



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 34 412 T2 2005.12.15**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 853 668 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 412.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB96/01113**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 932 771.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/012972**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.09.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **10.04.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.07.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12**

C12N 5/10, C07K 14/475, C07K 16/22,

C12Q 1/68, G01N 33/574, A61K 31/70

(30) Unionspriorität:

9519928 29.09.1995 GB

9612368 13.06.1996 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Universita Degli Studi di Siena, Siena, IT

(72) Erfinder:

OLIVIERO, Salvatore, I-53100 Siena, IT

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(54) Bezeichnung: **REGULIERTE GENE UND IHRE VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Howcroft et al., 1993).

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen von Fos-regulierten Genen, die durch die Sequenzen codierten Proteine, Verwendungen der Sequenzen und der codierten Proteine und transgene Tiere, die ein oder mehrere der Sequenzen aufweisen.

[0002] Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist an einer Anzahl von zellulären Prozessen, einschließlich der Zellproliferation, Differenzierung und neuronalen Funktion, beteiligt (siehe Angel und Karin, 1991).

[0003] Es wird angenommen, dass AP-1 seine Wirkung durch Bindung an eine DNA-Erkennungssequenz, die als AP-1-Element bekannt ist und in den Promotor- und Enhancer- bzw. Verstärkerregionen von Genen gefunden wird, ausübt. Das AP-1-Element weist die Konsensussequenz TGA G/C TCA auf.

[0004] Es wurde eine Anzahl von Genen gefunden, die AP-1-Elemente in ihren regulatorischen Regionen aufweisen und diese schließen C-Jun (Angel et al., 1988), MCP-1 (Rollins et al., 1988), Stromelysin (Kerr et al., 1988), Typ-I-Kollagenase (Schonthal et al., 1988) und Interleukin II (Farrar et al., 1989) ein.

[0005] AP-1 besteht aus dimeren Komplexen, die zwischen Jun- (c Jun, Jun-B und Jun D) und Fos- (c-Fos, Fos B, Fra-1 und Fra2) Proteinen gebildet werden. Es wurde festgestellt, dass die Fos-Komponente von AP-1 die limitierende Komponente der AP-1-Aktivität in sich teilenden Zellen ist (siehe Kovary und Bravo, 1991).

[0006] c-Fos ist ein nukleäres Proto-Onkogen, das mit einer Anzahl wichtiger zellulärer Ereignisse, einschließlich einer Zellproliferation (Holt et al., 1986; Ribowol et al., 1988), Differenzierung (Distel et al., 1987; Lord et al., 1993) und der Tumorgenese (Curran et al., 1983; Miller et al., 1984; Ruther et al., 1989) in Zusammenhang gebracht worden ist.

[0007] c-Fos codiert ein 62-kDa-Protein, das mit c-Jun Heterodimere zur Bildung eines AP-1-Transkriptionsfaktors bildet, der an einem AP-1-Element an DNA bindet und die Transkription stimuliert.

[0008] Produkte des Fos-Gens können die Genexpression auch unterdrücken. Sassone et al. (1988) zeigten, dass c-Fos seinen eigenen Promotor inhibiert, und Gius et al. (1990) und Hay et al. (1989) zeigten, dass c-Fos die frühen Antwortgene Egr-1 und c-myc inhibiert.

[0009] Es wurde ebenfalls gezeigt, dass AP-1-Faktoren die Expression von MHC-Klasse-I- und PEP-CK-Genen inhibieren (siehe Gurney et al., 1992, und

[0010] Es ist daher einzusehen, dass Fos-regulierte Gene für die korrekte Expression von Genen, die zu Veränderungen im Zellphänotyp führen, von außerordentlicher Bedeutung sind. Die Bedeutung von Fos-Genen wurde eindeutig durch Erzeugung von Mäusen, denen c-Fos fehlte, gezeigt (siehe Hu et al., 1994). Mäuse ohne C-Fos waren lebensfähig, zeigten jedoch eine Reihe gewebsspezifischer Entwicklungsstörungen, einschließlich Osteopetrosis, verzögerter Gametogenese und Lymphophänie, und Verhaltensabnormalitäten.

[0011] Die Mäuse ohne c-Fos wurden verwendet, um Fibroblastenzelllinien zu erzeugen, und es wurde festgestellt, dass die Expression von zwei Genen abnormal niedrig war. Die zwei Gene waren Stromelysin und Typ-I-Kollagenase. Zuvor wurde festgestellt, dass beide Gene AP-1-Stellen in ihren regulatorischen Sequenzen aufweisen (siehe Kerr et al., 1988, und Schonthal et al., 1988).

[0012] Stromelysin und Typ-I-Kollagenase wurden mit der embryonalen Gewebsentwicklung (Brenner et al., 1989), der Umgestaltung von verletztem Gewebe (Hasty et al., 1990; Woessner und Gunja, 1991) und mit der Tumorprogression und -metastase (Liotta und Stetler, 1990) in Zusammenhang gebracht.

[0013] Superti-Furga et al., (1991) zeigten, dass die c-Fos-Aktivität durch Fusionierung des c-Fos-Proteins der Maus mit der Liganden-Bindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors hormonell kontrolliert werden kann. Es wurde festgestellt, dass das Fusionsprotein die AP-1-abhängige Transkription in einer streng hormonabhängigen Art und Weise stimuliert. Unter Verwendung des Fusionsproteins wurde ein AP-1-reguliertes Gen, Fit-1, gefunden. Es wurde festgestellt, dass Fit-1 in Abhängigkeit vom Spleißmuster ein sezerniertes oder Membran-gebundenes Protein codiert.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen, die zwei neue Fos-regulierte Gene codieren.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt ein Nukleotidmolekül bereit, das ein Protein codiert, welches durch ein Fos-reguliertes Gen oder ein Fragment davon codiert wird, wobei das Protein oder Fragment davon durch eine Nukleotidsequenz gemäß [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) oder ein Fragment davon, einschließlich aller Varianten und Spezies-Varianten der Nukleotidsequenzen, codiert wird.

