichu ledviny. Tato pozorování naznačují, že interakce mezi GDNF a Ret je odpovědná za iniciaci procesu vývoje ureterální struktury. Další podpora této hypotézy je poskytnuta cíleným narušením GDNF a ret genů, které vede k velmi podobným fenotypovým defektům v ledvinách (Schuchard et al., Nature 367: 380 - 383, 1994; Sanchez, v tisku). Dalším hlavním fenotypovým defektem pozorovaným jak u GDNF (-/-), tak u ret (-/-) knokautovaných zvířat je kompletní ztráta enterálních neuronů v zažívacím traktu. Hirsprungova choroba, genetická choroba charakterizovaná kongenitální absencí parasympatické inervace v dolním střevním

traktu, je také spojena s mutací se "ztrátou funkce" v ret (Romeo et al., Nature 367: 377 - 378, 1994; Edery et al., 1994). Pozdější zprávy (Angrist et al., Hum. Mol. Genet. 4: 821 - 830, 1995) ukazují, že oproti dřívějším pozorováním, nemají někteří pacienti s Hirsprungovou nemocí mutaci v ret. Nyní se předpokládá, že takový pacienti mohou mít mutaci v GDNF, GDNFR nebo v některé z dalších kritických složek této signální dráhy.

Postupy pro pokusy

$(^{125}\text{I})\text{GDNF}$ vazba na Neuro-2a buňky exprivující GDNFR

Neuro-2a buňky (ATCC CCL 131) byly transfektovány expresním plasmidem, jak je popsáno výše, za použití Calcium Phosphate Transfection System (GIBCO/BRL) podle návodu výrobce. Transfektované buňky byly selektovány na expresi plasmidu kultivací v 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 antibiotika (Sigma). G418 resistantní kolonie byly expandovány a testovány na GDNFR expresi vazbou na $(^{125}\text{I})\text{GDNF}$ (Amersham Inc., obvyklá jodinace, katal. č. IMQ1057). Buňky z každého klonu byly umístěny v hustotě 3×10^4 buněk/ cm^2 ve dvojím provedení v jamkách 24-jamkových tkáňových kultivačních ploten (Becton Dickinson) předem potažených polyornitinem. Buňky byly jedenkrát promyty ledově chladným promývacím pufrem (DMEM obsahující 25 mM HEPES, pH 7,5) a byly potom inkubovány s 50 pM $(^{125}\text{I})\text{GDNF}$ ve vazebném pufru (promývací pufr plus 0,2% BSA) při 4 °C po dobu 8 hodin buď za přítomnosti, nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF. Buňky byly potom promyty 4x ledově chladným promývacím pufrem, lyzovány v 1 M NaOH a radioaktivita asociovaná s buňkami byla kvantifikována v 1470 Wizard Automated Gamm Counter (Wallac Inc.). Množství GDNFR exprivované jednotlivými koloniemi bylo hodnoceno poměrem

(^{125}I)GDNF navázaného na buňky za přítomnosti a za absence neznačeného GDNF. Tři klony byly vybrány jako reprezentativní pro vysokou, střední a nízkou hladinu exprese GDNFR pro použití ve vazebných pokusech. Poměr (^{125}I)GDNF navázaného za absence a za přítomnosti neznačeného GDNF pro tyto klony byl: NGR-38) 16:1, NGR-16) 12,8:1 a NGR33) 8:1. Rovnovážná vazba (^{125}I)GDNF na NGR-38 buňky byla provedena jak je popsáno výše s tou výjimkou, že koncentrace značeného GDNF byly v rozmezí od 0,5 pM do 1 nM. Ve všech testech byla nespecifická vazba, jak je určena množstvím radiaktivity navázané na buňky za přítomnosti 500 nM neznačeného GDNF, odečtena od vazby za absence neznačeného GDNF. Vazebná data byla analyzována Scatchardovým grafem.

Chemická zkřížená vazba

Neuro-2a nebo NGR-38 buňky byly promyty jedenkrát fosfátem pufrovaným salinickým roztokem (PBS, pH 7,1), potom byly ošetřeny při 4 °C 1 nebo 3 nM (^{125}I)GDNF ve vazebném pufru za přítomnosti nebo za absence 500 nM neznačeného GDNF. Po vazbě byly buňky promyty čtyřikrát ledově chladným promývacím pufrům a byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 45 minut s 1 mM bis suberatu (BS^3 , Pierce) v promývacím pufru. Reakce zkřížené vazby byla utlumena promytím buněk třikrát Tris-pufrovaným salinickým roztokem (TBS, pH 7,5). Buňky byly potom buď přímo lyzovány v SDS-PAGE vzorkovém pufru (80 mM Tris HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 1% SDS, 0,025% bromfenolová modř) nebo v Triton X-100 lyzovacím pufru (50 mM HEPES, pH 7,5, 1% Triton X-100, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM pyrofosforečn sodný, 1% aprotinin (Sigma, katal. č. A-6279), 1 mM PMSF (Sigma, katal. č. P-7626), 0,5 mM Na_3VO_4 (Fisher, katal. č. S454-50). Lyzáty byly projasněny centrifugací, inkubovány s 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-Ret protilátkou (Santa Cruz Antibody,

C-19, katal. č. SC-167) a vzniklé imunokomplexy byly odebrány precipitací s protein A - Sepharosa CL-4B (Pharmacia). Imunoprecipitáty byly promyty třikrát pufrem pro lýzu, jedenkrát 0,5% NP-40 obsahujícím 50 mM NaCl a 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, a potom byly resuspendovány v SDS-PAGE vzorkovém pufru. Jak lyzáty celých buněk, tak imunoprecipitáty byly frakcionovány 7,5% SDS-PAGE s poměrem Bis: Akrylamid 1:200.

Western blot analýza

Autofosforylace Ret receptoru byla vyšetřována Western blot analýzou. Stručně, buňky byly umístěny 24 hodin před testem v 6-jamkových tkáňových kultivačních plotnách v hustotě $1,5 \times 10^6$ buněk/jamku. Buňky byly promyty jedenkrát vazebným pufrem a byly ošetřeny různými koncentracemi různých činidel (včetně GDNF, PI-PLC, PI-PLC/CM, a Ret-Fc fúsního proteinu), buď jednotlivě, nebo v kombinaci, ve vazebném pufru po různou dobu. Ošetřené buňky a neošetřené kontroly byly lyzovány v Triton X-100 pufru pro lýzu a imunoprecipitovány s anti-Ret protilátkou (Santa Cruz, C-19, katal. č. SC-167) a protein-A Sepharosou jako bylo popsáno výše. Imunoprecipitáty byly frakcionovány SDS-PAGE a byly přeneseny do nitroceluloseových membrán jak je to popsáno v Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1988). Membrány byly pre-blokovány 5% BSA (Sigma) a hladina fosforylace tyrosinu byla určena blotováním membrány s anti-fosfotyrosinovou monoklonální protilátkou 4G10 (UBI, katal. č. 05-321) při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Množství proteinu obsažené v každé linii bylo určeno vystřižením a re-sondováním stejné membrány anti-Ret protilátkou. Nakonec byla membrána ošetřena chemiluminiscenčními činidly (ECL, Amersham) podle návodu výrobce a byla exponována na

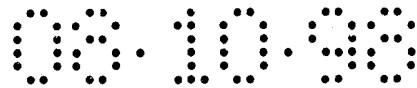
RTG filmech (Hyperfilm-ELC, Amersham).

Ošetření buněk PI-PLC a vývoj PI-PLC ošetřeného kondicionovaného media

Pro uvolnění DPI-vázaného GDNFR z buněčného povrchu byly buňky promyty jedenkrát promývacím pufrem, potom byly inkubovány s 1 U/ml fosfatidylinositol specifické fosfolipasy C (PI-PLC, Boehringer Mannheim, katal. č. 1143069) ve vazebném pufru při 37 °C po dobu 45 minut. Buňky byly potom promyty třikrát promývacím pufrem a byly dále zpracovány pro test Ret autofosforylace nebo zkřížené vazby. Pro generování PI-PLC kondicionovaného media (PI-PLC/CM) bylo 8×10^6 buněk odebráno z tkáňových kultivačních ploten ošetřením buněk PBS obsahujícím 2 mM EDTA při 37 °C po dobu 5 až 10 minut. Buňky byly promyty jedenkrát promývacím pufrem, byly resuspendovány v 1 ml vazebného pufru obsahujícím 1 U/ml PI-PLC a byly inkubovány při 37 °C po dobu 45 minut. Buňky byly peletovány a bylo odebráno PI-PLC/CM.

Příprava Ret-Fc fúsního proteinu

cDNA obsahující celý kodující region c-Ret byla izolována z den 17 krysí placentární cDNA knihovny za použití oligonukleotidové sondy odpovídající prvním 20 aminokyselinám myšího c-Ret (Iwamoto et al., 1993; van Heyningen, 1994). Kodující region pro extracelulární doménu Ret receptoru (končící poslední aminokyselinou, R636) byl fúsován v rámečku s DNA kodující Fc region lidského IgG (IgG1) a byl subklonován do expresního vektoru pDSR2 jak bylo popsáno dříve (Bartley et al., Nature 368: 558 - 560, 1994). Ret-Fc/pDSRa2 plasmid byl transfektován do ovariálních buněk čínské křečka (CHO) a



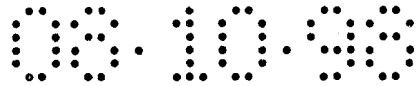
rekombinantní Ret-Fc fúsní protein byl přečištěn afinitní chromatografií za použití Ni^{++} kolony (Qiagen).

Příprava kultur embryonálních krysích míšních motorických neuronů

Obohacené kultury embryonálních krysích míšních motorických neuronů byly připraveny z celé míchy plodů E15 Sprague-Dawley krys 24 hodin před pokusem. Míchy byly vyříznuty a byly odstraněny pleny míšní a ganglia zadních kořenů míšních (DRG). Míchy byly nastříhány na malé fragmenty a byly tráveny papainem v L15 mediu (Papain Kit, Worthington). Motorické neurony, které jsou větší než jiné typy buněk přítomných v disociované buněčné suspensi, byly obohaceny za použití 6,8% Metrizamidového gradientu (Camu and Henderson, J. Neuroscience 44: 59 - 70, 1992). Obohacené motorické neurony v mezivrstvě mezi metrizamidovou vrstvou a buněčnou suspenzí byly odebrány, promyty a umístěny na tkáňové kultivační disky předem potažené poly-L-ornitinem a lamininem v hustotě asi 9×10^4 buněk/cm² a byly kultivovány při 37 °C.

Jsou zde citované různé odkazy, jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkaz ve své úplnosti.

Ačkoliv byl předkládaný vynález popsán ve smyslu výhodných provedení a příkladných aminokyselinových sekvencí a sekvencí nukleových kyselin, je jasné, že mohou existovat jeho variace a modifikace. Proto pokrývají připojené patentové nároky všechny takové ekvivalentní variace, které spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.



Odkazy:

Angrist, M., Bolk, S., Thiel, B., Puffenberger, E.G., Hofstra, R.M., Buys, C.H., Cass, D.T., and Chakravarti, A. (1995). Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* 4, 821-830.

Arenas, E., Trupp, M., Akerud, P., and Ibanez, C.F. (1995). GDNF Prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15, 1465-1473.

Aruffo, A. and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 84, 8573-8577.

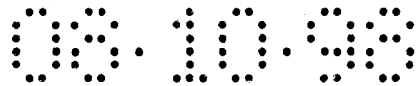
Bartley, T.D., Hunt, R.W., Welcher, A.A., Boyle, W.J., Parker, V.P., Lindberg, R.A., Lu, H.S., Colombero, A.M., Elliott, R.L., Guthrie, B.A., Holst, P.L., Skrine, J.D., Toso, R.J., Zhang, M., Fernandez, E., Trail, G., Varnum, B., Yarden, Y., Hunter, T., and Fox, G.M. (1994). B61 is a Ligand for the ECK Receptor protein-tyrosine kinase. *Nature.* 368, 558-560.

Beck, K.D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R.A., Rosenthal, A., and Hefti, F. (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature.* 373, 339-341.

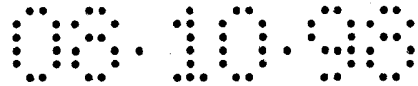
Camu, W. and Henderson, C. (1992). Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor. *J Neuroscience.* 44, 59-70.

Choi-Lundberg, D.L. and Bohn, M.C. (1995). Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 80-88.

Davis, S., Aldrich, T.H., Valenzuela, D.M., Wong, V.V., Furth, M.E., Squinto, S.P., and Yancopoulos, G.D. (1991). The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science.* 253, 59-63.



- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K., Toshima, K., Lairmore, T., Howe, J., Moley, J., Goodfellow, P. and Wells, S. (1993). Mutations in the ret proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum. Molec. Genet.* 2, 851-856.
- Ebendal, T., Tomac, A., Hoffer, B.J., and Olson, L. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. *Journal Of Neuroscience Research.* 40, 276-284.
- Economides, A.N., Ravetch, J.V., Yancopoulos, G.D., and Stahl, N. (1995). Designer cytokines: targeting actions to cells of choice. *Science* 270, 1351-1353.
- Edery, P., Lyonnet, S., Mulligan, L., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B. and Munnich, A. (1994). Mutations of the ret proto-oncogene in Hirschsprug's disease. *Nature.* 367, 378-380.
- Gearing, D.P., King, J.A., Gough, N.M., and Nicola, N.A. (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO Journal* 8, 3667-3676.
- Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simpson, L.C., Moffet, B., Vandlen, R.A., Koliatsos, V.E., and et al (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science.* 266, 1062-1064.
- Hoffer, B.J., Hoffman, A., Bowenkamp, K., Huettl, P., Hudson, J., Martin, D., Lin, L.F., and Gerhardt, G.A. (1994). Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neuroscience Letters.* 182, 107-111.
- Hofstra, R., Landsvater, R., Ceccherini, I., Stulp, R., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener, J., van Amstel, H., Romeo, G., Lips, C. and Buys, C. (1994). A mutation in the ret proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature.* 367, 375-376.
- Ikeda, I., Ishizaka, Y., Tahira, T., Suzuki, T., Onda, M., Sugimura, T., and Nagao, M. (1990). Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma



cell lines. *Oncogene*. 5, 1291-1296.

Ip, N.Y., Nye, S.H., Boulton, T.G., Davis, S., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D.J., and et al (1992). CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell*. 69, 1121-1132.

Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asia, N., Ohkusu, K., Nakashima, I. and Takahashi, M. (1993). cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene*. 8, 1087-1091.

Jing, S.Q., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C., and Trowbridge, I.S. (1990). Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *Journal Of Cell Biology*. 110, 283-294.

Kearns, C.M. and Gash, D.M. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Research*. 672, 104-111.

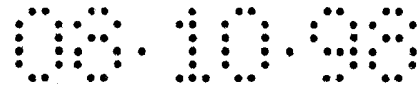
Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*. 15, 8125-8148.

Li, L., Wu, W., Lin, L.F., Lei, M., Oppenheim, R.W., and Houenou, L.J. (1995). Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 92, 9771-9775.

Lin, L-F.H., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 260, 1130-1132.

Louis, J.C., Magal, E., and Varon, S. (1992). Receptor-mediated toxicity of norepinephrine on cultured catecholaminergic neurons of the rat brain stem. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 262, 1274-1283.

Mount, H.T., Dean, D.O., Alberch, J., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*



Of The United States Of America. 92, 9092-9096.

Mulligan, L., Kwok, J., Healey, C., Elsdon, M., Eng, C., Gardner, E., Love, D., Mole, S., Moore, J., Papi, L., Ponder, M., Telenius, H., Tunnacliffe, A. and Ponder, A. (1993). Germ-line mutations of the ret proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 363, 458-460.

Oppenheim, R.W., Houenou, L.J., Johnson, J.E., Lin, L.F., Li, L., Lo, A.C., Newsome, A.L., Prevet, D.M., and Wang, S. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*. 373, 344-346.

Pachnis, V., Mankoo, B., and Costantini, F. (1993). Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*, 119, 1005-1017.

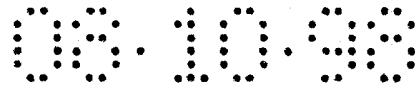
Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 85, 2444-2448.

Poulsen, K.T., Armanini, M.P., Klein, R.D., Hynes, M.A., Phillips, H.S., and Rosenthal, A. (1994). TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron*. 13, 1245-1252.

Romeo, G., Patrizia, R., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kaariainen, H. and Maartucciello, G. (1994). Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the ret proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*. 367, 377-378.

Santoro, M., Carlomagno, F., Romeo, A., Bottaro, D., Dathan, N., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B., Kraus, M. and Di Fiore, P. (1995). Activation of ret as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*. 267, 381-383.

Sauer, H., Rosenblad, C., and Bjoerklund, A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of*



America. 92, 8935-8939.

Saxen, L. (1987). Organogenesis of the kidney. Development and Cell Biology series, Cambridge University Press, Cambridge, England.

Schaar, D.G., Sieber, B.A., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (1993). Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Experimental Neurology*. 124, 368-371.

Schaar, D.G., Sieber, B.A., Sherwood, A.C., Dean, D., Mendoza, G., Ramakrishnan, L., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (1994). Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human. *Experimental Neurology*. 130, 387-393.

Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9, 383-391.

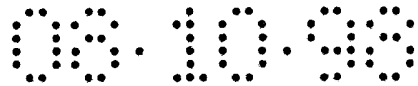
Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor *ret*. *Nature*. 367, 380-383.

Segarini, P.R., Ziman, J.M., Kane, C.J., and Dasch, J.R. (1992). Two novel patterns of transforming growth factor beta (TGF-beta) binding to cell surface proteins are dependent upon the binding of TGF-beta 1 and indicate a mechanism of positive cooperativity. *Journal Of Biological Chemistry*. 267, 1048-1053.

Springer, J.E., Mu, X., Bergmann, L.W., and Trojanowski, J.Q. (1994). Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Experimental Neurology*. 127, 167-170.

Stroemberg, I., Bjoerklund, L., Johansson, M., Tomac, A., Collins, F., Olson, L., Hoffer, B., and Humpel, C. (1993). Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons *in vivo*. *Experimental Neurology*. 124, 401-412.

Takahashi, M., Ritz, J. and Cooper, G. (1985). Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell*. 42, 581-588.



- Takahashi, M. and Cooper, G. (1987). Ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1378-1385.
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N. (1988). SRa promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8, 466-472.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J., and Olson, L. (1995a). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*. 373, 335-339.
- Tomac, A., Widenfalk, J., Lin, L.F., Kohno, T., Ebendal, T., Hoffer, B.J., and Olson, L. (1995b). Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 92, 8274-8278.
- Trupp, M., Ryden, M., Joernvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E., and Ibanez, C.F. (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *Journal Of Cell Biology*. 130, 137-148.
- Tsuzuki, T., Takahashi, M., Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M. and Asai, J. (1995). Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene*, 10, 191-198.
- Ullrich, A and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-211.
- van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. 10, 251-337.
- van Heyningen, V. (1994). One gene-four syndromes. *Nature*, 367, 319-320.

von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*. 14, 4683-4690.

Yan, Q., Matheson, C., and Lopez, O.T. (1995). In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*. 373, 341-344.

Zurn, A.D., Baetge, E.E., Hammang, J.P., Tan, S.A., and Aebischer, P. (1994). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*. 6, 113-118.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

- (i) Přihlašovatel: Fox, Gary M.
Jing, Shugian
Wen, Duanzhi
- (ii) Název vynálezu: Receptor pro neurotrofický faktor
odvozený od gliální buněčné linie
- (iii) Počet sekvencí: 34
- (iv) Adresa pro korespondenci:
 - (A) Adresa: AMGEN INC.
 - (B) Ulice: 1840 DeHavilland Drive
 - (C) Město: Thousand Oaks
 - (D) Země: CA
 - (E) Stát: USA
 - (F) ZIP: 91320-1789
- (v) Počítačová čtecí forma:
 - (A) Typ media: Floppy disk
 - (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
 - (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: PatentIn Release #1.0, verze #1.30
- (vi) Data současné přihlášky:
 - (A) Číslo přihlášky: US neznámé
 - (B) Datum podání: 14.5.1997
 - (C) Klasifikace:

- (vii) Data předchozí přihlášky:
 - (A) Číslo přihlášky: US 60/017221
 - (B) Datum podání: 9.5.1996

- (vii) Data předchozí přihlášky:
 - (A) Číslo přihlášky: US 60/015907
 - (B) Datum podání: 22.4.1996

- (viii) Zástupce/Agent - informace:
 - (A) Jméno: Curry, Daniel R.
 - (B) Registrační číslo: 32727
 - (C) Odkaz/číslo rejstříku: A-401A

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 1:
 - (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 2568 párů bazí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

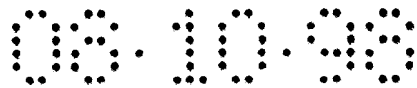
 - (ii) Typ molekuly: cDNA

 - (ix) Vlastnosti:
 - (A) Jméno/klíč: CDS
 - (B) Umístění: 540...1934



(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

| | |
|--|-----|
| AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCACTA ACATCCCTAA | 60 |
| CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG GCCCAACTCG GCCCTTCGAG | 120 |
| CTCTCGAAGA TTACCGCATC TATTTTTTTTTT TTCTTTTTTTT TCTTTTCCTA GCGCAGATAA | 180 |
| AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG | 240 |
| TAAATAAACA AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CGGTTGAGTC CAGGTTGGGT | 300 |
| CGGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCCGG AGCTGAGTCG | 360 |
| CCGGCGGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT TCACTGGATG GAGCTGAACT | 420 |
| TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA | 480 |
| GACCCAGCGG CGGCTCGGGA TTTTTTTGGG GGGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACC | 539 |
| ATG TTC CTG GCG ACC CTG TAC TTC GCG CTG CCG CTC TTG GAC TTG CTC | 587 |
| Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| CTG TCG GCC GAA GTG AGC GGC GGA GAC CGC CTG GAT TGC GTG AAA GCC | 635 |
| Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala | |
| 20 25 30 | |
| AGT GAT CAG TGC CTG AAG GAG CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CGC ACG | 683 |
| Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr | |
| 35 40 45 | |
| CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAG ACC AAC TTC AGC CTG GCA TCC | 731 |
| Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser | |
| 50 55 60 | |
| GGC CTG GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGC AGC GCC ATG GAG GCC CTG AAG | 779 |
| Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| CAG AAG TCG CTC TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG GGT ATG AAG AAG GAG | 827 |
| Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu | |
| 85 90 95 | |
| AAG AAC TGC CTG CGC ATT TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG GGA | 875 |
| Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| AAT GAT CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG | 923 |
| Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu | |
| 115 120 125 | |



| | |
|---|------|
| TCA GAT ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GAT GTT TTT CAG CAA Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln 130 135 140 | 971 |
| GTG GAG CAC ATT CCC AAA GGG AAC AAC TGC CTG GAT GCA GCG AAG GCC Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala 145 150 155 160 | 1019 |
| TGC AAC CTC GAC GAC ATT TGC AAG AAG TAC AGG TCG GCG TAC ATC ACC Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr 165 170 175 | 1067 |
| CCG TGC ACC ACC AGC GTG TCC AAC GAT GTC TGC AAC CGC CGC AAG TGC Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys 180 185 190 | 1115 |
| CAC AAG GCC CTC CGG CAG TTC TTT GAC AAG GTC CCG GCC AAG CAC AGC His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser 195 200 205 | 1163 |
| TAC GGA ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACA GAG CGG Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg 210 215 220 | 1211 |
| AGG CGA CAG ACC ATC GTG CCT GTG TGC TCC TAT GAA GAG AGG GAG AAG Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys 225 230 235 240 | 1259 |
| CCC AAC TGT TTG AAT TTG CAG GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys 245 250 255 | 1307 |
| AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg 260 265 270 | 1355 |
| TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala 275 280 285 | 1403 |
| TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser 290 295 300 | 1451 |
| AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn 305 310 315 320 | 1499 |
| GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr 325 330 335 | 1547 |
| TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr 340 345 350 | 1595 |



| | |
|---|------|
| GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC | 1643 |
| Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr | |
| 355 360 365 | |
| ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG | 1691 |
| Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu | |
| 370 375 380 | |
| AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA | 1739 |
| Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala | |
| 385 390 395 400 | |
| CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC | 1787 |
| Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser | |
| 405 410 415 | |
| AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC | 1835 |
| Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr | |
| 420 425 430 | |
| ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG | 1883 |
| Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu | |
| 435 440 445 | |
| GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA ACA | 1931 |
| Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr | |
| 450 455 460 | |
| TCA TAGCTGCATT AAAAAATAC AATATGGACA TGTA AAAAGA CAAAAACCAA | 1984 |
| Ser | |
| 465 | |
| GTTATCTGTT TCCTGTTCTC TTGTATAGCT GAAATTCCAG TTTAGGAGCT CAGTTGAGAA | 2044 |
| ACAGTTCCAT TCAACTGGAA CTTTTTTTTT TTNCCCTTTT AAGAAAGCTT CTTGTGATCC | 2104 |
| TTNGGGGCTT CTGTGAAAAA CCTGATGCAG TGCTCCATCC AAATCAGAA GGCTTTGGGA | 2164 |
| TATGCTGTAT TTTAAAGGGA CAGTTTGTA CTTGGGCTGT AAAGCAACT GGGGCTGTGT | 2224 |
| TTTCGATGAT GATGATNATC ATGATNATGA TNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN | 2284 |
| NNNNNNNNNN GATTTTAACA GTTTTACTTC TGGCCTTTCC TAGCTAGAGA AGGAGTTAAT | 2344 |
| ATTTCTAAGG TAACTCCCAT ATCTCCTTTA ATGACATTGA TTTCTAATGA TATAAATTC | 2404 |
| AGCCTACATT GATGCCAAGC TTTTTTGCCA CAAAGAAGAT TCTTACCAAG AGTGGGCTTT | 2464 |
| GTGGAAACAG CTGGTACTGA TGTTACCTT TATATATGTA CTAGCATTTT CCACGCTGAT | 2524 |
| GTTTATGTAC TGTAACAGT TCTGCACTCT TGTACAAAAG AAAA | 2568 |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 465 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
 20 25 30

Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
 35 40 45

Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
 50 55 60

Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 85 90 95

Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
 100 105 110

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125

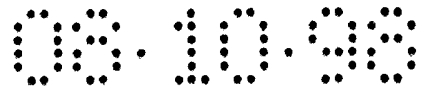
Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
 130 135 140

Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160

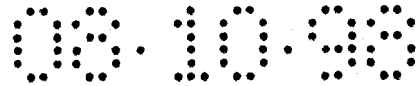
Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
 165 170 175

Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys
 180 185 190

His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser
 195 200 205



Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg
 210 215 220
 Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys
 225 230 235 240
 Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
 245 250 255
 Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
 260 265 270
 Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
 275 280 285
 Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser
 290 295 300
 Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
 305 310 315 320
 Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
 325 330 335
 Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
 340 345 350
 Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 355 360 365
 Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
 370 375 380
 Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser
 405 410 415
 Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr
 420 425 430
 Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu
 435 440 445
 Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr
 450 455 460
 Ser
 465



(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 2138 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 302...1705

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

```

AGCTCGCTCT CCCGGGGCAG TGGTGTGGAT GCACCGGAGT TCGGGCGCTG GGCAAGTTGG      60
GTCGGAAGCTG AACCCCTGAA AGCGGGTCCG CCTCCCGCCC TCGCGCCCGC CCGGATCTGA      120
GTCGCTGGCG GCGGTGGGCG GCAGAGCGAC GGGGAGTCTG CTCTCACCTT GGATGGAGCT      180
GAACTTTGAG TGGCCAGAGG AGCGCAGTCG CCCGGGGATC GCTGCACGCT GAGCTCTCTC      240
CCCAGACCG GGCGGCGGCT TTGGATTTTG GGGGGGCGGG GACCAGCTGC GCGGCGGCAC      300
C ATG TTC CTA GCC ACT CTG TAC TTC GCG CTG CCA CTC CTG GAT TTG      346
  Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu
    1           5           10           15
CTG ATG TCC GCC GAG GTG AGT GGT GGA GAC CGT CTG GAC TGT GTG AAA      394
Leu Met Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys
           20           25           30
GCC AGC GAT CAG TGC CTG AAG GAA CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CGC      442
Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg
    35           40           45

```



| | |
|---|------|
| ACA CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAA ACC AAC TTC AGC CTG ACA Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Thr 50 55 60 | 490 |
| TCC GGC CTT GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGT AGC GCC ATG GAG GCC TTG Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu 65 70 75 | 538 |
| AAG CAG AAG TCT CTG TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG GGC ATG AAG AAA Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys 80 85 90 95 | 586 |
| GAG AAG AAT TGT CTG CGT ATC TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln 100 105 110 | 634 |
| GGA AAT GAC CTC CTG GAA GAT TCC CCG TAT GAG CCG GTT AAC AGC AGG Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg 115 120 125 | 682 |
| TTG TCA GAT ATA TTC CGG GCA GTC CCG TTC ATA TCA GAT GTT TTC CAG Leu Ser Asp Ile Phe Arg Ala Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln 130 135 140 | 730 |
| CAA GTG GAA CAC ATT TCC AAA GGG AAC AAC TGC CTG GAC GCA GCC AAG Gln Val Glu His Ile Ser Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys 145 150 155 | 778 |
| GCC TGC AAC CTG GAC GAC ACC TGT AAG AAG TAC AGG TCG GCC TAC ATC Ala Cys Asn Leu Asp Asp Thr Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile 160 165 170 175 | 826 |
| ACC CCC TGC ACC ACC AGC ATG TCC AAC GAG GTC TGC AAC CGC CGT AAG Thr Pro Cys Thr Thr Ser Met Ser Asn Glu Val Cys Asn Arg Arg Lys 180 185 190 | 874 |
| TGC CAC AAG GCC CTC AGG CAG TTC TTC GAC AAG GTT CCG GCC AAG CAC Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His 195 200 205 | 922 |
| AGC TAC GGG ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACC GAG Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu 210 215 220 | 970 |
| CGG CGG CGA CAG ACT ATC GTC CCC GTG TGC TCC TAT GAA GAA CGA GAG Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu 225 230 235 | 1018 |
| AGG CCC AAC TGC CTG AGT CTG CAA GAC TCC TGC AAG ACC AAT TAC ATC Arg Pro Asn Cys Leu Ser Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile 240 245 250 255 | 1066 |
| TGC AGA TCT CGC CTT GCA GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser 260 265 270 | 1114 |



AGG TCT GTC AGC AAC TGT CTT AAG GAG AAC TAC GCA GAC TGC CTC CTG 1162
 Arg Ser Val Ser Asn Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu
 275 280 285

GCC TAC TCG GGA CTG ATT GGC ACA GTC ATG ACT CCC AAC TAC GTA GAC 1210
 Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp
 290 295 300

TCC AGC AGC CTC AGC GTG GCA CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGC GGC 1258
 Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly
 305 310 315

AAT GAC CTG GAA GAC TGC TTG AAA TTT CTG AAT TTT TTT AAG GAC AAT 1306
 Asn Asp Leu Glu Asp Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn
 320 325 330 335

ACT TGT CTC AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCA GAT GTG 1354
 Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val
 340 345 350

ACC ATG TGG CAG CCA GCC CCT CCA GTC CAG ACC ACC ACT GCC ACC ACT 1402
 Thr Met Trp Gln Pro Ala Pro Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 355 360 365

ACC ACT GCC TTC CGG GTC AAG AAC AAG CCT CTG GGG CCA GCA GGG TCT 1450
 Thr Thr Ala Phe Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser
 370 375 380

GAG AAT GAG ATC CCC ACA CAC GTT TTA CCA CCC TGT GCG AAT TTG CAG 1498
 Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln
 385 390 395

GCT CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGT AGC ACA CAC CTC TGT CTT 1546
 Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Ser Thr His Leu Cys Leu
 400 405 410 415

TCT GAT AGT GAT TTC GGA AAG GAT GGT CTC GCT GGT GCC TCC AGC CAC 1594
 Ser Asp Ser Asp Phe Gly Lys Asp Gly Leu Ala Gly Ala Ser Ser His
 420 425 430

ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCC AGC TGC AGT CTG AGC TCA 1642
 Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Ser Leu Ser Ser
 435 440 445

CTG CCG GTG CTG ATG CTC ACC GCC CTT GCT GCC CTG TTA TCT GTA TCG 1690
 Leu Pro Val Leu Met Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu Leu Ser Val Ser
 450 455 460

TTG GCA GAA ACG TCG TAGCTGCATC CGGGAAAACA GTATGAAAAG ACAAAGAGA 1745
 Leu Ala Glu Thr Ser
 465

ACCAAGTATT CTGTCCCTGT CCTCTTGAT ATCTGAAAAT CCAGTTTAA AAGCTCCGTT 1805

GAGAAGCAGT TTCACCCAAC TGGA ACTCTT TCCTTGTTTT TAAGAAAGCT TGTGGCCCTC 1865

AGGGGCTTCT GTTGAAGAAC TGCTACAGGG CTAATTCCAA ACCCATAAGG CTCTGGGGCG 1925

TGGTGCGGCT TAAGGGGACC ATTTGCACCA TGTAAGCAA GCTGGGCTTA TCATGTGTTT 1985

GATGGTGAGG ATGGTAGTGG TGATGATGAT GGTAATTTTA ACAGCTTGAA CCCTGTTCTC 2045

TCTACTGGTT AGGAACAGGA GATACTATTG ATAAAGATTC TTCCATGTCT TACTCAGCAG 2105

CATTGCCTTC TGAAGACAGG CCCGCAGCCG TCG 2138



(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 468 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Met Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
 20 25 30

Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
 35 40 45

Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Thr Ser
 50 55 60

Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80

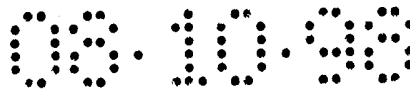
Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 85 90 95

Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
 100 105 110

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125

Ser Asp Ile Phe Arg Ala Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
 130 135 140

Val Glu His Ile Ser Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160



Cys Asn Leu Asp Asp Thr Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
165 170 175

Pro Cys Thr Thr Ser Met Ser Asn Glu Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys
180 185 190

His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser
195 200 205

Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg
210 215 220

Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Arg
225 230 235 240

Pro Asn Cys Leu Ser Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
245 250 255

Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
260 265 270

Ser Val Ser Asn Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
275 280 285

Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser
290 295 300

Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
305 310 315 320

Asp Leu Glu Asp Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
325 330 335

Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
340 345 350

Met Trp Gln Pro Ala Pro Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
355 360 365

Thr Ala Phe Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
370 375 380

Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
385 390 395 400

Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Ser Thr His Leu Cys Leu Ser
405 410 415

Asp Ser Asp Phe Gly Lys Asp Gly Leu Ala Gly Ala Ser Ser His Ile
420 425 430

Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Ser Leu Ser Ser Leu
435 440 445

Pro Val Leu Met Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu Leu Ser Val Ser Leu
450 455 460

Ala Glu Thr Ser
465

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 3209 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

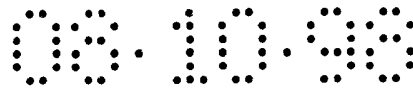
- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..539
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 539 je -237 až 301 GDNFR podle obrázku 5"