[0016] Der Ausdruck „Nukleotidmolekül“ bezieht sich vorliegend auf Nukleotide beliebiger Länge, entweder Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide. Der Ausdruck umfasst sowohl doppel- als auch ein-

zelsträngige Moleküle. Er schließt ebenfalls bekannte Typen von Modifikationen, beispielsweise im Fachgebiet bekannte Markierungen, Methylierung, „Kappen“, Substitution eines oder mehrerer der natürlich vorkommenden Nukleotide durch ein Analogon, Internukleotidmodifikationen, wie beispielsweise diejenigen durch ungeladene Verknüpfungen (z. B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoamide, Carbamate, usw.) und durch geladene Verknüpfung (z. B. Phosphorthioate, Phosphordithioate usw.), diejenigen, welche angehängte Einheiten wie Proteine (einschließlich Nukleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide (Poly-L-Lysin usw.) enthalten, diejenigen, welche interkalierende Mittel enthalten (z. B. Acridin, Psoralen usw.) enthalten, diejenigen, welche Chelatoren (z. B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle usw.) enthalten, diejenige, die Alkylierungsmittel enthalten, und diejenige, welche modifizierte Verknüpfungen (z. B. alpha-anomere Nukleinsäuren usw.) enthalten, ein.

[0017] Das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung kann das Protein eines Fos-regulierten Gens oder ein Fragment davon codieren.

[0018] Der Ausdruck „Fragment“, der in Bezug auf Proteine verwendet wird, betrifft Fragmente, die von ausreichender Länge sind, damit sie nur im vorliegenden beanspruchten Protein vorkommen (z. B. eine Länge von 10, 15, 20 oder 25 zusammenhängenden Aminosäuren). Vorzugsweise sind die Proteinfragmente zur Ausübung mindestens eines Teils einer Aktivität des vollständigen Proteins befähigt. Besonders bevorzugte Fragmente umfassen eine konservierte Region eines Gens, von dem festgestellt wurde, dass es homolog zu einer Anzahl anderer Gene ist. Es ist vorgesehen, dass derartige konservierte Regionen eine spezifische Funktion aufweisen.

[0019] Die in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigten Nukleotidsequenzen weisen, wie bei den meisten anderen natürlicherweise vorkommenden Nukleotidsequenzen, eine Anzahl anderer Formen, wie allele Varianten und Speziesvarianten, auf. Derartige Varianten und beliebige andere natürlich vorkommende Formen der Nukleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls als Teil der vorliegenden Erfindung vorgesehen. Derartige Varianten sollten mindestens 60%, vorzugsweise 80%, am meisten bevorzugt 90% Sequenzhomologie mit den in der [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigten Sequenzen oder Fragmenten davon aufweisen.

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung, wobei das Protein oder ein Fragment davon, das durch die in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder ein Fragment davon codiert wird, verändert ist.

[0021] Bevorzugte veränderte Proteine oder Frag-

mente davon sind diejenigen, die weiterhin ihre Aktivität beibehalten und vorzugsweise eine Homologie von mindestens 80%, mehr bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 95% zu dem Protein oder einem Fragment davon aufweisen, welches durch die in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder ein Fragment davon codiert wird. Vorzugsweise unterscheiden sich die veränderten Proteine oder Fragmente davon nur durch 1 bis 10 Aminosäuren. Es ist weiter bevorzugt, dass die Aminosäureänderungen konservativ sind. Konservative Veränderungen sind diejenigen, bei denen eine Aminosäure durch eine solche ausgetauscht wird, die zu der Familie von Aminosäuren zählt, welche verwandte Seitenketten aufweisen. Es ist beispielsweise vernünftig anzunehmen, dass ein isolierter Austausch eines Leucins durch ein Isoleucin oder Valin, eines Aspartats durch ein Glutamat, eines Threonins durch ein Serin, oder ein ähnlicher konservativer Austausch einer Aminosäure durch eine strukturell verwandte Aminosäure keine wesentliche Auswirkung auf die biologische Aktivität des Proteins haben wird.

[0022] Es ist jedoch gelegentlich wünschenswert, Aminosäuren zu verändern, um die biologische Aktivität des Proteins zu ändern.

[0023] Beispielsweise können Mutationen, welche eine oder mehrere der Funktionen des Proteins eliminieren oder verstärken, besonders nützlich sein. Derartige Mutationen können im Allgemeinen durch Verändern beliebiger konservierter Sequenzen des Proteins herbeigeführt werden. Mutationen, welche die Anzahl von Aminosäuren erhöhen, die zur Bildung von Disulfid-Bindungen mit anderen Aminosäuren im Protein befähigt sind, sind besonders bevorzugt, um die Stabilität des Proteins zu verstärken. Mutationen, welche die Anzahl von Aminosäuren, die zur Bildung von Disulfid-Bindungen mit anderen Aminosäuren in dem Protein befähigt sind, vermindern, können ebenfalls herbeigeführt werden, falls es erwünscht ist, die Stabilität des Proteins herabzusetzen. Es ist bevorzugt, dass derartige veränderte Proteine oder Fragmente davon eine Homologie von mindestens 80%, bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 95% zu dem Protein oder einem Fragment davon, das durch die in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder ein Fragment davon codiert wird, aufweisen. Vorzugsweise unterscheiden sich veränderte Proteine oder Fragmente davon nur durch 1 bis 10 Aminosäuren.

[0024] Das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung kann durch im Fachgebiet bekannte Verfahren erhalten werden. Beispielsweise können die Sequenzen durch genomische Klonierung oder cDNA-Klonierung aus geeigneten Zelllinien oder aus DNA oder cDNA, die direkt aus den Geweben eines Organismus wie einer Maus gewonnen werden, erhalten werden. Geeignete Zelllinien schließen beliebige Fibroblastenzelllinien, wie die 3T3-Zelllinie, die

von Hu et al., (1994) beschrieben wurde, ein. Positive Klone können unter Verwendung geeigneter Sonden für das erwünschte Nukleotidmolekül gescreent werden. Eine PCR-Klonierung kann ebenfalls verwendet werden. Die Sonden und Primer bzw. Starter können leicht erzeugt werden, da die Sequenzen, welche das durch das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung codierte Protein oder ein Fragment davon codieren, vorliegend angegeben sind.

[0025] Es können zahlreiche, im Fachgebiet der Molekularbiologie bekannte Standardtechniken verwendet werden, um die erwünschten Nukleotidmoleküle oder die Sonden und Primer zur Identifizierung der positiven Klone herzustellen. Die Nukleotidmoleküle, Sonden oder Primer können vollständig unter Verwendung von Standardoligonukleotidsyntheseverfahren, wie dem Phosphoramiditverfahren, synthetisiert werden.

[0026] Es können zahlreiche Techniken verwendet werden, um die durch die Synthese- oder Klonierungsverfahren erhaltene DNA-Sequenz zu verändern, und derartige Techniken sind einem Fachmann bekannt. Es können beispielsweise die zielgerichtete Mutagenese, die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese und PCR-Techniken verwendet werden, um die DNA-Sequenz zu verändern. Derartige Techniken sind einem Fachmann bekannt und sind vielfältig in der, einem Fachmann bekannten Literatur, beispielsweise Sambrook et al., (1989), beschrieben.