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 540...1937

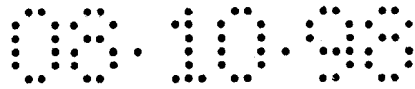
(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```
AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCACTA ACATCCCTAA      60
CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG GCCCAACTCG GCCCTTCGAG      120
CTCTCGAAGA TTACCGCATC TATTTTTTTT TTCTTTTTTT TCTTTTCCTA GCGCAGATAA      180
```



AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG 240
 TAAATAAACA AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CGGTTGAGTC CAGGTTGGGT 300
 CGGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCCGG AGCTGAGTCG 360
 CCGGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT TCACTGGATG GAGCTGAACT 420
 TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA 480
 GACCCAGCGG CGGCTCGGGA TTTTTTTGGG GGGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACC 539
 ATG TTC CTG GCG ACC CTG TAC TTC GCG CTG CCG CTC TTG GAC TTG CTC 587
 Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15
 CTG TCG GCC GAA GTG AGC GGC GGA GAC CGC CTG GAT TGC GTG AAA GCC 635
 Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
 20 25 30
 AGT GAT CAG TGC CTG AAG GAG CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CGC ACG 683
 Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
 35 40 45
 CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAG ACC AAC TTC AGC CTG GCA TCC 731
 Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
 50 55 60
 GGC CTG GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGC AGC GCC ATG GAG GCC CTG AAG 779
 Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80
 CAG AAG TCG CTC TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG GGT ATG AAG AAG GAG 827
 Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 85 90 95
 AAG AAC TGC CTG CGC ATT TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG GGA 875
 Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
 100 105 110
 AAT GAT CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG 923
 Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125
 TCA GAT ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GAT GTT TTT CAG CAA 971
 Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
 130 135 140
 GTG GAG CAC ATT CCC AAA GGG AAC AAC TGC CTG GAT GCA GCG AAG GCC 1019
 Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160
 TGC AAC CTC GAC GAC ATT TGC AAG AAG TAC AGG TCG GCG TAC ATC ACC 1067
 Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
 165 170 175

| | |
|---|------|
| CCG TGC ACC ACC AGC GTG TCC AAN GAT GTC TGC AAC CGC CGC AAG TGC | 1115 |
| Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Xaa Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys | |
| 180 185 190 | |
| CAC AAG GCC CTC CGG CAG TTC TTT GAC AAG GTC CCG GCC AAG CAC AGC | 1163 |
| His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser | |
| 195 200 205 | |
| TAC GGA ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACA GAG CGG | 1211 |
| Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg | |
| 210 215 220 | |
| AGG CGA CAG ACC ATC GTG CCT GTG TGC TCC TAT GAA GAG AGG GAG AAG | 1259 |
| Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys | |
| 225 230 235 240 | |
| CCC AAC TGT TTG AAT TTG CAG GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC | 1307 |
| Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys | |
| 245 250 255 | |
| AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG | 1355 |
| Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg | |
| 260 265 270 | |
| TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC | 1403 |
| Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala | |
| 275 280 285 | |
| TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC | 1451 |
| Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser | |
| 290 295 300 | |
| AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC | 1499 |
| Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn | |
| 305 310 315 320 | |
| GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA | 1547 |
| Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr | |
| 325 330 335 | |
| TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC | 1595 |
| Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr | |
| 340 345 350 | |
| GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC | 1643 |
| Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr | |
| 355 360 365 | |
| ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG | 1691 |
| Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu | |
| 370 375 380 | |
| AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA | 1739 |
| Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala | |
| 385 390 395 400 | |



| | |
|---|------|
| CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser 405 410 415 | 1787 |
| AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr 420 425 430 | 1835 |
| ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu 435 440 445 | 1883 |
| GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA ACA Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr 450 455 460 | 1931 |
| TCA TAG CTGCATTAAA AAAATACAAT ATGGACATGT AAAAAGACAA AAACCAAGTT Ser * 465 | 1987 |
| ATCTGTTTCC TGTTCTCTTG TATAGCTGAA ATTCCAGTTT AGGAGCTCAG TTGAGAAACA | 2047 |
| GTTCCATTCA ACTGGAACAT TTTTTTTTTT NCCTTTTAAG AAAGCTTCTT GTGATCCTTC | 2107 |
| GGGGCTTCTG TGAAAAACCT GATGCAGTGC TCCATCCAAA CTCAGAAGGC TTTGGGATAT | 2167 |
| GCTGTATTTT AAAGGGACAG TTTGTAACCT GGGCTGTAAA GCAAACCTGGG GCTGTGTTTT | 2227 |
| CGATGATGAT GATCATCATG ATCATGATNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN | 2287 |
| NNNNNNNGAT TTTAACAGTT TTACTTCTGG CCTTTCCTAG CTAGAGAAGG AGTTAATATT | 2347 |
| TCTAAGGTAA CTCCCATATC TCCTTTAATG ACATTGATTT CTAATGATAT AAATTCAGC | 2407 |
| CTACATTGAT GCCAAGCTTT TTTGCCACAA AGAAGATTCT TACCAAGAGT GGGCTTTGTG | 2467 |
| GAAACAGCTG GTACTGATGT TCACCTTTAT ATATGTACTA GCATTTTCCA CGCTGATGTT | 2527 |
| TATGTACTGT AACAGTTCT GCACTCTTGT ACAAAGAAA AAACACCTGT CACATCCAAA | 2587 |
| TATAGTATCT GTCTTTTCGT CAAAATAGAG AGTGGGGAAT GAGTGTGCCG ATTCAATACC | 2647 |
| TCAATCCCTG AACGACACTC TCCTAATCCT AAGCCTTACC TGAGTGAGAA GCCCTTTACC | 2707 |
| TAACAAAAGT CCAATATAGC TGAAATGTCG CTCTAATACT CTTTACACAT ATGAGGTTAT | 2767 |
| ATGTAGAAAA AAATTTTACT ACTAAATGAT TTCAACTATT GGCTTTCTAT ATTTTGAAAG | 2827 |
| TAATGATATT GTCTCATTTT TTTACTGATG GTTTAATACA AAATACACAG AGCTTGTTTC | 2887 |
| CCCTCATAAG TAGTGTTTCG TCTGATATGA ACTTCACAAA TACAGCTCAT CAAAAGCAGA | 2947 |
| CTCTGAGAAG CCTCGTGCTG TAGCAGAAAG TTCTGCATCA TGTGACTGTG GACAGGCAGG | 3007 |
| AGGAAACAGA ACAGACAAGC ATTGTCTTTT GTCATTGCTC GAAGTGCAAG CGTGCATACC | 3067 |



TGTGGAGGGA ACTGGTGGCT GCTTGTAAT GTTCTGCAGC ATCTCTTGAC ACACTTGTC 3127
 TGACACAATC CAGTACCTTG GTTTTCAGGT TATCTGACAA AGGCAGCTTT GATTGGGACA 3187
 TGGAGGCATG GGCAGGCCCG AA 3209

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

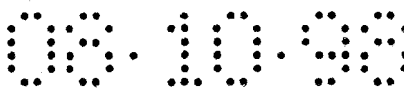
(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 466 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
 20 25 30
 Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
 35 40 45
 Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
 50 55 60
 Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80
 Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 85 90 95
 Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
 100 105 110
 Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125
 Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
 130 135 140



Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160

Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
 165 170 175

Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Xaa Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys
 180 185 190

His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser
 195 200 205

Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg
 210 215 220

Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys
 225 230 235 240

Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
 245 250 255

Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
 260 265 270

Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
 275 280 285

Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser
 290 295 300

Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
 305 310 315 320

Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
 325 330 335

Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
 340 345 350

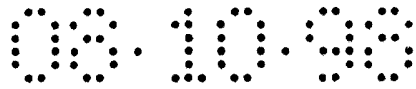
Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 355 360 365

Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
 370 375 380

Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
 385 390 395 400

Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser
 405 410 415

Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr
 420 425 430



Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu
 435 440 445

Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr
 450 455 460

Ser *
 465

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 508 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..508
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 508 je -237 až 272 Hsgr-21af podle obrázku 5"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

| | |
|--|-----|
| TCTGGCCTCG GAACACGCCA TTCTCCGCGC CGCTTCCAAT AACCACTAAC ATCCCTAACG | 60 |
| AGCATCCGAG CCGAGGGCTC TGCTCGGAAA TCGTCCTGGC CCAACTCGGC CCTTCGAGCT | 120 |
| CTCGAAGATT ACCGCATCTA TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT TTTTCCTAGC GCAGATAAAG | 180 |
| TGAGCCCGGA AAGGGAAGGA GGGGGCGGGG ACACCATTGC CCTGAAAGAA TAAATAAGTA | 240 |
| AATAAACAAA CTGGCTCCTC GCCGCAGCTG GACGCGGTCTG GTTGAGTCCA GGTGGGTCTG | 300 |
| GACCTGAACC CCTAAAAGCG GAACCGCCTC CCGCCCTCGC CATCCCGGAG CTGAGTCGCC | 360 |
| GGCGGCGGTG GCTGCTGCCA GACCCGGAGT TTCCTCTTTC ACTGGATGGA GCTGAACTTT | 420 |
| GGGCGGCCAG AGCAGCACAG CTGTCCGGGG ATCGCTGCAC GCTGAGCTCC CTCGGCAAGA | 480 |
| CCCAGCGGCG GCTCGGGATT TTTTGGG | 508 |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 510 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..510
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 510 je -237 až 272 Hsgr-21bf podle obrázku 5"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

```

AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCACTA ACATCCCTAA      60
CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG GCCCAACTCG GCCCTTCGAG      120
CTCTCGAAGA TTACCGCATC TATTTTTTTTT TTCTTTTTTTT TCTTTTCCTA GCGCAGATAA      180
AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG      240
TAAATAAACA AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CGGTTGAGTC CAGGTTGGGT      300

```

```
CGGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCCGG AGCTGAGTCG      360
CCGGCGGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTCCTCTT TCACTGGATG GAGCTGAACT      420
TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA      480
GACCCAGCGG CGGCTCGGGA TTTTTTGGG                                          510
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 1927 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 538...1926

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..537
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 537 je -235 až 301 21acon podle obrázku 5"



(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

| | |
|---|-----|
| TCTGGCCTCG GAACACGCCA TTCTCCGCGC CGCTTCCAAT AACCACTAAC ATCCCTAACG | 60 |
| AGCATCCGAG CCGAGGGCTC TGCTCGGAAA TCGTCCTGGC CCAACTCGGC CCTTCGAGCT | 120 |
| CTCGAAGATT ACCGCATCTA TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT TTTTCTAGC GCAGATAAAG | 180 |
| TGAGCCCAGG AAGGGAAGGA GGGGGCGGGG ACACCATTGC CCTGAAAGAA TAAATAAGTA | 240 |
| AATAAACAAA CTGGCTCCTC GCCGCAGCTG GACGCGGTGC GTTGAGTCCA GGTGGGTGC | 300 |
| GACCTGAACC CCTAAAAGCG GAACCGCCTC CCGCCCTCGC CATCCCGGAG CTGAGTCGCC | 360 |
| GGCGGCGGTG GCTGCTGCCA GACCCGGAGT TTCCTCTTTC ACTGGATGGA GCTGAACTTT | 420 |
| GGCGGCCAG AGCAGCACAG CTGTCCGGGG ATCGCTGCAC GCTGAGCTCC CTCGGCAAGA | 480 |
| CCCAGCGGCG GCTCGGGATT TTTTTGGGGG GCGGGGACC AGCCCCGCGC CGGCACC | 537 |
| | |
| ATG TTC CTG GCG NCC CTG TAC TTC GCG CTG CCG CTC TTG GAC TTG CTC | 585 |
| Met Phe Leu Ala Xaa Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| | |
| CTG TCG GCC GAA GTG AGC GGC GGA GAC CGC CTG GAT TGC GTG AAA GCC | 633 |
| Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala | |
| 20 25 30 | |
| | |
| AGT GAT CAG TGC CTG AAG GAG CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CGC ACG | 681 |
| Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr | |
| 35 40 45 | |
| | |
| CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAG ACC AAC TTC AGC CTG GCA TCC | 729 |
| Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser | |
| 50 55 60 | |
| | |
| GGC CTG GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGC AGC GCC ATG GAG GCC CTG AAG | 777 |
| Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| | |
| CAG AAG TCG CTC TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG GGT ATG AAG AAG GAG | 825 |
| Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu | |
| 85 90 95 | |
| | |
| AAG AAC TGC CTG CGC ATT TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG GGA | 873 |
| Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| | |
| AAT GAT CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG | 921 |
| Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu | |
| 115 120 125 | |
| | |
| TCA GAT ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GAT GTT TTT CAG CAA | 969 |
| Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln | |
| 130 135 140 | |

| | |
|---|------|
| ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu 370 375 380 | 1689 |
| AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala 385 390 395 400 | 1737 |
| CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser 405 410 415 | 1785 |
| AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr 420 425 430 | 1833 |
| ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu 435 440 445 | 1881 |
| GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu 450 455 460 | 1926 |
| A | 1927 |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 463 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

Met Phe Leu Ala Xaa Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
 20 25 30

Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
 35 40 45

Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
 50 55 60

Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 85 90 95

Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
 100 105 110

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125

Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
 130 135 140

Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160

Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
 165 170 175

Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys
 180 185 190

His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser
 195 200 205



Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg
 210 215 220

Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys
 225 230 235 240

Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
 245 250 255

Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
 260 265 270

Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
 275 280 285

Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser
 290 295 300

Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
 305 310 315 320

Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
 325 330 335

Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
 340 345 350

Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 355 360 365

Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
 370 375 380

Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
 385 390 395 400

Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser
 405 410 415

Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr
 420 425 430

Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu
 435 440 445

Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu
 450 455 460



(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 1929 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 540...1928

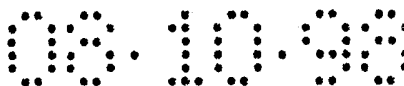
(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..539
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 539 je -237 až 301 21bcon podle obrázku 5"

```

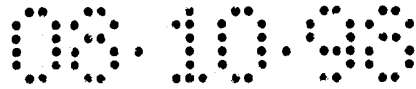
AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCACTA ACATCCCTAA      60
CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG GCCCAACTCG GCCCTTCGAG      120
CTCTCGAAGA TTACCGCATC TATTTTTTTT TTCTTTTTTT TCTTTCCTA GCGCAGATAA      180
AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG      240
TAAATAAACA AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CGGTTGAGTC CAGGTTGGGT      300
CGGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCCGG AGCTGAGTCG      360
CCGGCGGGCG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT TCACTGGATG GAGCTGAACT      420
TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA      480
GACCCAGCGG CGGCTCGGGA TTTTTTTGGG GGGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACC      539

```

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

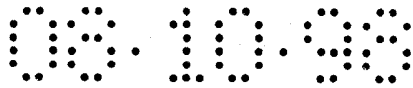
| | |
|---|------|
| ATG TTC CTG GCG ACC CTG TAC TTC GCG CTG CCG CTC TTG GAC TTG CTC | 587 |
| Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| CTG TCG GCC GAA GTG AGC GGC GGA GAC CGC CTG GAT TGC GTG AAA GCC | 635 |
| Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala | |
| 20 25 30 | |
| AGT GAT CAG TGC CTG AAG GAG CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CGC ACG | 683 |
| Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr | |
| 35 40 45 | |
| CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAG ACC AAC TTC AGC CTG GCA TCC | 731 |
| Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser | |
| 50 55 60 | |
| GGC CTG GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGC AGC GCC ATG GAG GCC CTG AAG | 779 |
| Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| CAG AAG TCG CTC TAC AAC TGC CGC TGC AAG CCG GGT ATG AAG AAG GAG | 827 |
| Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu | |
| 85 90 95 | |
| AAG AAC TGC CTG CGC ATT TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG GGA | 875 |
| Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| AAT GAT CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG | 923 |
| Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu | |
| 115 120 125 | |
| TCA GAT ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GAT GTT TTT CAG CAA | 971 |
| Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln | |
| 130 135 140 | |
| GTG GAG CAC ATT CCC AAA GGG AAC AAC TGC CTG GAT GCA GCG AAG GCC | 1019 |
| Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala | |
| 145 150 155 160 | |
| TGC AAC CTC GAC GAC ATT TGC AAG AAG TAC AGG TCG GCG TAC ATC ACC | 1067 |
| Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr | |
| 165 170 175 | |
| CCG TGC ACC ACC AGC GTG TCC AAC GAT GTC TGC AAC CGC CGC AAG TGC | 1115 |
| Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys | |
| 180 185 190 | |
| CAC AAG GCC CTC CGG CAG TTC TTT GAC AAG GTC CCG GCC AAG CAC AGC | 1163 |
| His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser | |
| 195 200 205 | |
| TAC GGA ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACA GAG CGG | 1211 |
| Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg | |
| 210 215 220 | |



| | |
|---|------|
| AGG CGA CAG ACC ATC GTG CCT GTG TGC TCC TAT GAA GAG AGG GAG AAG Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys 225 230 235 240 | 1259 |
| CCC AAC TGT TTG AAT TTG CAG GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys 245 250 255 | 1307 |
| AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg 260 265 270 | 1355 |
| TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala 275 280 285 | 1403 |
| TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser 290 295 300 | 1451 |
| AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn 305 310 315 320 | 1499 |
| GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr 325 330 335 | 1547 |
| TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr 340 345 350 | 1595 |
| GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr 355 360 365 | 1643 |
| ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu 370 375 380 | 1691 |
| AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala 385 390 395 400 | 1739 |
| CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser 405 410 415 | 1787 |
| AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr 420 425 430 | 1835 |
| ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu 435 440 445 | 1883 |
| GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu 450 455 460 | 1928 |
| | 1929 |

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 463 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina



Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys
 225 230 235 240
 Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
 245 250 255
 Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
 260 265 270
 Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
 275 280 285
 Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser
 290 295 300
 Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
 305 310 315 320
 Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
 325 330 335
 Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
 340 345 350
 Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 355 360 365
 Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
 370 375 380
 Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser
 405 410 415
 Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr
 420 425 430
 Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu
 435 440 445
 Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu
 450 455 460



(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 699 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

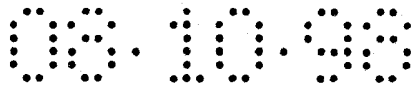
- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..699
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 699 je 814 až 1512 Hsgr-29a podle obrázku 5"

(ix) Vlastnosti:

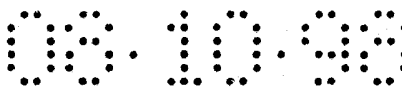
- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 2...697

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

G TCG GCG TAC ATC ACC CCG TGC ACC ACC AGC GTG TCC AAT GAT GTC
 Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val
 1 5 10 15



| | |
|--|-----|
| TGC AAC CGC CGC AAG TGC CAC AAG GCC CTC CGG CAG TTC TTT GAC AAG Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys | 94 |
| 20 25 30 | |
| GTC CCG GCC AAG CAC AGC TAC GGA ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp | 142 |
| 35 40 45 | |
| ATC GCC TGC ACA GAG CGG AGG CGA CAG ACC ATC GTG CCT GTG TGC TCC Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser | 190 |
| 50 55 60 | |
| TAT GAA GAG AGG GAG AAG CCC AAC TGT TTG AAT TTG CAG GAC TCC TGC Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys | 238 |
| 65 70 75 | |
| AAG ACG AAT TAC ATC TGC AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn | 286 |
| 80 85 90 95 | |
| TGC CAG CCA GAG TCA AGG TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr | 334 |
| 100 105 110 | |
| GCT GAC TGC CTC CTC GCC TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr | 382 |
| 115 120 125 | |
| CCC AAC TAC ATA GAC TCC AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp | 430 |
| 130 135 140 | |
| TGC AGC AAC AGT GGG AAC GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn | 478 |
| 145 150 155 | |
| TTC TTC AAG GAC AAT ACA TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly | 526 |
| 160 165 170 175 | |
| AAT GGC TCC GAT GTG ACC GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr | 574 |
| 180 185 190 | |
| ACC ACT GCC GCT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu | 622 |
| 195 200 205 | |
| GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro | 670 |
| 210 215 220 | |
| TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG AA Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu | 699 |
| 225 230 | |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 232 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys
 1 5 10 15

Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val
 20 25 30

Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile
 35 40 45

Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr
 50 55 60

Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys
 65 70 75 80

Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys
 85 90 95

Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala
 100 105 110

Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro
 115 120 125

Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys
 130 135 140

Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe
 145 150 155 160

Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn
 165 170 175



Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr
 180 185 190
 Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly
 195 200 205
 Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys
 210 215 220
 Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu
 225 230

(2) Informace pro SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 2157 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

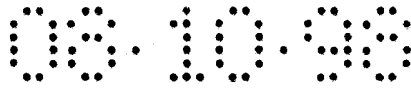
(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 2...886

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..2157
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 2157 je 814 až 2971 29brc podle obrázku 5"



| | |
|---|------|
| CCC AAC TAC ATA GAC TCC AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC | 430 |
| Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp | |
| 130 135 140 | |
| TGC AGC AAC AGT GGG AAC GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT | 478 |
| Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn | |
| 145 150 155 | |
| TTC TTC AAG GAC AAT ACA TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC | 526 |
| Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly | |
| 160 165 170 175 | |
| AAT GGC TCC GAT GTG ACC GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC | 574 |
| Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr | |
| 180 185 190 | |
| ACC ACT GCC GCT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG | 622 |
| Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu | |
| 195 200 205 | |
| GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG | 670 |
| Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro | |
| 210 215 220 | |
| TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT | 718 |
| Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn | |
| 225 230 235 | |
| ACA CAC CTC TGT ATT TCC AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT | 766 |
| Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly | |
| 240 245 250 255 | |
| GCT TCC AGC CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT | 814 |
| Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys | |
| 260 265 270 | |
| GGT CTG AGC CCA CTG CTG GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA | 862 |
| Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu | |
| 275 280 285 | |
| TTA TCT TTA ACA GAA ACA TCA TAG CTGCATTAAA AAAATACAAT ATGGACATGT | 916 |
| Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser * | |
| 290 295 | |
| AAAAAGACAA AAACCAAGTT ATCTGTTTCC TGTCTCTTG TATAGCTGAA ATTCCAGTTT | 976 |
| AGGAGCTCAG TTGAGAAACA GTTCATTCA ACTGGAACAT TTTTTTTTTT CCTTTAAGA | 1036 |
| AAGCTTCTTG TGATCCTTCG GGGCTTCTGT GAAAAACCTG ATGCAGTGCT CCATCCAAC | 1096 |
| TCAGAAGGCT TTGGGATATG CTGTATTTTA AAGGGACAGT TTGTAAGTTG GGCTGTAAAG | 1156 |
| CAAAGTGGGG CTGTGTTTTT C GATGATGATG ATCATCATGA TCATGATNNN NNNNNNNNNN | 1216 |
| NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNGATT TTAACAGTTT TACTTCTGGC CTTTCCTAGC | 1276 |



| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| TAGAGAAGGA | GTTAATATTT | CTAAGGTAAC | TCCCATATCT | CCTTTAATGA | CATTGATTC | 1336 |
| TAATGATATA | AATTTTCAGCC | TACATTGATG | CCAAGCTTTT | TTGCCACAAA | GAAGATTCTT | 1396 |
| ACCAAGAGTG | GGCTTTGTGG | AAACAGCTGG | TACTGATGTT | CACCTTTATA | TATGTACTAG | 1456 |
| CATTTTCCAC | GCTGATGTTT | ATGTACTGTA | AACAGTTCTG | CACTCTTGTA | CAAAGAAAA | 1516 |
| AACACCTGTC | ACATCCAAAT | ATAGTATCTG | TCTTTTCGTC | AAAATAGAGA | GTGGGGAATG | 1576 |
| AGTGTGCCGA | TTCAATACCT | CAATCCCTGA | ACGACACTCT | CCTAATCCTA | AGCCTTACCT | 1636 |
| GAGTGAGAAG | CCCTTTACCT | AACAAAAGTC | CAATATAGCT | GAAATGTCGC | TCTAATACTC | 1696 |
| TTTACACATA | TGAGGTTATA | TGTAGAAAAA | AATTTTACTA | CTAAATGATT | TCAACTATTG | 1756 |
| GCTTTCTATA | TTTTGAAAGT | AATGATATTG | TCTCATTTTT | TTACTGATGG | TTAATACAA | 1816 |
| AATACACAGA | GCTTGTTTCC | CCTCATAAGT | AGTGTTGCTG | CTGATATGAA | CTTCACAAAT | 1876 |
| ACAGCTCATC | AAAAGCAGAC | TCTGAGAAGC | CTCGTGCTGT | AGCAGAAAGT | TCTGCATCAT | 1936 |
| GTGACTGTGG | ACAGGCAGGA | GGAAACAGAA | CAGACAAGCA | TTGTCTTTTG | TCATTGCTCG | 1996 |
| AAGTGCAAGC | GTGCATACCT | GTGGAGGGAA | CTGGTGGCTG | CTTGTAATG | TTCTGCAGCA | 2056 |
| TCTCTTGACA | CACTTGTCAT | GACACAATCC | AGTACCTTGG | TTTTCAGGTT | ATCTGACAAA | 2116 |
| GGCAGCTTTG | ATTGGGACAT | GGAGGCATGG | GCAGGCCGGA | A | | 2157 |

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristika sekvence:

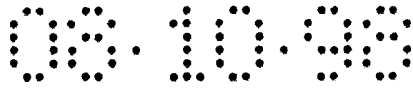
(A) Délka: 295 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:



Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys
 1 5 10 15
 Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val
 20 25 30
 Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile
 35 40 45
 Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr
 50 55 60
 Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys
 65 70 75 80
 Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys
 85 90 95
 Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala
 100 105 110
 Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro
 115 120 125
 Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys
 130 135 140
 Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe
 145 150 155 160
 Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn
 165 170 175
 Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr
 180 185 190
 Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly
 195 200 205
 Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys
 210 215 220
 Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr
 225 230 235 240
 His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala
 245 250 255
 Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly
 260 265 270
 Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu
 275 280 285
 Ser Leu Thr Glu Thr Ser *
 290 295

(2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 659 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

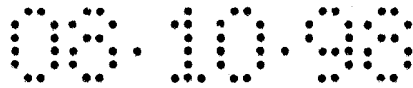
- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 2...658

(ix) Vlastnosti:

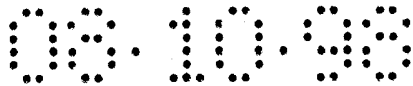
- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..659
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 659 je 1033 až 1691 Hsgr-29ar podle obrázku 5"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

| | |
|---|-----|
| G AAT TTG CAG GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC AGA TCT CGC | 46 |
| Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg | |
| 1 5 10 15 | |
| CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG TCT GTC AGC | 94 |
| Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser | |
| 20 25 30 | |
| AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC TAC TCG GGG | 142 |
| Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly | |
| 35 40 45 | |
| CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC AGT AGC CTC | 190 |
| Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu | |
| 50 55 60 | |



| | |
|---|-----|
| AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC GAC CTA GAA | 238 |
| Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu | |
| 65 70 75 | |
| GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA TGT CTT AAA | 286 |
| Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys | |
| 80 85 90 95 | |
| AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC GTG TGG CAG | 334 |
| Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln | |
| 100 105 110 | |
| CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC ACT GCC CTC | 382 |
| Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu | |
| 115 120 125 | |
| CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT | 430 |
| Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile | |
| 130 135 140 | |
| CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG | 478 |
| Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu | |
| 145 150 155 | |
| AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC AAT GGT AAT | 526 |
| Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn | |
| 160 165 170 175 | |
| TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC ACA AAA TCA | 574 |
| Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser | |
| 180 185 190 | |
| ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG GTC CTG GTG | 622 |
| Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val | |
| 195 200 205 | |
| GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA A | 659 |
| Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu | |
| 210 215 | |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 219 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu
 35 40 45
 Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser
 50 55 60
 Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu
 65 70 75 80
 Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn
 85 90 95
 Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro
 100 105 110
 Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg
 115 120 125
 Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro
 130 135 140
 Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr
 165 170 175



Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met
 180 185 190

Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val
 195 200 205

Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu
 210 215

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 630 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

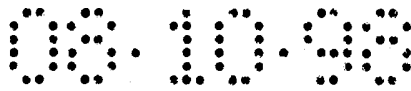
- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 3...629

(ix) Vlastnosti:

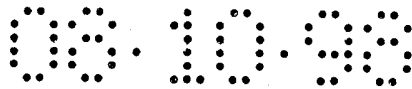
- (A) Jméno/klíč: misc_vlastnost
- (B) Umístění: 1..630
- (D) Jiné informace: (poznámka= "1 až 630 je 1062 až 1691 Hsgr-29br podle obrázku 5"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

| | |
|---|-----|
| AC ATC TGC AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA | 47 |
| Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro | |
| 1 5 10 15 | |
| GAG TCA AGG TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC | 95 |
| Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys | |
| 20 25 30 | |
| CTC CTC GCC TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC | 143 |
| Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr | |
| 35 40 45 | |



| | |
|---|-----|
| ATA GAC TCC AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC | 191 |
| Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn | |
| 50 55 60 | |
| AGT GGG AAC GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG | 239 |
| Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys | |
| 65 70 75 | |
| GAC AAT ACA TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC | 287 |
| Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser | |
| 80 85 90 95 | |
| GAT GTG ACC GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC | 335 |
| Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala | |
| 100 105 110 | |
| ACT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA | 383 |
| Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala | |
| 115 120 125 | |
| GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT | 431 |
| Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn | |
| 130 135 140 | |
| TTA CAG GCA CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC | 479 |
| Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu | |
| 145 150 155 | |
| TGT ATT TCC AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC | 527 |
| Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser | |
| 160 165 170 175 | |
| CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC | 575 |
| His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser | |
| 180 185 190 | |
| CCA CTG CTG GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA | 623 |
| Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu | |
| 195 200 205 | |
| ACA GAA A | 630 |
| Thr Glu | |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 209 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

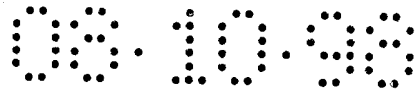
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

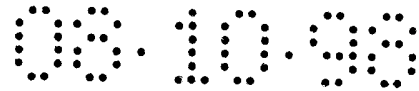
(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20:

Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu
 20 25 30
 Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile
 35 40 45
 Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser
 50 55 60
 Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp
 85 90 95
 Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr
 100 105 110
 Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly
 115 120 125
 Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu
 130 135 140
 Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys
 145 150 155 160
 Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His
 165 170 175
 Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro
 180 185 190
 Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr
 195 200 205

Glu



| | |
|---|------|
| ACT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA | 190 |
| Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala | |
| 50 55 60 | |
| GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT | 238 |
| Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn | |
| 65 70 75 | |
| TTA CAG GCA CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC | 286 |
| Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu | |
| 80 85 90 95 | |
| TGT ATT TCC AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC | 334 |
| Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser | |
| 100 105 110 | |
| CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC | 382 |
| His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser | |
| 115 120 125 | |
| CCA CTG CTG GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA | 430 |
| Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu | |
| 130 135 140 | |
| ACA GAA ACA TCA TAG CTGCATTAAA AAAATACAAT ATGGACATGT AAAAAGACAA | 485 |
| Thr Glu Thr Ser * | |
| 145 | |
| AAACCAAGTT ATCTGTTTCC TGTTCTCTTG TATAGCTGAA ATTCCAGTTT AGGAGCTCAG | 545 |
| TTGAGAAACA GTTCCATTCA ACTGGAACAT TTTTTTTTTT CCTTTTAAGA AAGCTTCTTG | 605 |
| TGATCCTTCG GGGCTTCTGT GAAAAACCTG ATGCAGTGCT CCATCCAAAC TCAGAAGGCT | 665 |
| TTGGGATATG CTGTATTTTA AAGGGACAGT TTGTAAGTTG GGCTGTAAAG CAAACTGGGG | 725 |
| CTGTGTTTTT C GATGATGATG ATCATCATGA TCATGATNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN | 785 |
| NNNNNNNNNN NNNNNNGATT TTAACAGTTT TACTTCTGGC CTTTCCTAGC TAGAGAAGGA | 845 |
| GTTAATATTT CTAAGGTAAC TCCCATATCT CCTTTAATGA CATTGATTTT TAATGATATA | 905 |
| AATTCAGCC TACATTGATG CCAAGCTTTT TTGCCACAAA GAAGATTCTT ACCAAGAGTG | 965 |
| GGCTTTGTGG AAACAGCTGG TACTGATGTT CACCTTTATA TATGTACTAG CATTTTCCAC | 1025 |
| GCTGATGTTT ATGTAAGTGA AACAGTTCTG CACTCTTGTA CAAAAGAAAA | 1075 |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 148 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp
 1 5 10 15
 Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp
 20 25 30
 Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr
 35 40 45
 Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly
 50 55 60
 Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys
 85 90 95
 Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His
 100 105 110
 Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro
 115 120 125
 Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr
 130 135 140
 Glu Thr Ser *
 145



| | |
|--|------|
| TGAAAAACCT GATGCAGTGC TCCATCCAAA CTCAGAAGGC TTTGGGATAT GCTGTATTTT | 668 |
| AAAGGGACAG TTTGTAACCT GGGCTGTAAA GCAAACCTGGG GCTGTGTTTT CGATGATGAT | 728 |
| GATGATCATG ATGATGATCA TCATGATCAT GATGATGATC ATCATGATCA TGATGATGAT | 788 |
| TTTAACAGTT TTAACCTCTGG CCTTTCCTAG CTAGAGAAGG AGTTAATATT TCTAAGGTAA | 848 |
| CTCCCATATC TCCTTTAATG ACATTGATTT CTAATGATAT AAATTCAGC CTACATTGAT | 908 |
| GCCAAGCTTT TTTGCCACAA AGAAGATTCT TACCAAGAGT GGGCTTTGTG GAAACAGCTG | 968 |
| GTACTGATGT TCACCTTTAT ATATGTACTA GCATTTTCCA CGCTGATGTT TATGTACTGT | 1028 |
| AAACAGTTCT GCACTCTTGT ACAAAGAAA A | 1059 |
| | |
| CGG GTT AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT | 191 |
| Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile | |
| 50 55 60 | |
| CCC ACT CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG | 239 |
| Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu | |
| 65 70 75 | |
| AAA TCC AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC AAT GGT AAT | 287 |
| Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn | |
| 80 85 90 95 | |
| TAT GAA AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACG ACA AAA TCA | 335 |
| Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser | |
| 100 105 110 | |
| ATG GCT GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG GTC CTG GTG | 383 |
| Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val | |
| 115 120 125 | |
| GTA ACC GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA ACA TCA TAG | 428 |
| Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser * | |
| 130 135 140 | |
| CTGCATTAAA AAAATACAAT ATGGACATGT AAAAGACAA AAACCAAGTT ATCTGTTTCC | 488 |
| TGTTCTCTTG TATAGCTGAA ATTCCAGTTT AGGAGCTCAG TTGAGAAACA GTTCCATTCA | 548 |
| ACTGGAACAT TTTTTTTTTT TCCTTTTAAG AAAGCTTCTT GTGATCCTTT GGGGCTTCTG | 608 |



(2) Informace pro SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 142 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Cys | Leu | Lys | Phe | Leu | Asn | Phe | Phe | Lys | Asp | Asn | Thr | Cys | Leu | Lys | Asn | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ala | Ile | Gln | Ala | Phe | Gly | Asn | Gly | Ser | Asp | Val | Thr | Val | Trp | Gln | Pro | 20 | 25 | 30 | |
| Ala | Phe | Pro | Val | Gln | Thr | Thr | Thr | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Ala | Leu | Arg | 35 | 40 | 45 | |
| Val | Lys | Asn | Lys | Pro | Leu | Gly | Pro | Ala | Gly | Ser | Glu | Asn | Glu | Ile | Pro | 50 | 55 | 60 | |
| Thr | His | Val | Leu | Pro | Pro | Cys | Ala | Asn | Leu | Gln | Ala | Gln | Lys | Leu | Lys | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ser | Asn | Val | Ser | Gly | Asn | Thr | His | Leu | Cys | Ile | Ser | Asn | Gly | Asn | Tyr | 85 | 90 | 95 | |
| Glu | Lys | Glu | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ser | His | Ile | Thr | Thr | Lys | Ser | Met | 100 | 105 | 110 | |
| Ala | Ala | Pro | Pro | Ser | Cys | Gly | Leu | Ser | Pro | Leu | Leu | Val | Leu | Val | Val | 115 | 120 | 125 | |
| Thr | Ala | Leu | Ser | Thr | Leu | Leu | Ser | Leu | Thr | Glu | Thr | Ser | * | 130 | 135 | 140 | | | |

(2) Informace pro SEQ ID NO: 30:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 21 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 30:

CTGTTTGAAT TTGCAGGACT C

21

(2) Informace pro SEQ ID NO: 31:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 36 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 31:

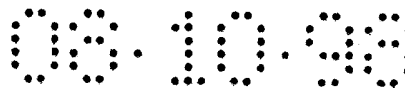
CTCCTCTCTA AGCTTCTAAC CACAGCTTGG AGGAGC

36

(2) Informace pro SEQ ID NO: 32:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 37 párů bazí



- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 32:

CTCCTCTCTA AGCTTCTATG GGCTCAGACC ACAGCTT

37

(2) Informace pro SEQ ID NO: 33:

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 60 párů bazí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 33:

CTCCTCTCTA AGCTTCTACT TGTCATCGTC GTCCTTGTAG TCACCACAGC TTGGAGGAGC

60

(2) Informace pro SEQ ID NO: 34:

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 60 párů bazí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 34:

CTCCTCTCTA AGCTTCTACT TGTCATCGTC GTCCTTGTAG TCTGGCTCAG ACCACAGCTT

60

Patentové nároky

1. Izolovaný a přečištěný protein obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 2 nebo 4 (SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4) a jeho analogy, kdy tento protein je schopen tvořit komplexy s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkovat buněčnou odpověď na GDNF.
2. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).
3. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 4 (SEQ ID NO: 4).
4. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci Ser¹⁸ až Pro⁴⁴⁶ podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).
5. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci Asp²⁵ až Leu⁴⁴⁷ podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).
6. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci Cys²⁹ až Cys⁴⁴² podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).
7. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci Ala¹⁹ až Val⁴⁵⁰ podle obrázku 4 (SEQ ID NO: 4).
8. Protein podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci Cys²⁹ až Cys⁴⁴³ podle obrázku 4 (SEQ ID NO: 4).
9. Protein podle nároku 1, který je glykosylovaný.

10. Protein podle nároku 1, který je neglykosylovaný.
11. Protein podle nároků 1 až 10, který je produkován rekombinantní technologií nebo chemickou syntesou.
12. Farmaceutický přípravek obsahující protein podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.
13. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci podle jakéhokoliv z nároků 1 až 8.
14. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci jak je ukázána na obrázku 2 a 4 (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4) a její analogy, kdy tento protein je schopen tvořit komplexy s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkovat tak buněčnou odpověď na GDNF.
15. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 14 kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci jak je ukázána na obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).
16. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 14 kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci jak je ukázána na obrázku 4 (SEQ ID NO: 4).

17. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny obsahující:

(a) sekvenci uvedenou na obrázku 1 (SEQ ID NO: 1) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁵ nebo obrázku 3 (SEQ ID NO: 3) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁸, kde uvedená sekvence koduje proteinový receptor pro neurotrofický faktor (GDNFR), který je schopen tvořit komplexy s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkovat buněčnou odpověď na GDNF;

(b) sekvenci nukleové kyseliny, která (1) hybridizuje s komplementární sekvencí podle (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou; a

(c) sekvenci nukleové kyseliny, která by mohla, kdyby nebylo degenerace genetického kodu, hybridizovat s komplementární sekvencí podle (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou.

18. Vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 14 až 17 operativně navázanou na jeden nebo více operačních elementů schopných zajištění amplifikace nebo exprese uvedené sekvence nukleových kyselin.

19. Vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 2 nebo 4 (SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4) operativně navázanou na jeden nebo více operačních elementů schopných zajištění amplifikace nebo exprese uvedené sekvence nukleových kyselin.



20. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfektovaná vektorem podle nároku 18.

21. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfektovaná vektorem podle nároku 19.

22. Hostitelská buňka podle nároku 20 vybraná ze skupiny skládající se ze savčích buněk a bakteriálních buněk.

23. Hostitelská buňka podle nároku 22, která je COS-7 buňka nebo E. coli.

24. Hostitelská buňka podle nároku 20, kde uvedená buňka je vhodná pro implantaci u lidí a kde uvedená buňka exprimuje a secernuje uvedený receptor pro neurotrofický faktor.

25. Hostitelská buňka podle nároku 21, kde uvedená buňka je vhodná pro implantaci u lidí a kde uvedená buňka exprimuje a secernuje uvedený receptor pro neurotrofický faktor.

26. Hostitelská buňka podle nároku 20, kde uvedená buňka je transformována nebo transfektována ex vivo.

27. Hostitelská buňka podle nároku 20, kde uvedená buňka je uzavřena v semipermeabilní membráně vhodné pro implantaci u lidí.

28. Způsob pro produkci proteinového receptoru pro neurotrofický faktor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) kultivace hostitelské buňky obsahující sekvenci nukleové

kyseliny kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 2 nebo 4 (SEQ ID NO: 3 nebo SEQ ID NO: 4) a její analogy, kde protein je schopen tvořit komplexy s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkovat buněčnou odpověď na GDNF, za podmínek vhodných pro expresi uvedeného proteinového receptoru pro neurotrofický faktor uvedenou hostitelskou buňkou; a

(b) volitelně, izolace uvedeného proteinového receptoru pro neurotrofický faktor exprivovaného uvedenou hostitelskou buňkou.

29. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená sekvence nukleové kyseliny koduje proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).

30. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená sekvence nukleové kyseliny koduje proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 4 (SEQ ID NO: 4).

31. Způsob pro produkci proteinového receptoru pro neurotrofický faktor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) kultivace hostitelské buňky transformované nebo transfektované sekvencí nukleové kyseliny podle nároku 17 za podmínek vhodných pro expresi uvedeného proteinového receptoru pro neurotrofický faktor uvedenou hostitelskou buňkou; a

(b) volitelně, izolace uvedeného proteinového receptoru pro

neurotrofický faktor exprimovaného uvedenou hostitelskou buňkou.

32. Způsob podle nároku 28 nebo 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok znovusložení izolovaného receptoru pro neurotrofický faktor.

33. Způsob podle nároku 28 nebo 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hostitelskou buňkou je prokaryotická buňka.

34. Způsob podle nároku 28 nebo 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hostitelskou buňkou je eukaryotická buňka.

35. Významně přečištěný proteinový receptor pro neurotrofický faktor připravený způsobem podle jakéhokoliv z nároků 28 až 31.

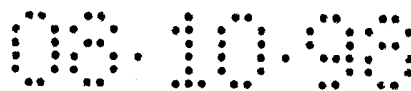
36. Použití proteinového receptoru pro neurotrofický faktor podle nároku 1 pro výrobu farmaceutického přípravku.

37. Způsob pro léčbu chybně funkčních dopaminergních nervových buněk v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání proteinového receptoru pro neurotrofický faktor podle nároku 1.

38. Způsob pro léčbu Parkinsonovi nemoci v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání proteinového receptoru pro neurotrofický faktor podle nároku 1.

39. Způsob pro léčbu Alzheimerovi nemoci v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání proteinového receptoru pro neurotrofický faktor podle nároku 1.

40. Způsob pro léčbu amyotrofické laterální sklerosy



v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání proteinového receptoru pro neurotrofický faktor podle nároku 1.

41. Protilátka, která se váže na proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4.

42. Protilátka podle nároku 41, kde uvedená protilátka je monoklonální protilátka.

43. Protilátka podle nároku 41, kde uvedená protilátka je polyklonální protilátka.

44. Protilátka produkovaná imunizací zvířete proteinovým receptorem pro neurotrofický faktor obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4.

45. Hybridom, který produkuje monoklonální protilátku, která se váže na proteinový receptor pro neurotrofický faktor obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4.

46. Prostředek pro léčbu nervového poškození obsahující:

(a) polopropustnou membránu vhodnou pro implantaci; a

(b) buňky obsažené v uvedené membráně, kde uvedené buňky secernují proteinový receptor pro neurotrofický faktor podle nároku 1; kde uvedená membrána je propustná pro proteinový receptor pro neurotrofický faktor a nepropustná pro materiály škodlivé pro uvedené buňky.



47. Prostředek podle nároku 46, kde uvedené buňky jsou přirozené buňky, které secernují uvedený proteinový receptor pro neurotrofický faktor.

48. Prostředek podle nároku 46, kde uvedené buňky byly modifikovány tak, aby secernovaly uvedený proteinový receptor pro neurotrofický faktor pomocí sekvence nukleových kyselin obsahující:

(a) sekvenci uvedenou na obrázku 1 (SEQ ID NO: 1) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁵ nebo obrázku 3 (SEQ ID NO: 3) obsahující nukleotidy kodující Met¹ až Ser⁴⁶⁸ kodující proteinový receptor pro neurotrofický faktor (GDNFR), který je schopen tvořit komplexy s neurotrofickým faktorem odvozeným od gliální buněčné linie (GDNF) a zprostředkovat buněčnou odpověď na GDNF;

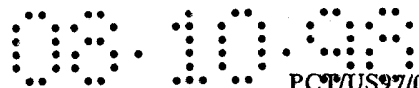
(b) sekvenci nukleové kyseliny, která (1) hybridizuje s komplementární sekvencí podle (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou; a

(c) sekvenci nukleové kyseliny, která by mohla, kdyby nebylo degenerace genetického kodu, hybridizovat s komplementární sekvencí podle (a) a (2) koduje aminokyselinovou sekvenci s GDNFR aktivitou.

49. Testovací prostředek pro analýzu testovaného vzorku na přítomnost neurotrofického faktoru odvozeného od gliální buněčné linie, který obsahuje: pevnou fázi obsahující nebo potaženou GDNFR proteinem, kde uvedený GDNFR protein reaguje s GDNF přítomným v testovaném vzorku a produkuje detekovatelný reakční

produkt ukazující na přítomnost GDNF.

50. Způsob pro analýzu testovaného vzorku na přítomnost neurotrofického faktoru odvozeného od gliální buněčné linie, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje: kontaktování vzorku a testovacího činidla obsahujícího GDNFR protein, kde uvedený GDNFR protein reaguje s GDNF přítomným v testovaném vzorku a produkuje detekovatelný reakční produkt ukazující na přítomnost GDNF.



PV 3245-98

1 / 5 1

~~61144~~

Obr. .1

10

30

50

AATCTGGCCTCGGAACACGCCATTCTCCGCGCCGCTTCCAATAACCACTAACATCCCTA

70

90

110

ACGAGCATCCGAGCCGAGGGCTCTGCTCGGAAATCGTCCTGGCCCAACTCGGCCCTTCGA

130

150

170

GCTCTCGAAGATTACCGCATCTATTTTTTTTTCTTTTTTTCTTTTCTTAGCGCAGATA

190

210

230

AAGTGAGCCCGAAAGGGAAGGAGGGGGCGGGGACACCATTGCCCTGAAAGAATAAATAA

250

270

290

GTAAATAAACAAACTGGCTCCTCGCCGCAGCTGGACGCGGTTCGGTTGAGTCCAGGTTGGG

310

330

350

TCGGACCTGAACCCCTAAAAGCGGAACCGCCTCCCGCCCTCGCCATCCCGGAGCTGAGTC

370

390

410

GCCGGCGGCGGTGGCTGCTGCCAGACCCGGAGTTTCTCTTTGACTGGATGGAGCTGAAC

430

450

470

TTTGGGCGGCCAGAGCAGCACAGCTGTCCGGGGATCGCTGCACGCTGAGCTCCCTCGGCA

490

510

530

AGACCCAGCGGCGGCTCGGGATTTTTTGGGGGGGCGGGGACCAGCCCCGCGCCGGCACC

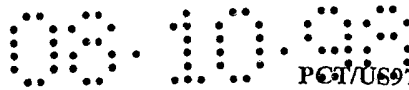
550

570

590

ATGTTCTTGGCGACCCTGTACTTCGCGCTGCCGCTCTTGGACTTGCTCCTGTCGGCCGAA

M F L A T L Y F A L P L L D L L L S A E



Obv. .1A

610 630 650
 GTGAGCGCGGAGACCCGCTGGATTGCCGTGAAAGCCAGTCAGTCAGTCCCTGAAGGAGCAG
 V S G G D R L D C V K A S D Q C L K E Q

670 690 710
 AGCTGCAGCACCAGTACCGCACGCTAAGGCAGTGGTGGGCAAGGAGACCAACTTC
 S C S T K Y R T L R Q C V A G K E T N F

730 750 770
 AGCCTGGCATCCGGCCTGGAGGCCAAGGATGAGTGCCCGCAGCCCATGGAGGCCCTGAAG
 S L A S G L E A K D E C R S A M E A L K

790 810 830
 CAGAAGTCGCTCTACA²ACTGCCGCTGCAAGCGGGGTATGAAGAAGGAGAAGAACTGCCTG
 Q K S L Y N C R C K R G M K K E K N C L

850 870 890
 CGCATTTACTGGAGCATGTACCAGAGCCTGCAGGGAATGATCTGCTGGAGGATTC³CCCA
 R I Y W S M Y Q S L Q G N D L L E D S P

3 / 5 1

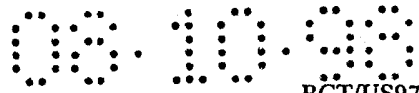
Obr.. 1B

910 930 950
 TATGAACCAGTTAACAGCAGATTGTCAGATAATATCCGGGTGCCCATTCATATCAGAT
 Y E P V N S R L S D I F R V V P F I S D

970 990 1010
 GTTTTTCAGCAAGTGGAGCACATTCCTCCAAAGGGAACAACACTGCCCTGGATGCCAGCGAAGGCC
 V F Q Q V E H I P K G N N C L D A A K A

1030 1050 1070
 TGCAACCTCGACGACATTTGCAAGAAGTACAGGTCCGGGTACATCACCCCGTGCACCACC
 C N L D D I C K K Y R S A Y I T P C T T

1090 1110 1130
 AGCGTGTCCAACGATGTCGCAACCGCCGCAAGTCCACAAGGCCCTCCGGCAGTTCITTT
 S V S N D V C N R R R K C H K A L R Q F F



4 / 5 1

F obr. 1C

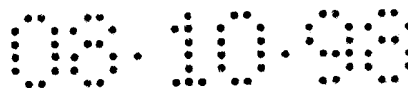
1150 1170 1190
 GACAAGGTCCGGCCAAGCACAGCTACGGAATGCTCTTCTGCTCCTGCCGGGACATCGCC
 D K V P A K H S Y G M L F C S C R D I A

1210 1230 1250
 TGCACAGAGCGGAGGCAGACACACCATCGTGCCTGTGTGCTCCTAATGAAGAGAGGAGAAG
 C T E R R R Q T I V P V C S Y E E R E K

1270 1290 1310
 CCCAACTGTTTGAATTGCAGGACTCCTGCAAGACGAATACATCTGCAGATCTCGCCTT
 P N C L N L Q D S C K T N Y I C R S R L

1330 1350 1370
 GCGGATTTTACCAACTGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTCAGCAGCTGTCTAAAGGAA
 A D F F T N C Q P E S R S V S S C L K E

1390 1410 1430
 AACTACGCTGACTGCCCTCCTCGCTACTCGGGGCTTATTGGCACAGTCATGACCCCAAC
 N Y A D C L L A Y S G L I G T V M T P N



6 / 5 1

| Obr. 1E

1690 1710 1730
 GCAGGGTCTGAGAATGAAATCCCACTCATGTTTGCCACCGTGTGCAAAATTFACAGGCA
 A G S E N E I P T H V L P P C A N L Q A

1750 1770 1790
 CAGAAGCTGAAATCCAATGTGTCGGCAATACACACCTCTGTATTCCAAATGGTAATTAT
 Q K L K S N V S G N T H L C I S N G N Y

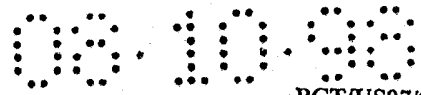
1810 1830 1850
 GAAAAGAAGGTCTCGGTGCTCCAGCCACATAACCACAAAATCAATGGCTGCTCCTCCA
 E K E G L G A S S H I T T K S M A A P P

1870 1890 1910
 AGCTGTGGTCTGAGCCCACTGCTGGTCTGGTGGTAACCGCTCTGTCCACCCCTATTATCT
 S C G L S P L L V L V V T A L S T L L S

1930 1950 1970
 TTAACAGAAACATCATAGCTGCATTAATAAATAACAATATGGACATGTAAAAAGACAAAA
 L T E T S *

F obr. 1F

| | | |
|---|------|------|
| 1990 | 2010 | 2030 |
| ACCAAGTTATCTGTTCCTGTTCTCTGTATAGCTGAAATCCAGTTTAGGAGCTCAGTT | | |
| 2050 | 2070 | 2090 |
| GAGAACAGTTCATTCAACTGGAACATTTTTTTTTT.CCTTTAAGAAAGCTTCTTGT | | |
| 2110 | 2130 | 2150 |
| GATCCTT.GGGCTTCTGTGAAAAACCTGATGCAGTGCTCCATCCAAACTCAGAAGGCTT | | |
| 2170 | 2190 | 2210 |
| TGGGATATGCTGTATTTTAAAGGGACAGTTTGTAACCTGGGCTGTAAGCAAACACTGGGGC | | |
| 2230 | 2250 | 2270 |
| TGTGTTTTCGATGATGAT.ATCATGAT.ATGAT..... | | |
| 2290 | 2310 | 2330 |
|GATTTAACAGTTTACTTCTGGCCTTCCCTAGCTAGAGAAGGAG | | |



8 / 5 1

Obv. 1G

| | | |
|---|------|------|
| 2350 | 2370 | 2390 |
| TTAATAATTTCTAAGGTAACCTCCCATATCTCCCTTTAATGACATTGATTTCTAATGATATAA | | |
| 2410 | 2430 | 2450 |
| ATTCAGCCTACATTGATGCCAAGCTTTTTTGCCACAAGAAGATTCTTACCAAGAGTGG | | |
| 2470 | 2490 | 2510 |
| GCTTTGTGGAACAGCTGGTACTGATGTTCACCTTTATATATGTAAGTACTAGCATTTTCCACG | | |
| 2530 | 2550 | |
| CTGATGTTTATGTACTGTAAACAGTTCTGCACCTCTTGACAAAAGAAAA | | |

9 / 5 1

Obr. 2

M F L A T L Y F A L P L L D L L L S A E 20
V S G G D R L D C V K A S D Q C L K E Q 40
S C S T K Y R T L R Q C V A G K E T N F 60
S L A S G L E A K D E C R S A M E A L K 80
Q K S L Y N C R C K R G M K K E K N C L 100
R I Y W S M Y Q S L Q G N D L L E D S P 120
Y E P V N S R L S D I F R V V P F I S D 140
V F Q Q V E H I P K G N N C L D A A K A 160
C N L D D I C K K Y R S A Y I T P C T T 180
S V S N D V C N R R K C H K A L R Q F F 200
D K V P A K H S Y G M L F C S C R D I A 220
C T E R R R Q T I V P V C S Y E E R E K 240
P N C L N L Q D S C K T N Y I C R S R L 260
A D F F T N C Q P E S R S V S S C L K E 280
N Y A D C L L A Y S G L I G T V M T P N 300
Y I D S S S L S V A P W C D C S N S G N 320
D L E E C L K F L N F F K D N T C L K N 340
A I Q A F G N G S D V T V W Q P A F P V 360
Q T T T A T T T T A L R V K N K P L G P 380
A G S E N E I P T H V L P P C A N L Q A 400
Q K L K S N V S G N T H L C I S N G N Y 420
E K E G L G A S S H I T T K S M A A P P 440
S C G L S P L L V L V V T A L S T L L S 460
L T E T S * 465

10/51

obr. 3

10 30 50
AGCTCGCTCTCCCGGGGCAGTGGTGTGGATGCACCGGAGTTCGGGCGCTGGGCAAGTTGG

70 90 110
GTCGGA ACTGAACCCCTGAAAGCGGGTCCGCCTCCCGCCCTCGCGCCCCGGGATCTGA

130 150 170
GTCGCTGGCGGGTGGGCGGCAGAGCGACGGGGAGTCTGCTCTCACCTGGATGGAGCT

190 210 230
GAACTTTGAGTGGCCAGAGGAGCGCAGTCGCCC GGGGATCGCTGCACGCTGAGCTCTCTC

250 270 290
CCCGAGACCGGGCGGCGGCTTTGGATTTTGGGGGGGCGGGGACCAGCTGCGCGGGGCAC

310 330 350
CATGTTCCCTAGCCACTCTGTACTTCGCGCTGCCACTCCTGGATTTGCTGATGTCGCGCGA
M F L A T L Y F A L P L L D L L M S A E

370 390 410
GGTGAGTGGTGGAGACCGTCTGGACTGTGTGAAAGCCAGCGATCAGTGCCTGAAGGAACA
V S G G D R L D C V K A S D Q C L K E Q

430 450 470
GAGCTGCAGCACCAAGTACCGCACACTAAGGCAGTGCCTGGCGGGCAAGGAAACCACTT
S C S T K Y R T L R Q C V A G K E T N F

490 510 530
CAGCCTGACATCCGGCCTTGAGGCCAAGGATGAGTGCCGTAGCGCCATGGAGGCCTTGAA
S L T S G L E A K D E C R S A M E A L K



12/51

I obr. 3B

| | | |
|---|------|------|
| 850 | 870 | 890 |
| CAGCATGTCCAACGAGGTCTGCAACCGCCGTAAGTGCCACAAGGCCCTCAGGCAGTTCTT | | |
| S M S N E V C N R R K C H K A L R Q F F | | |
| 910 | 930 | 950 |
| CGACAAGGTTCCGGCCAAAGCACAGCTACGGGATGCTCTTCTGCTCCTGCCGGGACATCGC | | |
| D K V P A K H S Y G M L F C S C R D I A | | |
| 970 | 990 | 1010 |
| CTGCACCGAGCGGGCGACAGACTATCGTCCCGTGCTCCTATGAAGAACGAGAGAG | | |
| C T E R R R Q T I V P V C S Y E E R E R | | |
| 1030 | 1050 | 1070 |
| GCCCAACTGCCTGAGTCTGCAAGACTCCTGCAAGACCAATTACATCTGCAGATCTCGCCT | | |
| P N C L S L Q D S C K T N Y I C R S R L | | |

13 / 51

Obr. 3C

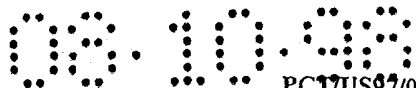
1090 1110 1130
 TGCAGATTTTACCAACTGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTTCAGCAACTGTCTTAAGGA
 A D F F T N C Q P E S R S V S N C L K E

1150 1170 1190
 GAACTACGCAGACTGCCCTCCTGGCCTACTCGGGACTGATTGGCACAGTCATGACTCCCAA
 N Y A D C L L A Y S G L I G T V M T P N

1210 1230 1250
 CTACGTAGACTCCAGCAGCCCTCAGCGTGGCACCATGGTGTGACTGCAGCAACAGCGGCAA
 Y V D S S L S V A P W C D C S N S G N

1270 1290 1310
 TGACCTGGAAGACTGCTTGAATTTCTGAATTTTAAAGGACAATACTGTCTCAAAA
 D L E D C L K F L N F F K D N T C L K N

1330 1350 1370
 TGCAATTCAGCCTTGGCAATGGCTCAGATGTGACCATGTGGCAGCCAGCCCTCCAGT
 A I Q A F G N G S D V T M W Q P A P P V



15 / 51

| obr. 3E

1630 1650 1670
TCCCAGCTGCAGTCTGAGCTCACTCCGGTGTGATGCTCACCGCCCTTGCTGCCCTGTT
P S C S L S S L P V L M L T A L A L L L

1690 1710 1730
ATCTGTATCGTTGGCAGAAACGTCGTAGCTGCATCCGGGAAACAGTATGAAAAGACAAA
S V S L A E T S *

1750 1770 1790
AGAGAACCAAGTATTCTGTCCCCTGTCTCTTGATATCTGAAAATCCAGTTTAAAGCT

1810 1830 1850
CCGTTGAGAAGCAGTTTCACCCCAACTGGAACCTTTCCTTGTTTTAAAGAAAGCTTGTGG

1870 1890 1910
CCCTCAGGGCCTTCTGTTGAAGAAGTCTACAGGGCTAATCCAAACCCATAAGGCCTCTG

16 / 51

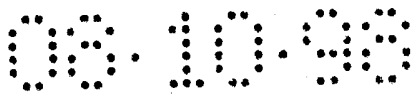
Obr. 3F

| | | |
|--|------|------|
| 1930 | 1950 | 1970 |
| GGCCGTTGGTCCGGCTTAAGGGGACCATTTCACCATGTAAAGCAAGCTGGGCTTATCATG | | |
| 1990 | 2010 | 2030 |
| TGTTTGATGGTGAGGATGGTAGTGGTGATGATGGTAAATTTTAAACAGCTTGAACCCCTG | | |
| 2050 | 2070 | 2090 |
| TTCTCTACTGGTTAGGAACAGGAGATACTATTGATAAAGATTCTTCCATGCTTACTC | | |
| 2110 | 2130 | |
| AGCAGCATTGCCCTTCTGAAGACAGGCCCGCCGAGCCGTCG | | |