[0027] Die vorliegende Erfindung stellt weiter das durch das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung codierte Protein bereit.

[0028] Vorzugsweise weist das von dem Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung codierte Protein die in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder ein Fragment davon auf.

[0029] Der Ausdruck „Protein“ bezieht sich vorliegend auf ein Polymer von Aminosäuren und bezieht sich nicht auf eine spezifische Länge des Produkts. Daher sind Peptide, Oligopeptide und Proteine in dem Ausdruck Protein eingeschlossen. Der Ausdruck bezieht sich ebenfalls nicht auf Modifikationen des Proteins nach der Expression, beispielsweise Glycosylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen, und schließt diese nicht aus. Unter die Definition fallen Proteine, die ein oder mehrere Analoge einer Aminosäure (einschließlich beispielsweise nicht-natürliche Aminosäuren) enthalten, Proteine mit substituierten Verknüpfungen sowie andere im Fachgebiet bekannte Modifikationen, die sowohl natürlich vorkommen können als auch synthetisiert sein können.

[0030] Das Protein der vorliegenden Erfindung kann aus Zellen, wie Fibroblastenzellen, erhalten werden,

die natürlicherweise das Protein produzieren. Es ist jedoch bevorzugt, dass ein geeignetes Wirtszell- und Vektorsystem für die Expression des Nukleotidmoleküls der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung kann in vielfältigen verschiedenen Expressionssystemen, beispielsweise denjenigen, die bei Säugerzellen, Baculoviren, Bakterien und eukaryotischen Mikroorganismen wie Hefen verwendet werden, exprimiert werden.

[0031] Sämtliche der vorstehend genannten Expressionssysteme sind im Fachgebiet bekannt, und die Expression von Nukleotidsequenzen ist heute eine im Fachgebiet bekannte Standardtechnik.

[0032] Es werden vorzugsweise eukaryotische, z. B. Säugerwirtszellen-Expressionssysteme verwendet. Insbesondere schließen Säugerwirtszellen Chinesischer-Hamster-Ovarien(CHO)-Zellen, HeLa-Zellen, Babyhamsternieren(BKH)-Zellen, Zellen hepatischen Ursprungs, wie HepG2-Zellen, und Myelom- oder Hybridom-Zelllinien ein.

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt weiter einen Vektor zur Expression des Nukleotidmoleküls der vorliegenden Erfindung bereit, der einen Promotor und das erfindungsgemäße Nukleotidmolekül umfasst.

[0034] Ein Säugerpromotor kann eine beliebige DNA-Sequenz sein, die zur Bindung von Säuger-RNA-Polymerase und zur Initiierung der stromabwärtigen Transkription einer kodierenden Sequenz in mRNA befähigt ist. Besonders nützliche Promotoren sind diejenigen, die aus Genen von Säugerviren abgeleitet sind, wie der frühe SV-40-Promotor, der späte Hauptpromotor des Adenovirus und der Herpes-simplex-Virus-Promotor. Es können außerdem Sequenzen nicht-viraler Gene als Promotoren, wie aus dem Gen für das Metalllothionein der Maus, verwendet werden.

[0035] Das Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung kann intrazellulär in Säugerzellen exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung verknüpft sein, wobei die erste Aminosäure am N-Terminus des codierten Proteins ein durch das Startcodon ATG codiertes Methionin ist.

[0036] In einer anderen Ausführungsform kann das durch das erfindungsgemäße Nukleotidmolekül codierte Protein aus der Zelle sezerniert werden, indem eine für eine Leader- bzw. Leitsequenz codierende Nukleotidsequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz verknüpft wird. Das codierte Fusionsprotein umfasst ein Leadersequenz-Fragment und das vom erfindungsgemäßen Nukleotidmolekül codierte Protein. Die Leadersequenz führt zur Sekretion

des Fusionsproteins aus der Zelle. Vorzugsweise befinden sich zwischen der Leadersequenz und dem vom erfindungsgemäßen Nukleotidmolekül codierten Protein Prozessierungsstellen, welche die enzymatische oder chemische Abspaltung der Leadersequenz erlauben. Ein Beispiel einer derartigen Leadersequenz ist die Tripartit-Leadersequenz des Adenovirus.

[0037] Der erfindungsgemäße Vektor ist vorzugsweise ein DNA umfassender Nukleinsäurevektor. Der Vektor kann eine lineare oder zirkuläre Konfiguration aufweisen und an eine episomale oder integrierte Existenz in der Wirtszelle angepasst sein, wie es in der einem Fachmann bekannten, umfassenden Literatur dargestellt ist. Die Vektoren können unter Verwendung viraler oder nicht-viraler Einschleusungssysteme in Zellen eingeschleust werden. Die Wahl des Einschleusungssystems bestimmt, ob das DNA-Molekül in das Genom der Zelle inkorporiert wird oder episomal verbleibt.

[0038] Der erfindungsgemäße Vektor kann weiter Kontrollelemente, wie Polyadenylierungssignale, Transkriptionsterminierungssignale, Enhancer- bzw. Verstärkersequenzen, Locus-Kontrollregionen (LCR) usw., umfassen.

[0039] Die vorliegende Erfindung stellt weiter eine Wirtszelle, die mit dem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist, bereit.

[0040] Die „Transformation“ bezieht sich auf die Einbringung eines exogenen Polynukleotids in eine Wirtszelle, unabhängig von dem Verfahren, das für die Einbringung verwendet wird, beispielsweise eine direkte Aufnahme, Transduktion, f-Paarung oder Elektroporation. Das exogene Polynukleotid kann als nicht-integrierter Vektor (Episom) erhalten bleiben, oder es kann in das Wirtsgenom integriert werden.

[0041] Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine eukaryotische Zelle, mehr bevorzugt eine Säugerzelle, wie Chinesischer-Hamster-Ovarien(CHO)-Zellen, HeLa-Zellen, Babyhamsternieren(BKH)-Zellen, Zellen hepatischen Ursprungs, wie HepG2-Zellen, und Myelom- oder Hybridom-Zelllinien.

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt weiter ein Verfahren zur Herstellung des vom erfindungsgemäßen Nukleotidmolekül codierten Proteins bereit, welches die Transfektion einer Wirtszelle mit dem erfindungsgemäßen Vektor, Kultivieren der transfizierten Wirtszellen unter geeigneten Bedingungen, um zur Expression des DNA-Moleküls und zur Produktion des erwünschten Proteins zu führen, umfasst. Das Protein kann dann aus den transfizierten Zellen oder aus dem Zellwachstumsmedium in Abhängigkeit davon, ob das Protein sezerniert wird, unter Verwendung von Standardtechniken gewonnen werden.