17 / 5 1

Obr. 4

M F L A T L Y F A L P L L D L L M S A E 20
V S G G D R L D C V K A S D Q C L K E 40
S C S T K Y R T L R Q C V A G K E T N F 60
S L T S G L E A K D E C R S A M E A L K 80
Q K S L Y N C R C K R G M K K E K N C L 100
R I Y W S M Y Q S L Q G N D L L E D S P 120
Y E P V N S R L S D I F R A V P F I S 140
V F Q Q V E H I S K G N N C L D A A K A 160
C N L D D T C K K Y R S A Y I T P C T T 180
S M S N E V C N R R K C H K A L R Q F F 200
D K V P A K H S Y G M L F C S C R D I A 220
C T E R R R Q T I V P V C S Y E E R E R 240
P N C L S L Q D S C K T N Y I C R S R L 260
A D F F T N C Q P E S R S V S N C L K E 280
N Y A D C L L A Y S G L I G T V M T P N 300
Y V D S S S L S V A P W C D C S N S G N 320
D L E D C L K F L N F F K D N T C L K N 340
A I Q A F G N G S D V T M W Q P A P P V 360
Q T T T A T T T T A F R V K N K P L G P 380
A G S E N E I P T H V L P P C A N L Q A 400
Q K L K S N V S G S T H L C L S D S D F 420
G K D G L A G A S S H I T T K S M A A P 440
P S C S L S S L P V L M L T A L A A L L 460
S V S L A E T S * 468



18 / 51

Obr. 5

-237

-188

Gdnfr AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCCACTA
 Hsgr-21af TCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCCACTA
 Hsgr-21bf AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCCACTA
 21acon TCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCCACTA
 21bcon AATCTGGCCT CGGAACACGC CATTCTCCGC GCCGCTTCCA ATAACCCACTA

-187

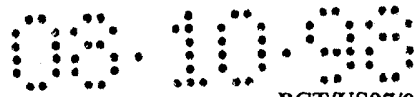
-138

Gdnfr ACATCCCCTAA CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG
 Hsgr-21af ACATCCCCTAA CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG
 Hsgr-21bf ACATCCCCTAA CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG
 21acon ACATCCCCTAA CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG
 21bcon ACATCCCCTAA CGAGCATCCG AGCCGAGGGC TCTGCTCGGA AATCGTCCTG

-137

-88

Gdnfr GCCCAACTCG GCCCTTCGAG CTCTCGAAGA TTACCCGCATC TATTTTTTTT
 Hsgr-21af GCCCAACTCG GCCCTTCGAG CTCTCGAAGA TTACCCGCATC TATTTTTTTT
 Hsgr-21bf GCCCAACTCG GCCCTTCGAG CTCTCGAAGA TTACCCGCATC TATTTTTTTT
 21acon GCCCAACTCG GCCCTTCGAG CTCTCGAAGA TTACCCGCATC TATTTTTTTT
 21bcon GCCCAACTCG GCCCTTCGAG CTCTCGAAGA TTACCCGCATC TATTTTTTTT



| Obr., 5A

-87
 Gdnfr TTCTTTT TTTT TCTTTTCCCTA GCGCAGATAA AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG
 Hsgr-21af TTCTTTT TTTT TCTTTTCCCTA GCGCAGATAA AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG
 Hsgr-21bf TTCTTTT TTTT TCTTTTCCCTA GCGCAGATAA AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG
 21acon TTCTTTT TTTT TCTTTTCCCTA GCGCAGATAA AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG
 21bcon TTCTTTT TTTT TCTTTTCCCTA GCGCAGATAA AGTGAGCCCG GAAAGGGAAG

-87

-38

-37
 Gdnfr GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG TAAATAAACA
 Hsgr-21af GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG TAAATAAACA
 Hsgr-21bf GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG TAAATAAACA
 21acon GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG TAAATAAACA
 21bcon GAGGGGGCGG GGACACCATT GCCCTGAAAG AATAAATAAG TAAATAAACA

-37

12

1 9 / 5 1

13
 Gdnfr AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CCGTTGAGTC CAGGTTGGGT
 Hsgr-21af AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CCGTTGAGTC CAGGTTGGGT
 Hsgr-21bf AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CCGTTGAGTC CAGGTTGGGT
 21acon AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CCGTTGAGTC CAGGTTGGGT
 21bcon AACTGGCTCC TCGCCGCAGC TGGACGCGGT CCGTTGAGTC CAGGTTGGGT

13

62

2 0 / 5 1

Obr. 5B

63
 112
 Gdnfr CCGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCC GG
 Hsgr-21af CCGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCC GG
 Hsgr-21bf CCGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCC GG
 21acon CCGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCC GG
 21bcon CCGACCTGAA CCCCTAAAAG CGGAACCGCC TCCCGCCCTC GCCATCCC GG

113
 162
 Gdnfr AGCTGAGTCG CCGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT
 Hsgr-21af AGCTGAGTCG CCGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT
 Hsgr-21bf AGCTGAGTCG CCGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT
 21acon AGCTGAGTCG CCGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT
 21bcon AGCTGAGTCG CCGGCGGCGG TGGCTGCTGC CAGACCCGGA GTTTCCTCTT

163
 212
 Gdnfr TCACTGGATG GAGCTGAACT TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG
 Hsgr-21af TCACTGGATG GAGCTGAACT TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG
 Hsgr-21bf TCACTGGATG GAGCTGAACT TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG
 21acon TCACTGGATG GAGCTGAACT TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG
 21bcon TCACTGGATG GAGCTGAACT TTGGGCGGCC AGAGCAGCAC AGCTGTCCGG

Obr. 5C

213
 Gdnfr GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA GACCCAGCGG CCGCTCGGGA 262
 Hsgr-21af GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA GACCCAGCGG CCGCTCGGGA
 Hsgr-21bf GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA GACCCAGCGG CCGCTCGGGA
 21acon GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA GACCCAGCGG CCGCTCGGGA
 21bcon GGATCGCTGC ACGCTGAGCT CCCTCGGCAA GACCCAGCGG CCGCTCGGGA

263
 Gdnfr TTTTTTTGGG GGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACCA TGTTCCCTGGC 312
 Hsgr-21af TTTTTTTGGG
 Hsgr-21bf TTTTTTTGGG
 21acon TTTTTTTGGG GGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACCA TGTTCCCTGGC
 21bcon TTTTTTTGGG GGGCGGGGA CCAGCCCCGC GCCGGCACCA TGTTCCCTGGC

313
 Gdnfr GACCCCTGTAC TTCGGCGCTGC CGCTCTTGGG CTTGCTCCTG TCGGCCCGAAG
 21acon GNCCCTGTAC TTCGGCGCTGC CGCTCTTGGG CTTGCTCCTG TCGGCCCGAAG
 21bcon GACCCCTGTAC TTCGGCGCTGC CGCTCTTGGG CTTGCTCCTG TCGGCCCGAAG

Obr. 5D

22 / 51

363 412
 Gdnfr TGAGCGGCGG AGACCGCCTG GATTGCGTGA AAGCCAGTGA TCAGTGCCTG
 21acon TGAGCGGCGG AGACCGCCTG GATTGCGTGA AAGCCAGTGA TCAGTGCCTG
 21bcon TGAGCGGCGG AGACCGCCTG GATTGCGTGA AAGCCAGTGA TCAGTGCCTG

413 462
 Gdnfr AAGGAGCAGA GCTGCAGCAC CAAGTACCGC ACGCTAAGGC AGTGCGTGCC
 21acon AAGGAGCAGA GCTGCAGCAC CAAGTACCGC ACGCTAAGGC AGTGCGTGCC
 21bcon AAGGAGCAGA GCTGCAGCAC CAAGTACCGC ACGCTAAGGC AGTGCGTGCC

463 512
 Gdnfr GGGCAAGGAG ACCAACTTCA GCCTGGCATC CGGCCTGGAG GCCAAGGATG
 21acon GGGCAAGGAG ACCAACTTCA GCCTGGCATC CGGCCTGGAG GCCAAGGATG
 21bcon GGGCAAGGAG ACCAACTTCA GCCTGGCATC CGGCCTGGAG GCCAAGGATG

513 562
 Gdnfr AGTGCCGCAG CGCCATGGAG GCCCTGAAGC AGAAGTCGCT CTACAACTGC
 21acon AGTGCCGCAG CGCCATGGAG GCCCTGAAGC AGAAGTCGCT CTACAACTGC
 21bcon AGTGCCGCAG CGCCATGGAG GCCCTGAAGC AGAAGTCGCT CTACAACTGC

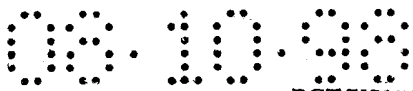
Obr., 5E

563
 612
 gdnfr CGCTGCAAGC GGGGTATGAA GAAGGAGAAG AACTGCCTGC GCATTACTG
 21acon CGCTGCAAGC GGGGTATGAA GAAGGAGAAG AACTGCCTGC GCATTACTG
 21bcon CGCTGCAAGC GGGGTATGAA GAAGGAGAAG AACTGCCTGC GCATTACTG

613
 662
 gdnfr GAGCATGTAC CAGAGCCTGC AGGAAATGA TCTGCTGGAG GATTCCCCAT
 21acon GAGCATGTAC CAGAGCCTGC AGGAAATGA TCTGCTGGAG GATTCCCCAT
 21bcon GAGCATGTAC CAGAGCCTGC AGGAAATGA TCTGCTGGAG GATTCCCCAT

663
 712
 gdnfr ATGAACCAGT TAACAGCAGA TTGTCAGATA TATCCCGGT GGTCCCATT
 21acon ATGAACCAGT TAACAGCAGA TTGTCAGATA TATCCCGGT GGTCCCATT
 21bcon ATGAACCAGT TAACAGCAGA TTGTCAGATA TATCCCGGT GGTCCCATT

713
 762
 gdnfr ATATCAGATG TTTTTCAGCA AGTGGAGCAC ATTCCCAAAG GGAACAACCTG
 21acon ATATCAGATG TTTTTCAGCA AGTGGAGCAC ATTCCCAAAG GGAACAACCTG
 21bcon ATATCAGATG TTTTTCAGCA AGTGGAGCAC ATTCCCAAAG GGAACAACCTG



Obr. 5F

| | | | |
|------------|--|--|-----|
| | 763 | | 812 |
| Gdnfr | CCTGGATGCA GCGAAGGCCT GCAACCTCGA CGACATTTGC AAGAAGTACA | | |
| 21acon | CCTGGATGCA GCGAAGGCCT GCAACCTCGA CGACATTTGC AAGAAGTACA | | |
| 21bcon | CCTGGATGCA GCGAAGGCCT GCAACCTCGA CGACATTTGC AAGAAGTACA | | |
| | 813 | | 862 |
| Gdnfr | GGTCGGCGTA CATCACCCCG TGCACCACCA GCGTGTCCAA .GATGCTGCG | | |
| Hsgr - 29a | GTCGGCGTA CATCACCCCG TGCACCACCA GCGTGTCCAA TGATGCTGCG | | |
| 21acon | GGTCGGCGTA CATCACCCCG TGCACCACCA GCGTGTCCAA CGATGCTGCG | | |
| 21bcon | GGTCGGCGTA CATCACCCCG TGCACCACCA GCGTGTCCAA CGATGCTGCG | | |
| 29brc | GTCGGCGTA CATCACCCCG TGCACCACCA GCGTGTCCAA TGATGCTGCG | | |
| | 863 | | 912 |
| Gdnfr | AACCGCCGCA AGTGCCACAA GGCCCTCCGG CAGTCTTTG ACAAGGTCCC | | |
| Hsgr - 29a | AACCGCCGCA AGTGCCACAA GGCCCTCCGG CAGTCTTTG ACAAGGTCCC | | |
| 21acon | AACCGCCGCA AGTGCCACAA GGCCCTCCGG CAGTCTTTG ACAAGGTCCC | | |
| 21bcon | AACCGCCGCA AGTGCCACAA GGCCCTCCGG CAGTCTTTG ACAAGGTCCC | | |
| 29brc | AACCGCCGCA AGTGCCACAA GGCCCTCCGG CAGTCTTTG ACAAGGTCCC | | |

25 / 51

Obr. 5G

962

913

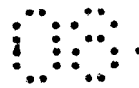
Gdnfr GGCCAAGCAC AGCTACGGAA TGCTCTTCTG CTCCTGCCGG GACATCGCCT
Hsgr-29a GGCCAAGCAC AGCTACGGAA TGCTCTTCTG CTCCTGCCGG GACATCGCCT
21acon GGCCAAGCAC AGCTACGGAA TGCTCTTCTG CTCCTGCCGG GACATCGCCT
21bcon GGCCAAGCAC AGCTACGGAA TGCTCTTCTG CTCCTGCCGG GACATCGCCT
29brc GGCCAAGCAC AGCTACGGAA TGCTCTTCTG CTCCTGCCGG GACATCGCCT
963

1012

Gdnfr GCACAGAGCG GAGCGGACAG ACCATCGTGC CTGTGTGCTC CTATGAAGAG
Hsgr-29a GCACAGAGCG GAGCGGACAG ACCATCGTGC CTGTGTGCTC CTATGAAGAG
21acon GCACAGAGCG GAGCGGACAG ACCATCGTGC CTGTGTGCTC CTATGAAGAG
21bcon GCACAGAGCG GAGCGGACAG ACCATCGTGC CTGTGTGCTC CTATGAAGAG
29brc GCACAGAGCG GAGCGGACAG ACCATCGTGC CTGTGTGCTC CTATGAAGAG
1013

1062

Gdnfr AGGGAGAAGC CCAACTGTGTT GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA
Hsgr-21ar GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA
Hsgr-21br A
Hsgr-29a AGGGAGAAGC CCAACTGTGTT GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA
21acon AGGGAGAAGC CCAACTGTGTT GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA
21bcon AGGGAGAAGC CCAACTGTGTT GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA
29brc AGGGAGAAGC CCAACTGTGTT GAATTTGCAG GACTCCTGCA AGACGAATTA



26 / 51

Obr. 5H

1063
 1112
 Gdnfr CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 Hsgr-21ar CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 Hsgr-21br CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 Hsgr-29a CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 21acon CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 21bcon CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT
 29brc CATCTGCAGA TCTCGCCTTG CGGATTTTTT TACCAACTGC CAGCCAGAGT

1113
 1162
 Gdnfr CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 Hsgr-21ar CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 Hsgr-21br CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 Hsgr-29a CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 21acon CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 21bcon CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC
 29brc CAAGGTCTGT CAGCAGCTGT CTAAAGGAAA ACTACGCTGA CTGCCTCCTC

27 / 51

Obr. 51

1163
 Gdnfr 1212
 GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 Hsgr-21ar GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 Hsgr-21br GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 Hsgr-29a GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 21acon GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 21bcon GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC
 29brc GCCTACTCGG GGCTTATTGG CACAGTCATG ACCCCCAACT ACATAGACTC

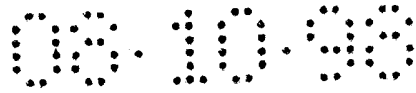
1213
 Gdnfr 1262
 CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 Hsgr-2 TGGGAACG
 Hsgr-21ar CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 Hsgr-21br CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 Hsgr-29a CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 21acon CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 21bcon CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG
 29brc CAGTAGCCTC AGTGTGGCCC CATGGTGTGA CTGCAGCAAC AGTGGGAACG



28 / 51

Obr..5J

| | | |
|-----------|--|------|
| 1263 | | 1312 |
| Gdnfr | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| Hsgr-2 | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| Hsgr-9 | A GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| Hsgr-21ar | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| Hsgr-21br | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| Hsgr-29a | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| 21acon | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| 21bcon | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| 29brc | ACCTAGAAGA GTGCTTGAAA TTTTGAATT TCTTCAAGGA CAATACATGT | |
| 1313 | | 1362 |
| Gdnfr | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| Hsgr-2 | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| Hsgr-9 | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| Hsgr-21ar | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| Hsgr-21br | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| Hsgr-29a | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| 21acon | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| 21bcon | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |
| 29brc | CTTAAAAATG CAATTCAAGC CTTGGCAAT GGCTCCGATG TGACCCGTGTG | |



29 / 5 1

Obi. .5K

1412

1363

Gdnfr GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCaCTACC ACCACTGCCC
Hsgr-2 GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
Hsgr-9 GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
Hsgr-21ar GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
Hsgr-21br GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
Hsgr-29a GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
21acon GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
21bcon GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC
29brc GCAGCCAGCC TTCCCAGTAC AGACCACCAC TGCCACTACC ACCACTGCCC

1462

1413

Gdnfr TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
Hsgr-2 TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
Hsgr-9 TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
Hsgr-21ar TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
Hsgr-21br TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
Hsgr-29a TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
21acon TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
21bcon TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT
29brc TCCGGGTAA GAACAAGCCC CTGGGGCCAG CAGGGTCTGA GAATGAAATT

Obr. 5L

1463 1512
 Gdnfr CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 Hsgr-2 CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 Hsgr-9 CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 Hsgr-21ar CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 Hsgr-21br CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 Hsgr-29a CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 21acon CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 21bcon CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA
 29brc CCCACTCATG TTTTGGCCACC GTGTGCAAAAT TTACAGGCAC AGAAGCTGAA

1513 1562
 Gdnfr ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 Hsgr-2 ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 Hsgr-9 ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 Hsgr-21ar ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 Hsgr-21br ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 21acon ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 21bcon ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG
 29brc ATCCAATGTG TCGGGCAATA CACACCTCTG TATTTCCAAT GGTAATTATG



31 / 51

| Obr. 5M

1563
 Gdnfr AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT 1612
 Hsgr-2 AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 Hsgr-9 AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 Hsgr-21ar AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 Hsgr-21br AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 21acon AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 21bcon AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT
 29brc AAAAAGAAGG TCTCGGTGCT TCCAGCCACA TAACCACAAA ATCAATGGCT

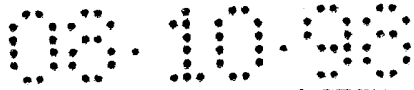
1613
 Gdnfr GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG 1662
 Hsgr-2 GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 Hsgr-9 GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 Hsgr-21ar GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 Hsgr-21br GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 21acon GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 21bcon GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG
 29brc GTCCTCCAA GCTGTGGTCT GAGCCCACTG CTGGTCCCTGG TGGTAACCCGG