[0043] Die vorliegende Erfindung stellt weiter das erfindungsgemäße Nukleotidmolekül zur Verwendung in der Therapie bereit.

[0044] Die vorliegende Erfindung stellt weiter die Verwendung des Nukleotidmoleküls der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Behandlung von Entwicklungsstörungen bereit.

[0045] Die vorliegende Erfindung stellt weiter die Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleotidmoleküls zur Behandlung von Entwicklungsstörungen bereit.

[0046] Es ist bekannt, dass Fos-regulierte Gene bei der Entwicklung und Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. Demgemäß hat die Entdeckung Fos-regulierter Gene Auswirkungen auf die Steuerung der Entwicklung und der Zelldifferenzierung.

[0047] Es wurde festgestellt, dass die in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigten Nukleotidsequenzen eine Sequenz aufweisen, die zu Genen einer Familie von Wachstumsfaktoren ähnlich ist, welche durch die kennzeichnenden Merkmale der Familie des Blutplättchenwachstumsfaktors (PDGF) charakterisiert sind. Die am deutlichsten verwandte Sequenz ist diejenige des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). VEGF bildet ein Homodimer, das einen Wachstumsfaktor darstellt, der bei der Angiogenese und dem Wachstum endothelialer Zellen wirksam ist (siehe Keck et al., 1989 und Leung et al., 1989). VEGF wurde ebenfalls verwendet, um die Angiogenese zu stimulieren und dadurch einen therapeutischen Effekt zu bewirken (siehe Takeshita et al., 1994).

[0048] Das von der Sequenz in [Fig. 1](#) codierte Protein ist ein Protein der Maus, und das von der Sequenz in [Fig. 2](#) codierte Protein ist ein humanes Homologes des Mausproteins, das von der in [Fig. 1](#) angegebenen Sequenz codiert wird. Beide Proteine werden vorliegend als c-Fos-induzierter Wachstumsfaktor (FIGF) bezeichnet.

[0049] Die Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleotidmoleküls in der Therapie ist daher als eine bedeutende Anwendung der Sequenzen der Fos-regulierten Gene der vorliegenden Erfindung anzusehen.

[0050] Die in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigten Nukleotidsequenzen sind besonders bei Lungenerkrankungen von Interesse, da festgestellt wurde, dass die Nukleotidsequenzen hauptsächlich in den Lungen exprimiert werden. Besondere Lungenerkrankungen, die unter Verwendung des Nukleotidmoleküls, welche das Protein oder Fragmente davon codieren, die von der in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigten Sequenz codiert

werden, behandelt werden können, schließen die Pneumonie und die Pneumoconiosis ein. Das Nukleotidmolekül kann ebenfalls nach einer Pneumoektomie verwendet werden, um bei einem erneuten Lungenwachstum behilflich zu sein.

[0051] Die in [Fig. 2](#) gezeigte Nukleotidsequenz wurde auf dem humanen Chromosom Xp22 nahe demjenigen Locus kartiert, der mit der Erkrankung der spondyloepiphysealen Dysplasie (SEDL) zusammenhängt. Die genetische Karte dieser Region wurde von Ferrero et al. (1995) beschrieben, und die Kartierung der SEDL wurde von Heuertz et al. (1993) beschrieben. SEDL könnte daher unter Verwendung des Nukleotidmoleküls behandelbar sein, das für das Protein oder Fragmente davon codiert, das bzw. die durch die in [Fig. 1](#) oder in [Fig. 2](#) angegebene Sequenz codiert wird bzw. werden.

[0052] Wie zuvor diskutiert, wurde festgestellt, dass Fos-regulierte Gene an der Tumorprogression und -metastase beteiligt sind. Durch Inhibition Fos-regulierter Gene ist es möglich, das Tumorwachstum zu inhibieren oder zu unterdrücken.

[0053] Kürzlich wurde von Kim et al., (1993) das Tumorwachstum durch Injizierung von monoklonalen Antikörpern, die für VEGF spezifisch sind, unterdrückt. Wie zuvor angegeben, weist VEGF eine zu den in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigten Sequenzen ähnliche Nukleotidsequenz auf.

[0054] Daher kann durch Inhibition der In-vivo-Expression, Translation usw. des nativen Nukleotidmoleküls der vorliegenden Erfindung das Tumorwachstum inhibiert oder unterdrückt werden.

[0055] Die Wirkungen der Fos-regulierten Gene, die dem erfindungsgemäßen Nukleotidmolekül entsprechen, können durch eine Zahl von Techniken inhibiert werden.

[0056] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Proteins zur Identifizierung des Rezeptors oder der Rezeptoren des Proteins oder eines Proteinkomplexes, der das Protein umfasst.

[0057] Verfahren zur Identifizierung von Rezeptoren sind einem Fachmann bekannt und wurden in großem Umfang in der Literatur beschrieben. Es gibt jedoch grundsätzlich drei Hauptwege zur Identifizierung von Rezeptoren:

- i. Testen aller bekannten Rezeptoren, die an ähnliche Moleküle binden. Dies ist besonders beim Protein, das von den in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigten DNA-Sequenzen codiert wird, nützlich, da festgestellt wurde, dass VEGF eine ähnliche Sequenz aufweist.
- ii. Durchführung eines Bindungsreinigungs-

schriffs. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Protein oder ein Proteinkomplex, der das erfindungsgemäße Protein umfasst, auf einem festen Träger immobilisiert werden, und es werden dann zahlreiche mögliche Rezeptormoleküle, insbesondere Membranproteine, über den festen Träger gegeben. Ein Bindungsreinigungsverfahren ist in Schusted et al., (1995) beschrieben.

iii. Durch das Screenen von Expressionsbanken, um Zellen aufzufinden, denen der Rezeptor oder die Rezeptoren fehlt/fehlen, und danach Ausnutzen des Rezeptorklonierungsverfahrens, das von Seed und Aruffo, (1987) beschrieben wurde.

[0058] Andere Verfahren sind ebenfalls einem Fachmann bekannt und können verwendet werden, um den Rezeptor oder die Rezeptoren aufzufinden.

[0059] Nach Identifizierung des Rezeptors oder der Rezeptoren wird es möglich sein, Arzneimittel zu gestalten, welche die Aktivität des Rezeptors oder der Rezeptoren blockieren oder verstärken, und Antikörpermoleküle herzustellen, die den Rezeptor oder die Rezeptoren blockieren. Sobald die DNA-Sequenz des Rezeptors oder der Rezeptoren bekannt ist/sind, können eine Anzahl von Gentherapien zur Korrektur von Fehlern bei dem Rezeptor oder den Rezeptoren oder zur Blockierung der Expression des Rezeptors oder der Rezeptoren entwickelt werden.