3 2 / 5 1

Obr. 5N

| | | |
|-----------|---|------|
| 1663 | | 1712 |
| Gdnfr | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAAC ATCATAGCTG CATTAAAAAA | |
| Hsgr-2 | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAAC ATCATAGCTG CATTAAAAAA | |
| Hsgr-9 | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAAC ATCATAGCTG CATTAAAAAA | |
| Hsgr-21ar | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAA | |
| Hsgr-21br | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAA | |
| 21acon | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAA | |
| 21bcon | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAA | |
| 29brc | TCTGTCCACC CTATTATCTT TAACAGAAAC ATCATAGCTG CATTAAAAAA | |
| 1713 | | 1762 |
| Gdnfr | ATACAAATATG GACATGTAAA AAGACAAAAA CCAAGTTATC TGTTTCCTGT | |
| Hsgr-2 | ATACAAATATG GACATGTAAA AAGACAAAAA CCAAGTTATC TGTTTCCTGT | |
| Hsgr-9 | ATACAAATATG GACATGTAAA AAGACAAAAA CCAAGTTATC TGTTTCCTGT | |
| 29brc | ATACAAATATG GACATGTAAA AAGACAAAAA CCAAGTTATC TGTTTCCTGT | |
| 1763 | | 1812 |
| Gdnfr | TCTCTTGAT AGCTGAAATT CCAGTTTAGG AGCTCAGTTG AGAAACAGTT | |
| Hsgr-2 | TCTCTTGAT AGCTGAAATT CCAGTTTAGG AGCTCAGTTG AGAAACAGTT | |
| Hsgr-9 | TCTCTTGAT AGCTGAAATT CCAGTTTAGG AGCTCAGTTG AGAAACAGTT | |
| 29brc | TCTCTTGAT AGCTGAAATT CCAGTTTAGG AGCTCAGTTG AGAAACAGTT | |



Obr. .50

33 / 51

1813
 Gdnfr 1862 CCATTCAACT GGAACATTTT TTTTTT.CC TTTAAGAAA GCTTCTTGTG
 Hsgr-2 CCATTCAACT GGAACATTTT TTTTTT.CC TTTAAGAAA GCTTCTTGTG
 Hsgr-9 CCATTCAACT GGAACATTTT TTTTTTCC TTTAAGAAA GCTTCTTGTG
 29brc CCATTCAACT GGAACATTTT TTTTTT.CC TTTAAGAAA GCTTCTTGTG

1863
 Gdnfr 1912 ATCCTTCGGG GCTTCTGTGA AAAACCTGAT GCAGTGCTCC ATCCAAACTC
 Hsgr-2 ATCCTTCGGG GCTTCTGTGA AAAACCTGAT GCAGTGCTCC ATCCAAACTC
 Hsgr-9 ATCCTTCGGG GCTTCTGTGA AAAACCTGAT GCAGTGCTCC ATCCAAACTC
 29brc ATCCTTCGGG GCTTCTGTGA AAAACCTGAT GCAGTGCTCC ATCCAAACTC

1913
 Gdnfr 1962 AGAAGGCTTT GGGATATGCT GTATTTAAA GGGACAGTTT GTAACCTGGG
 Hsgr-2 AGAAGGCTTT GGGATATGCT GTATTTAAA GGGACAGTTT GTAACCTGGG
 Hsgr-9 AGAAGGCTTT GGGATATGCT GTATTTAAA GGGACAGTTT GTAACCTGGG
 29brc AGAAGGCTTT GGGATATGCT GTATTTAAA GGGACAGTTT GTAACCTGGG



3 4 / 5 1

5P

obr.

| | | |
|--------|--|------|
| 1963 | | 2012 |
| Gdnfr | CTGTAAAGCA AACTGGGGCT GTGTTTTCGA TGATGATGAT CATCATGATC | |
| Hsgr-2 | CTGTAAAGCA AACTGGGGCT GTGTTTTCGA TGATGATGAT CATCATGATC | |
| Hsgr-9 | CTGTAAAGCA AACTGGGGCT GTGTTTTCGA TGATGATGAT GATCATGATG | |
| 29brc | CTGTAAAGCA AACTGGGGCT GTGTTTTCGA TGATGATGAT CATCATGATC | |

| | | |
|--------|--|-------------|
| 2013 | | 2062 |
| Gdnfr | ATGAT..... |GATTTT |
| Hsgr-2 | ATGAT..... |GATTTT |
| Hsgr-9 | ATGATCATCA TGATCATGAT GATGATCATC ATGATCATGA TGATGATTTT | |
| 29brc | ATGAT..... |GATTTT |

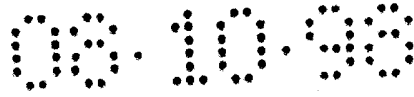
| | | |
|--------|--|------|
| 2063 | | 2112 |
| Gdnfr | AACAGTTTTA CTTCTGGCCT TTCCTAGCTA GAGAAGGAGT TAAATATTCT | |
| Hsgr-2 | AACAGTTTTA CTTCTGGCCT TTCCTAGCTA GAGAAGGAGT TAAATATTCT | |
| Hsgr-9 | AACAGTTTTA CTTCTGGCCT TTCCTAGCTA GAGAAGGAGT TAAATATTCT | |
| 29brc | AACAGTTTTA CTTCTGGCCT TTCCTAGCTA GAGAAGGAGT TAAATATTCT | |



3 8 / 5 1

Obr. 5R

| | | |
|--------|--|------|
| 2263 | | 2312 |
| Gdnfr | TGTA CTAGCA TTTTCCACGC TGATGTTTAT G TACTGTAAA CAGTTCTGCA | |
| Hsgr-2 | TGTA CTAGCA TTTTCCACGC TGATGTTTAT G TACTGTAAA CAGTTCTGCA | |
| Hsgr-9 | TGTA CTAGCA TTTTCCACGC TGATGTTTAT G TACTGTAAA CAGTTCTGCA | |
| 29brc | TGTA CTAGCA TTTTCCACGC TGATGTTTAT G TACTGTAAA CAGTTCTGCA | |
| 2313 | | 2362 |
| Gdnfr | CTCTTG TACA AAAGAAAAA CACCTGT CAC ATCCAAATAT AGTATCTGTC | |
| Hsgr-2 | CTCTTG TACA AAAGAAAA | |
| Hsgr-9 | CTCTTG TACA AAAGAAAA | |
| 29brc | CTCTTG TACA AAAGAAAAA CACCTGT CAC ATCCAAATAT AGTATCTGTC | |
| 2363 | | 2412 |
| Gdnfr | TTTTCG TCAA AATAGAGAGT GGGGAATGAG TGTGCCGATT CAATACCTCA | |
| 29brc | TTTTCG TCAA AATAGAGAGT GGGGAATGAG TGTGCCGATT CAATACCTCA | |
| 2413 | | 2462 |
| Gdnfr | ATCCCCTGAAC GACACTCTCC TAATCCCTAAG CCTTACCTGA GTGAGAAGCC | |
| 29brc | ATCCCCTGAAC GACACTCTCC TAATCCCTAAG CCTTACCTGA GTGAGAAGCC | |



32 / 51

Obr. 5S

2463 2512
 Gdnfr CTTTACCTAA CAAAAGTCCA ATATAGCTGA AATGTCGCTC TAATACTCTT
 29brc CTTTACCTAA CAAAAGTCCA ATATAGCTGA AATGTCGCTC TAATACTCTT

2513 2562
 Gdnfr TACACATATG AGGTTATATG TAGAAAAAAA TTTTACTACT AAATGATTTC
 29brc TACACATATG AGGTTATATG TAGAAAAAAA TTTTACTACT AAATGATTTC

2563 2612
 Gdnfr AACATATTGGC TTTCTATATT TTGAAAGTAA TGATATTGTC TCATTTTTTT
 29brc AACATATTGGC TTTCTATATT TTGAAAGTAA TGATATTGTC TCATTTTTTT

2613 2662
 Gdnfr ACTGATGGTT TAATACAAAA TACACAGAGC TTGTTTCCCC TCATAAGTAG
 29brc ACTGATGGTT TAATACAAAA TACACAGAGC TTGTTTCCCC TCATAAGTAG

58 / 51

Obr. .5T

| | | | |
|-------|---|--|------|
| | 2663 | | 2712 |
| Gdnfr | TGTTGGCTCT GATATGAACT TCACAAATAC AGTCATCAAA AAGCAGACTC | | |
| 29brc | TGTTGGCTCT GATATGAACT TCACAAATAC AGTCATCAAA AAGCAGACTC | | |
| | 2713 | | 2762 |
| Gdnfr | TGAGAAGCCT CGTGGCTGTAG CAGAAAGTTC TGCATCATGT GACTGTGGAC | | |
| 29brc | TGAGAAGCCT CGTGGCTGTAG CAGAAAGTTC TGCATCATGT GACTGTGGAC | | |
| | 2763 | | 2812 |
| Gdnfr | AGGCAGGAGG AAACAGAACA GACAAGCATT GTCCTTTGTC ATTGCTCGAA | | |
| 29brc | AGGCAGGAGG AAACAGAACA GACAAGCATT GTCCTTTGTC ATTGCTCGAA | | |

39 / 51

Obr..5U

2813
 Gdnfr GTGCAAGCGT GCATACCTGT GGAGGGAAC TGTAAATGTT 2862
 29brc GTGCAAGCGT GCATACCTGT GGAGGGAAC TGTAAATGTT

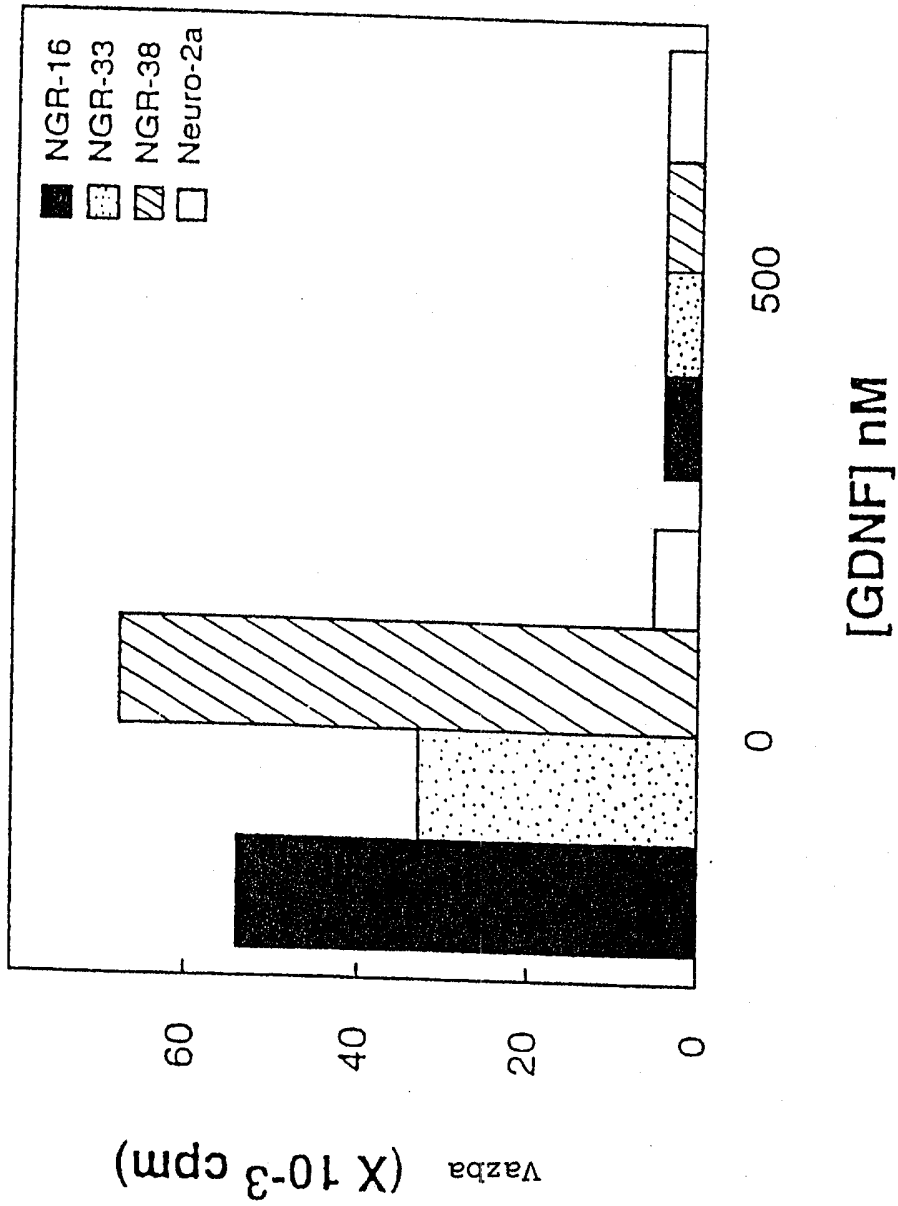
2863
 Gdnfr CTGCAGCATC TCTTGACACA CTTGTCATGA CACAATCCAG TACCTTGGTT 2912
 29brc CTGCAGCATC TCTTGACACA CTTGTCATGA CACAATCCAG TACCTTGGTT

2913
 Gdnfr TTCAGGTTAT CTGACAAAGG CAGCTTTGAT TGGACATGG AGGCATGGGC 2962
 29brc TTCAGGTTAT CTGACAAAGG CAGCTTTGAT TGGACATGG AGGCATGGGC