[0060] Die vorliegende Erfindung stellt weiter die Verwendung des Proteins der Erfindung in einem Test zur Identifizierung von Antagonisten oder Agonisten des Proteins bereit, die als Arzneimittel in der Behandlung von Krebs bzw. Entwicklungsstörungen verwendet werden können. Tests zur Identifizierung derartiger potentieller Arzneimittel werden häufig verwendet und sind einem Fachmann bekannt. Ein Beispiel eines derartigen Tests ist deutlich in Tsunoda et al., (1994) beschrieben.

[0061] Die vorliegende Erfindung stellt weiter die Verwendung des Nukleotidmoleküls, Antisense-Nukleotidmoleküls, Proteins oder Antikörpermoleküls der vorliegenden Erfindung oder eine beliebige Kombination davon zur Diagnose eines pathologischen Zustands oder einer Prädisposition für eine Erkrankung bereit.

[0062] Das Nukleotidmolekül oder Antisense-Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung kann zur Bestimmung des Vorliegens des dem Nukleotidmolekül entsprechenden Gens oder zur Bestimmung der von dem Gen transkribierten RNA verwendet werden.

[0063] Das erfindungsgemäße Protein kann in einem Test zur Bestimmung der Menge des Proteins, das durch das Gen codiert wird, welches dem Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung entspricht, verwendet werden.

[0064] Durch Bestimmen des Vorliegens des dem Nukleotidmolekül der vorliegenden Erfindung entsprechenden Gens oder der transkribierten RNA oder des von dem Gen codierten Proteins ist es möglich, einen pathologischen Zustand oder eine Prädisposition für eine Erkrankung zu diagnostizieren, der/die durch die Gegenwart des Gens oder die Überexpression des Gens hervorgerufen wird.

[0065] Die vorliegende Erfindung stellt weiter die Verwendung des Nukleotidmoleküls der vorliegenden Erfindung zur Erzeugung transgener Tiere bereit. Insbesondere stellt die Erfindung die Verwendung derartiger Nukleotidmoleküle zur Erzeugung nicht-humaner transgener Tiere, insbesondere transgener Mäuse, bereit.

[0066] Es können transgene Tiere erzeugt werden, die als Forschungsmodelle geeignet sind. Beispielsweise könnten transgene Tiere, die das erfindungsgemäße Nukleotidmolekül überexprimieren, verwendet werden, um festzustellen, welche Auswirkungen die Überexpression hat. In einer anderen Ausführungsform können transgene Tiere erzeugt werden, bei denen das native erfindungsgemäße Nukleotidmolekül „ausgeschaltet“ bzw. „ausgeknockt“ ist. Die Wirkung des „Ausschaltens“ bzw. „Knock-Out“ des Nukleotidmoleküls könnte dann untersucht werden.

[0067] Verfahren zur Erzeugung derartiger transgener Tiere sind einem Fachmann bekannt und können leicht durchgeführt werden, da die zu überexprimierenden oder „auszuschaltenden“ Nukleotidmoleküle vorliegend offenbart werden.

[0068] Die erfindungsgemäßen transgenen Tiere könnten nachfolgend auch sowohl mit Fos-überexprimierenden Mäusen oder Mäusen, bei denen Fos „ausgeschaltet“ ist, gekreuzt werden, um die Auswirkungen der veränderten Steuerung von Fos festzustellen.

[0069] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Nukleotidmolekül bereit, das die gesamte in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder einen Teil davon umfasst.

[0070] Das Nukleotidmolekül, das die gesamte in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigte Sequenz oder einen Teil davon umfasst, kann ein Protein codieren oder kann nicht-codierend sein. Vorzugsweise codiert das Nukleotidmolekül zusätzlich die Steuerungssequenzen der Fos-Gene, die der in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigten Nukleotidsequenz entsprechen. Es ist weiter bevorzugt, dass das Nukleotidmolekül eine Sequenz codiert, die einem Gen eine Fos-Regulation verleiht. Es ist besonders bevorzugt, dass das Nukleotidmolekül die Sequenz TGACTCA umfasst.

[0071] Die vorliegende Erfindung wird nachstehend

in den beigefügten Beispielen mit Bezug auf die folgenden Figuren erläutert.

[Fig. 1](#)

[0072] DNA-Sequenz des Fos-regulierten Gens F0401, welche die codierte Proteinsequenz und die mit VEGF homologen Regionen (unterstrichen) zeigt.

[Fig. 2](#)

[0073] DNA-Sequenz des Fos-Regulierten Gens HF174 (humanes Homolog von F0401), welche das codierte Protein zeigt.

[Fig. 3](#)

[0074] Gegenüberstellung des von FIGF codierten Proteins mit der konservierten Domäne der PDGF/VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren. Punkte zeigen die Cystein-Reste, die für diese Wachstumsfaktoren charakteristisch sind.

[Fig. 4](#)

[0075] (A) Immunpräzipitationstest für das FIGF-Protein. COS-7-Zellen, die mit dem Vektor allein (-) oder mit einem Vektor transfiziert sind, der die für FIGF codierende Sequenz unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält (+), wurden metabolisch für 1 Stunde mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein jeweils bei einer Konzentration von 100 µCi/ml markiert. Nach 1 Stunde oder 22 Stunden Verfolgung wurden konditioniertes Medium und Zelllysate getrennt mit polyklonalen Anti-FIGF-Antikörpern immunpräzipitiert. [Das FIGF-Protein wurde in E. coli unter der Kontrolle des T5-Promotors exprimiert. Das cDNA-Fragment aus der FIGF-codierenden Region wurde durch PCR, ausgehend vom Methionin-Rest an Position +40, erzeugt und in den pQE-31-Vektor (Qiagen) kloniert, um ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen Histidin-Tag zu erhalten. Das Protein wurde in TG1-Bakterien (pREP+) durch Induktion für 4 Stunden bei 37°C in Gegenwart von 2 mM Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid exprimiert. Das rekombinante Protein lag ausschließlich in Einschlusskörpern vor und wurde auf einer Säule mit einem Ni-NTA-Harz unter denaturierenden Bedingungen gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen) gereinigt. Es wurden Antikörper durch Injektion von 200 µg rekombinantes FIGF in Form des denaturierten Proteins in komplettem Freund'schem Adjuvants in Kaninchen erzeugt. Das Serum wurde nach 4 Injektionen in inkomplettem Freund'schem Adjuvants in dreiwöchentlichen Intervallen präpariert]. Die Immunkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose-Kügelchen (Pharmacia) gesammelt und mittels 12% SDS-PAGE in Gegenwart von 3% β-Mercaptoethanol getrennt. Pfeile zeigen spezifische Banden, die nur bei FIGF-transfizierten Zellen vorliegen.

[0076] (B) Mitogene Aktivität, die als Einbau von $[3H]$ -Thymidin in *c-fos*(-/-)-Fibroblasten gemessen wurde. Zellen wurden mit konditioniertem Medium von COS-7-Zellen inkubiert, die mit dem FIGF-Expressionsvektor oder mit dem Vektor allein transfiziert wurden. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeteilt und in 2% Serum gehalten. Konditionierte Medien wurden nach 120 Stunden gesammelt.

[0077] (C) Mitogene Aktivität, die als Einbau von $[3H]$ -Thymidin in *c-fos*(-/-)-Fibroblasten gemessen wurde. Zellen wurden mit konditionierten Medien inkubiert, die von stabilen *c-fos*(-/-)-Klonen, FH-10.2, FH-10.5, FH-9.3, FH-9.6, FH-10.9 genannt, und *c-fos*(-/-)-Zellen (mock), die exogenes FIGF unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, erhalten wurden. Konditionierte Medien wurden von den Zellen, die für 48 Stunden in 0,5% Serum kultiviert wurden, gesammelt.

[0078] (D) Mitogene Aktivität, die als Einbau von $[3H]$ -Thymidin in *c-fos*(-/-)-Fibroblasten gemessen wurde. Zellen wurden mit partiell renaturiertem rekombinantem FIGF inkubiert. Unter den gleichen Bedingungen induzierte die Inkubation mit PDGF-BB (Sigma), das als Positivkontrolle verwendet wurde, einen um etwa 30% höheren Thymidin-Einbau, während VEGF (Sigma) keinen Einbau über dem Hintergrund induziert. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert von sechs Experimenten, die mit zwei unterschiedlichen FIGF-Präparationen durchgeführt wurden.

[0079] (E) Mitogene Aktivität, die als Einbau von $[3H]$ -Thymidin in Mäuseembryofibroblasten gemessen wurde. Zellen wurden mit partiell renaturiertem rekombinantem FIGF inkubiert. MEF-Zellen wurden aus 13–15 Tage alten Embryos von B6D2F1-Mäusen erhalten. Die Embryos wurden getötet, ausgespült und für 30 Minuten bei 37°C thrypsinisiert. Die MEF-Zellen wurden 24 Stunden in 0,5% Serum enthaltendem Medium vor der Zugabe des Wachstumsfaktors gehalten. Unter den gleichen Bedingungen induziert die Inkubation mit PDGF-BB (Sigma), das als Positivkontrolle verwendet wurde, einen um etwa 30% höheren Thymidin-Einbau, während VEGF (Sigma) keinen Einbau über dem Hintergrund induziert. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert von sechs Experimenten, die mit zwei verschiedenen FIGF-Präparationen durchgeführt wurden. Die Hintergrundwerte wurden bei jedem Experiment subtrahiert.

Fig. 5

[0080] (A) Expression von FIGF in Kulturzellen. Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus: *c-fos*(-/-)-Fibroblasten (Spuren 1–3); einer aus *c-fos*(-/-)-Zellen erhaltenen Zelllinie, die exogenes *c-fos* exprimiert (Spuren 4–6), *c-fos*(+/+)-Fibroblas-

ten (Spuren 7–9). Zelluläre RNA wurde durch das Guanidiniumthiocyanat-Verfahren nach Inkubation von Zellen für 48 Stunden in 0,5% Serum (Zeitpunkt 0) extrahiert. Die Serumkonzentration wurde auf 10% erhöht und die Gesamt-RNA wurde nach 2 oder 4 Stunden, wie angegeben, gewonnen. Die Spuren 10 und 11 zeigen die FIGF-Expression in *c-fos*(-/-)-Fibroblasten, die transient mit dem Vektor allein (Mock) oder enthaltend *c-fos* unter dem konstitutiven FBJ-LTR-Promotor (*c-fos*) transfiziert waren. Die RNAs der transient transfizierten Zellen wurde 30 Stunden nach Kultivierung der Zellen in Medium, enthaltend 0,5% Serum, gewonnen. Jede Spur wurde mit 10 µg zellulärer Gesamt-RNA beladen.

[0081] (B) Expression von PDGF oder VEGF. Zelluläre Gesamt-RNA aus *c-fos*(-/-)-Zellen (Spuren 1–3) oder aus einer aus *c-fos*(-/-)-Zellen erhaltenen Zelllinie, die exogenes *c-fos* exprimiert (Spuren 4–6), wurde, wie im Teil A angegeben, extrahiert. Es wurde Glycerinaldehyd-phosphatdehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle für die RNA-Beladung verwendet.

Fig. 6

[0082] Northern-Analyse von Poly-A⁺-RNA, die aus unterschiedlichen Mäusegeweben extrahiert wurde.

Fig. 7

[0083] (A) Morphologie von Zellen ohne *c-fos*. Die Zellen wurden stabil mit dem Vektor allein transfiziert.

[0084] (B) Morphologie eines von Zellen ohne *c-fos* abgeleiteten Zellklons, der stabil mit dem Expressionsvektor transfiziert wurde, welcher FIGF unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielt.

[0085] (C) Morphologie von Zellen, die stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert waren, welcher die FIGF-cDNA in der Antisense-Orientierung unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielt.

[0086] (D) Morphologie von Zellen, die stabil mit dem Expressionsvektor transfiziert wurden, welcher *c-fos* unter der Kontrolle des FBJ-LTR-Promotors enthielt.

[0087] (E) Ein von den gleichen Zellen wie in D (*c-fos* konstitutiv exprimierend) abgeleiteter Zellklon, der mit einem Expressionsvektor transfiziert wurde, welcher FIGF unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt.

[0088] (F) Ein von den gleichen Zellen wie in D (*c-fos* konstitutiv exprimierend) abgeleiteter Zellklon, der mit einem Expressionsvektor transfiziert wurde, welcher die FIGF-cDNA in Antisense-Orientierung unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt.

[0089] (G) c-fos(-/-)-Fibroblasten, die für 120 Stunden in 0,5% Serum enthaltendem Medium kultiviert wurden.

[0090] (H) Zellen wie in G, die jedoch für 120 Stunden mit partiell renaturiertem rekombinantem FIGF behandelt wurden. Es wurden 10 unabhängige Klone, die aus 3 unabhängigen Transfektionen erhalten wurden, analysiert. Alle gezeigten morphologischen Veränderungen sind ähnlich denjenigen, die in der Figur beobachtet wurden.