2963
 Gdnfr AGGCCGGAA
 29brc AGGCCGGAA

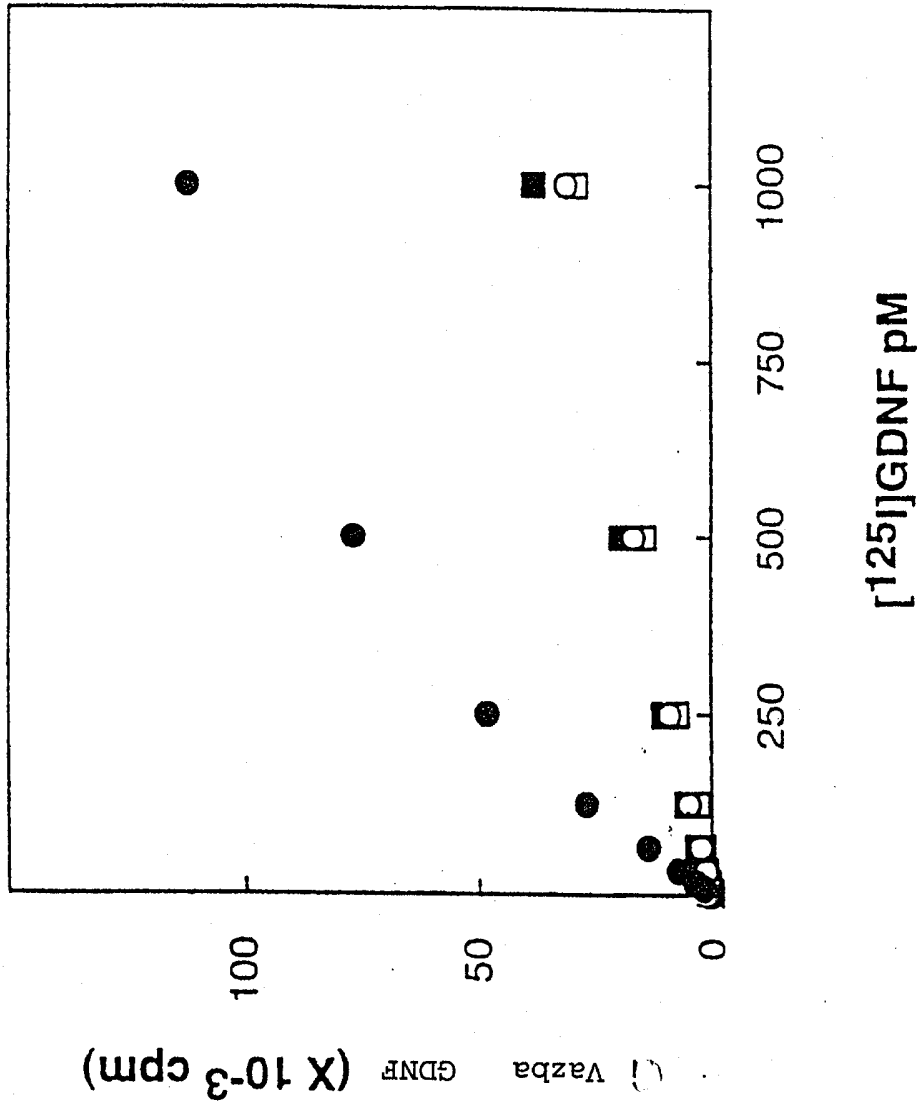
40 / 51

Obr. 6



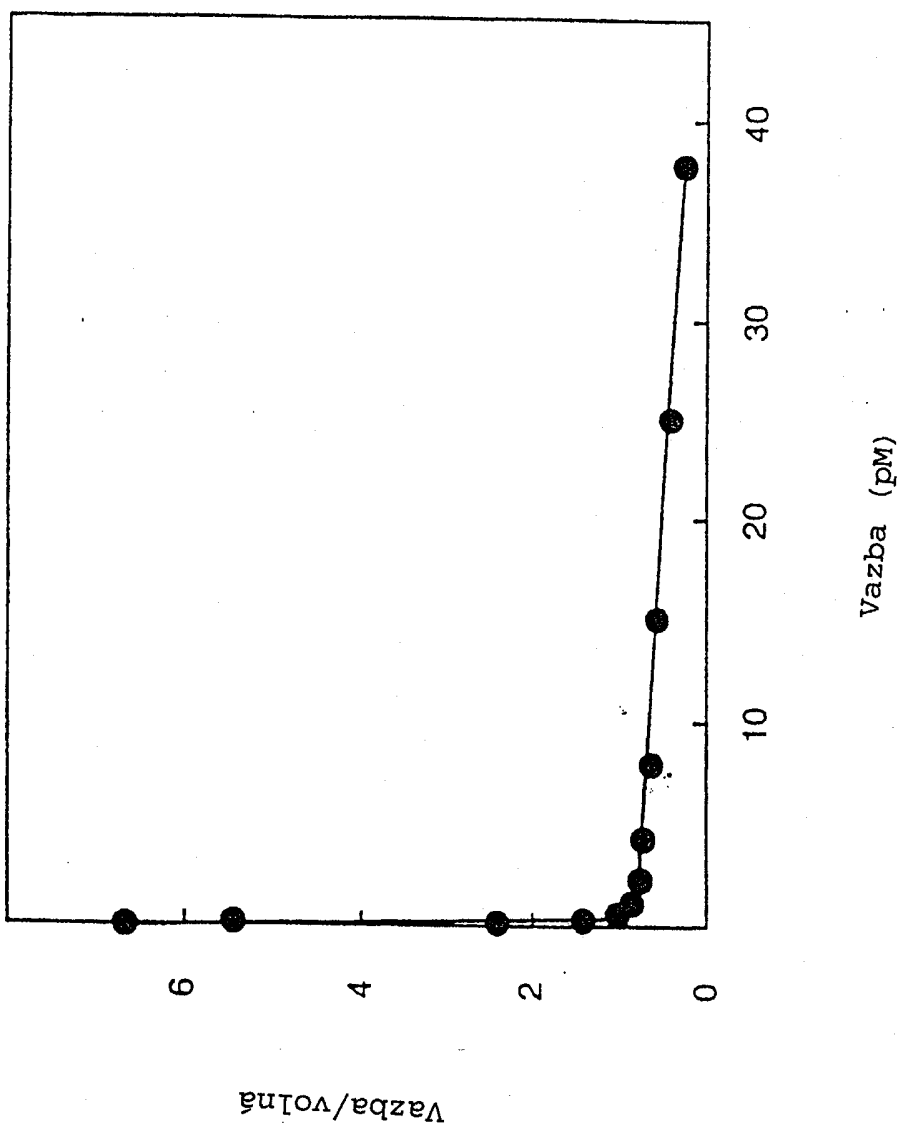
41 / 51

Obr. 7A



42 / 51

Obr. 7B

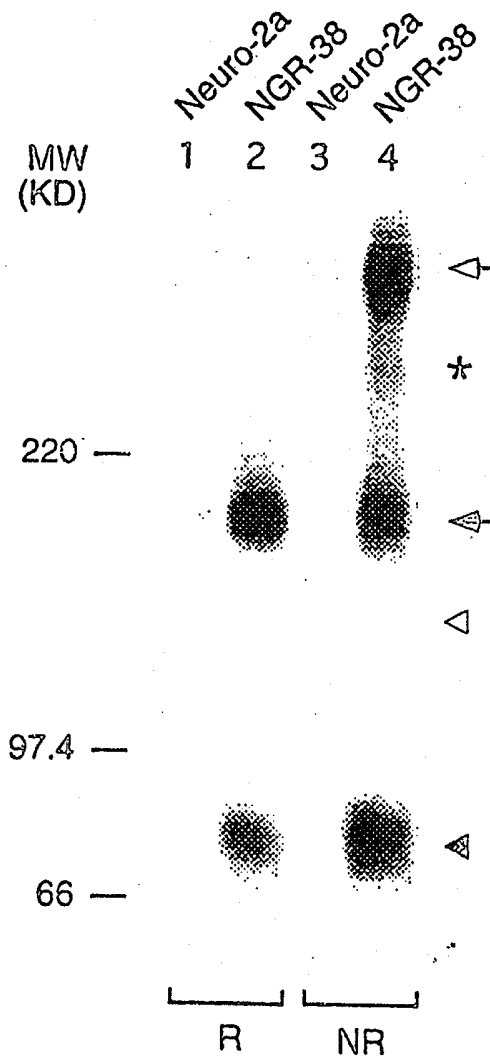


08.10.98

WO 97/40152

PCT/US97/06281

43 / 51



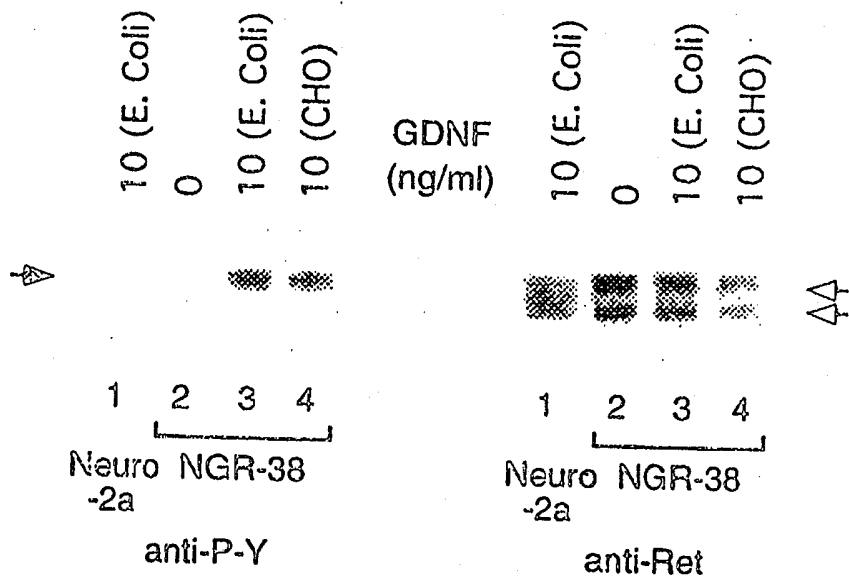
obr. 8

08.10.98

WO 97/40152

PCT/US97/06281

44/51



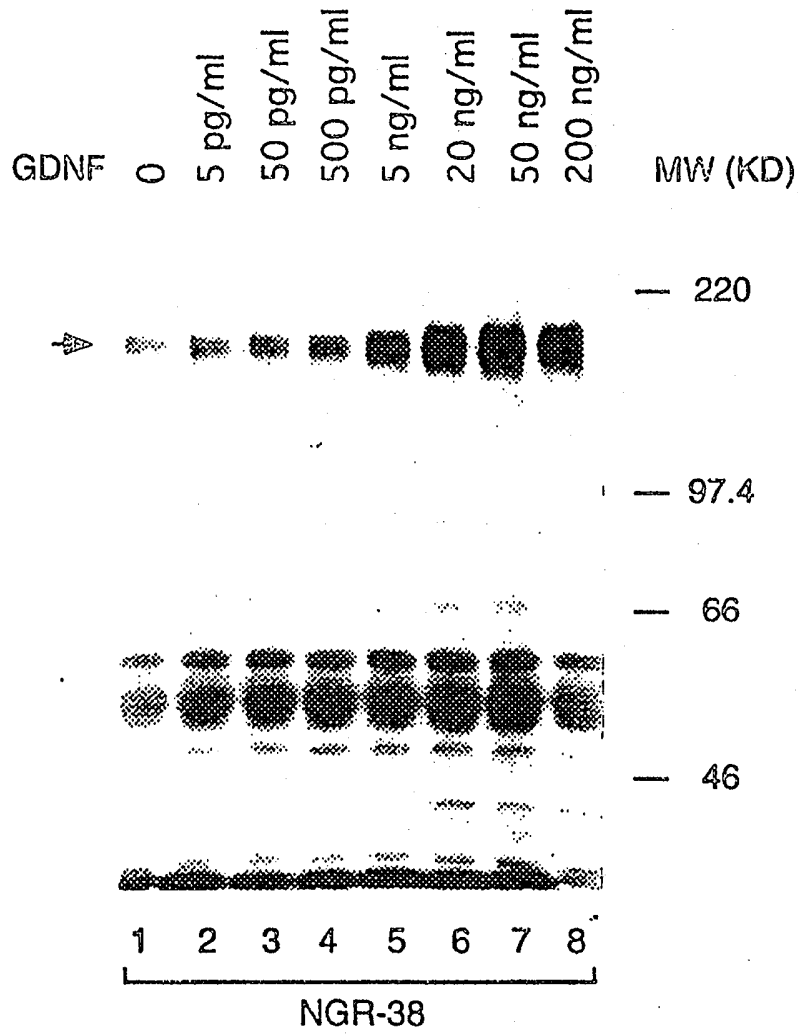
obr. 9A

08.10.99

WO 97/40152

PCT/US97/06281

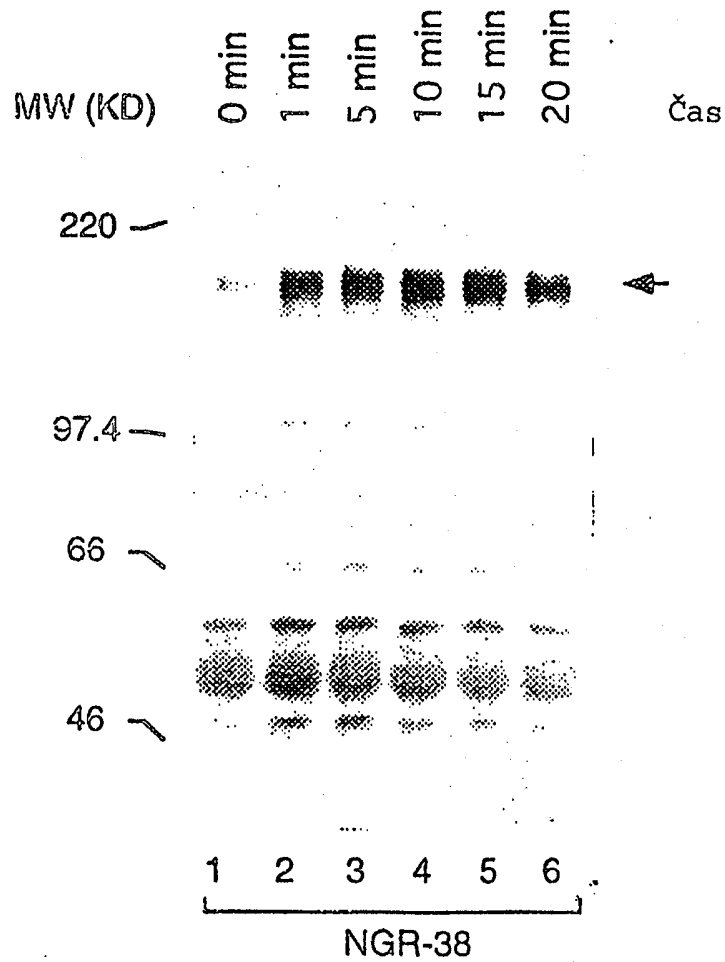
45 / 51



Obr. 9B

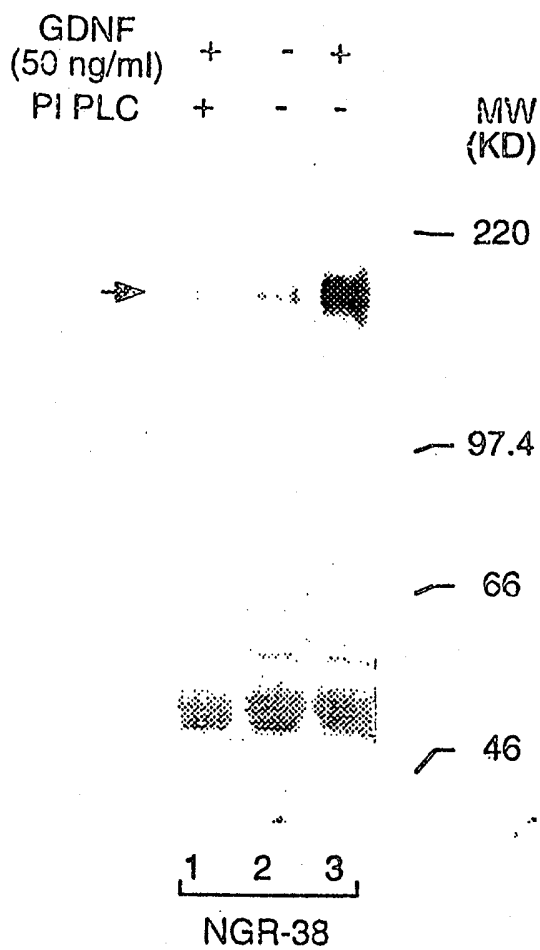
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

48 / 51



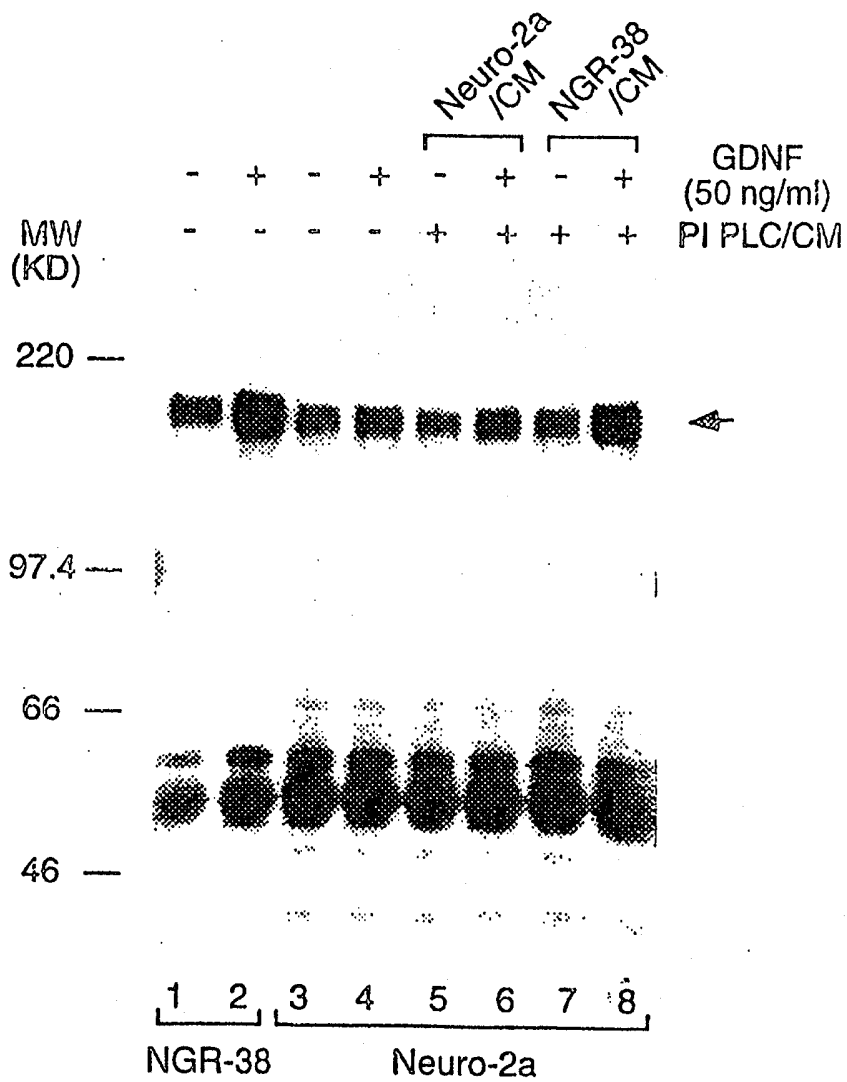
Obr. 9C

47/51



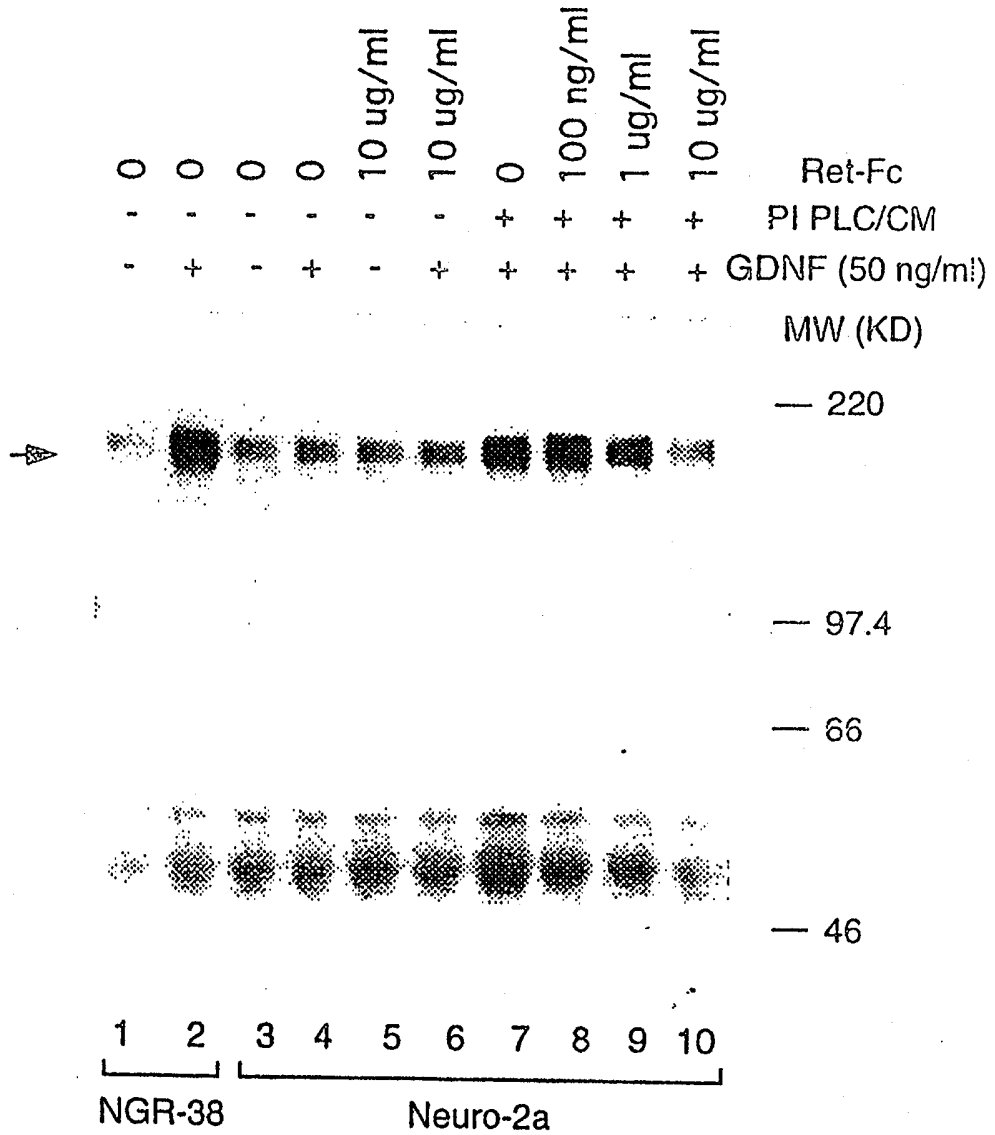
Obr. 10A

48 / 51



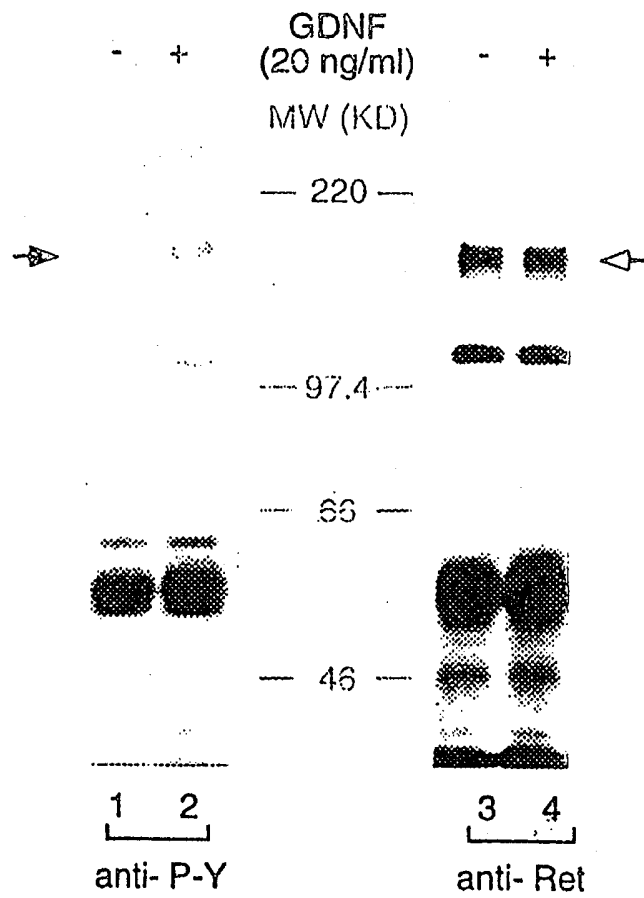
Obr. 10B

49/51



Obr. 11

50/51



Obr. 12

51 / 51

Obr. 13