BEISPIELE

Zellkultur und Isolierung von Klonen

[0091] Maus-Fibroblasten, die hinsichtlich der c-Fos-Expression (+/+) vom Wildtyp waren, und 3T3-Zelllinien ohne c-Fos (-/-) und eine stabil transgenierte Zelllinie, die exogenes c-Fos konstitutiv exprimiert, wurden wie beschrieben (Hu, et al., 1994) erzeugt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO₂ in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), ergänzt durch 10% fötales Kälberserum (FCS), Glutamin und Penicillin-Streptomycin, gehalten. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von etwa 70% Konfluenz kultiviert, unter Serummangel für 48 Stunden in DMEM, enthaltend 0,5% FCS, gehalten, und mit DMEM, enthaltend 10% FCS, für 0, 2 und 4 Stunden vor der RNA-Isolierung stimuliert. Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Guanidinium-Isothiocyant-Verfahrens isoliert. Ein mRNA-Differentialdisplay wurde, wie von Laing et al. beschrieben und modifiziert nach Bauer et al. (Bauer et al., 1993), durchgeführt. Kurz beschrieben, wurde aus der extrahierten RNA Kontaminationen chromosomaler DNA aus 50 µg der Gesamt-RNA durch Dnase-I-Behandlung entfernt. 0,2 µg RNA, die bei 2 oder 4 Stunden nach Seruminduktion extrahiert worden war, wurde zur reversen Transkription in einem Reaktionsvolumen von 40 µl unter Verwendung von dT₁₂mN-Primern und 300 U MMLV-reverse-Transkriptase (Promega Corp., Madison, WI) bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C verwendet. Das PCR-Gemisch für die cDNA-Amplifikation enthielt dT₁₂mN-Primer, einen der 20 10mer-Desoxyoligonukleotidprimer mit beliebiger Sequenz (Kit A – Operon Biotechnology Inc., Alameda, CA), ³³P-dATP (Amersham International plc, Buckinghamshire, England) und 1U Taq-Polymerase (Promega Corp.). Proben wurden 40 Amplifikationszyklen unter Verwendung eines PDC-100 Thermozyklisierungsgerätes (MJ Research Inc., Watertown, MA) unterworfen. Die Zyklenparameter waren wie folgt: 94°C für 30 Sekunden, 42°C für 90 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden und eine zusätzliche Extensionszeitspanne bei 72°C für 10 min. 2 µl des PCR-Gemischs wurden mit Glycerin auf 5% eingestellt und auf ein 6%-Polyacrylamid-Gel ohne Harnstoff geladen (Bauer et al., 1993). Die Banden der differenziell exprimierten cDNA wurden aus dem Gel

gewonnen und reamplifiziert. Reamplifizierte cDNA-Sonden wurden auf einem 1,5%-Agarosegel getrennt, gereinigt und in den pGEM-T-Vektor unter Verwendung des TA-Klonierungssystems (Promega Corp.) kloniert. Positive Klone wurden unter Verwendung des Blau-Weiß-Phänotyps selektiert.

Charakterisierung und Sequenzierung neuer Klone

[0092] Typischerweise konnten wir aus einer Bande 1 bis 3 unterschiedliche Klone erhalten, die wir zur sukzessiven Charakterisierung durch Northern-Blot-Analyse verwendeten. Die cDNA-Fragmente wurden mit ³²P-dCTP unter Verwendung eines Markierungskits mit Zufallsprimern (Amersham International plc) markiert. Hybridisierungssignale wurden gescreent und mit einem PhosphorImager unter Verwendung der Software Image Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) quantifiziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA von klonierten cDNA-Sonden mit entweder dem T7- oder dem SP6-Primer wurde manuell unter Verwendung des Sequenase V 2.0 Kits (US Biochemical Inc., Cleveland, Ohio) durchgeführt. Kurz beschrieben, wurde die aus den Zellen extrahierte RNA einer Amplifizierung unter Verwendung von Zufallsprimern unterworfen, und die Banden eines Zelltyps werden durch Vergleich identifiziert und isoliert. Die erhaltenen Fragmente wurden im Northern-Blot mit RNA aus den Zelllinien getestet, um zu bestätigen, dass die entsprechende mRNA in Fos-exprimierenden Zellen hochreguliert wird. Danach erzeugten wir unsere eigene cDNA-Bank in lambda-ZAP-Vektoren aus Mäusefibroblastenzelllinien, um die Klone mit vollständiger Länge zu erhalten, wobei ein cDNA-Synthese- und -Klonierungskit (Stratagene) verwendet wurde. Das Screening wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Positive Klone wurden zunächst durch Restriktionskartierung analysiert und die längsten wurden der DNA-Sequenz unterworfen.

Klon-Analyse

[0093] Die F0401-Sequenz ist in [Fig. 1](#) gezeigt, und die HF175-Sequenz ist in [Fig. 2](#) gezeigt: Eine einfache Suchanalyse in den NIH- und EMBL-Datenbanken ergab, dass F0401 und das humane Homologe FIGF neue Gene sind, und ihre Sequenzen sind ähnlich zu den Genen einer Familie von Wachstumsfaktoren, die durch das kennzeichnende Merkmal der Familie des Blutplättchenwachstumsfaktors (PDGF) charakterisiert ist. Das Konsensusmuster der Familie ist: C-V-x(3)-R-C-x-G-C-C-N.

[0094] Mitglieder dieser Familie bilden Dimere mit Disulfid-Verknüpfungen und sind wirksame Mitogene. Die zu F0401 und HF175 ähnlichste Sequenz ist der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der ein Homodimer bildet und ein in der Angiogenese und dem endothelialen Zellwachstum

wirksamer Wachstumsfaktor ist (Keck et al., 1989; Leung et al., 1989). Da VEGF ein Wachstumsfaktor ist, kann seine Überexpression zur Tumorangiogenese führen (Plate et al., 1993). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten weisen auf eine mögliche therapeutische Verwendung hin, die auf einer VEGF-Inhibition in Tumoren (Kim et al., 1993) und auf einer VEGF-Behandlung zur Stimulierung der Angiogenese (Takeshita et al., 1994) beruht.

[0095] Die folgenden Experimente wurden unter Verwendung von F0401 durchgeführt.

[0096] Die vorhergesagte Proteinsequenz von FIGF weist eine hydrophobe Sequenz am N-Terminus auf, die für ein Signalpeptid codieren könnte. Diese lange N-terminale Region zeigt keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen. Es liegt jedoch eine positiv geladene Domäne in dieser Region vor, welche die Bindung des Proteins an die Zellmembran oder an die extrazelluläre Matrix erlauben könnte.

[0097] Um zu überprüfen, ob FIGF ein sezerniertes Protein ist, transfizierten wir COS-7-Zellen mit einem Expressionsvektor, der die FIGF-cDNA unter der Kontrolle des Promotors der sofortigen frühen Gene des Cytomegalie-Virus (CMV) enthielt. Polyklonale Antikörper, die (wie zuvor beschrieben) gegen rekombinantes FIGF erzeugt wurden, immunpräzipitierten eine spezifische Bande, die sowohl in den Zelllysaten als auch den konditionierten Medien der mit FIGF transfizierten COS-7-Zellen beobachtet wird (**Fig. 4A**). Nach 1 Stunde Markierung, gefolgt von 1 Stunde der Verfolgung, lag hauptsächlich eine spezifische Bande im Zelllysate vor, während sich nach einer Verfolgung von mehr als 4 Stunden das Protein im Zellüberstand ansammelte. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen aggregierte FIGF in einer multimeren Form. Die Zugabe von b-Mercaptoethanol resultierte in einer partiellen Denaturierung des Proteins, das hauptsächlich als eine Bande von 66 kDa lief, und nur eine geringe Fraktion des Proteins wird als Monomer mit der erwarteten molekularen Masse von 33 kDa gefunden (**Fig. 4A**). Diese Ergebnisse zeigen, dass FIGF ein sezerniertes Protein ist und Dimere bilden kann. Die Dimerisierung von FIGF konnte vorhergesagt werden, da die zentrale Domäne von FIGF hoch konserviert ist und die an der Dimerisierung von sowohl PDGF als auch VEGF beteiligten Cystein-Reste enthält. Es wurde weiter untersucht, ob das konditionierte Medium von FIGF-produzierenden Zellen das Zellwachstum in vitro fördern konnte, was durch einen Einbau von $[3H]$ -Thymidin getestet wurde (Vaziri et al. (1995)). Konditioniertes Medium wurde entweder von transient transfizierten COS-7-Zellen oder von von c-fos(-/-)-Fibroblasten abgeleiteten Zellklonen, die FIGF unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, erhalten. Die mitogene Aktivität des FIGF enthaltenden Mediums wurde bei c-fos(-/-)-Fibro-

blasten getestet. Konditioniertes Medium sowohl von transfizierten COS-7- (**Fig. 4B**) als auch von stabilen Fibroblasten-Klonen, die FIGF überexprimieren (**Fig. 4C**), induziert eine DNA-Synthese in c-fos(-/-)-Fibroblasten. Da in Säugerzellen die FIGF-Expression die Aktivierung anderer Wachstumsfaktoren induzieren könnte, was wiederum für den gemessenen $[3H]$ -Thymidin-Einbau verantwortlich wäre, testeten wir die mitogene Aktivität eines in *E. coli* exprimierten rekombinanten FIGF-Proteins (wie zuvor beschrieben). Um ein biologisch wirksames rekombinantes Protein zu erhalten, wurde das aus *E. coli* gereinigte FIGF-Protein in Gegenwart eines Gemischs von reduziertem und oxidiertem Glutathion partiell renaturiert. Das gereinigte rekombinante Protein wurde auf 0,4 mg/ml eingestellt und vollständig in Gegenwart von 8 M Harnstoff, 2% b-Mercaptoethanol für 1 Stunde bei 370°C reduziert. Das reduzierte Protein wurde gegen eine Lösung, enthaltend 50 mM Tris-Cl pH 8, 0, 1 M Harnstoff, 5 mM reduziertes Glutathion und 0, 5 mM oxidiertes Glutathion, für 2 Tage und gegen eine Lösung, enthaltend 20 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,7 M NaCl für 1 Tag, wie von Hoppe et al., *Biochemistry*, 28, Seiten 2956–2960 (1989); Hoppe et al., *Eur. J. Biochem.*, 187, Seiten 207–214 (1990), beschrieben, dialysiert. Das partiell rückgefaltete rekombinante FIGF induzierte eine DNA-Synthese bei c-fos(-/-)-Fibroblasten in einer dosisabhängigen Weise (**Fig. 4D**). Wie erwartet, reagierten auch c-fos(-/-)-Zellen auf PDGF-BB, während die Behandlung mit VEGF keinen Einbau von $[3H]$ -Thymidin in diesen Zellen induzierte. Die höchste Aktivität der DNA-Synthese wurde mit 2 μ g gereinigtem FIGF erhalten. Die beobachtete scheinbar geringe spezifische Aktivität des rekombinanten FIGF ist sehr wahrscheinlich auf die geringe Effizienz hinsichtlich der korrekten Rückfaltung von FIGF zurückzuführen, da FIGF 29 Cystein-Reste innerhalb von 358 Aminosäuren enthält. Wir testeten ebenfalls die mitogene Aktivität des rekombinanten FIGF bei embryonalen Mausfibroblasten (MEF). FIGF induzierte eine DNA-Synthese bei embryonalen Mausfibroblasten in einer dosisabhängigen Weise (**Fig. 4E**). Die FIGF-cDNA wurde durch differentielles Screening aus RNA von Zellen isoliert, die sich nur durch die Expression von c-fos unterschieden. Die Analyse der FIGF-Genexpression mittels Northern-Blot ergibt, dass die FIGF-mRNA in c-fos(-/-)-Fibroblasten kaum detektierbar ist, während ihre Expression in c-fos(+/-)-Fibroblasten vom Wildtyp hoch ist (**Fig. 5A**, vergleiche Spuren 1–3 mit den Spuren 7–9). Die FIGF-Expression wird in von c-fos(-/-)-Zellen abgeleiteten stabilen Klonen, die exogenes c-fos unter der Kontrolle des konstitutiven FBJ-LTR-Promotors exprimieren (Hu et al., (1994)), vollständig wiederhergestellt (**Fig. 5A**, vergleiche Spuren 1–3 mit den Spuren 4–6). Die transiente Transfektion mit exogenem c-fos resultiert in einer FIGF-Induktion in c-fos(-/-)-Zellen, obwohl aufgrund der geringen Anzahl transfizierter Zellen die beobachtete Induktion

weniger ausgeprägt ist (**Fig. 5A**, Spuren 10 und 11). Somit ist die FIGF-Expression von c-fos abhängig. Darüber hinaus wird FIGF nicht durch das AP-1-homologe GCN4 der Hefe induziert. In Säugerzellen ist GCN4 dazu befähigt, die meisten AP-1-Zielgene zu aktivieren, jedoch ist es nicht onkogen. In Wildtyp-Fibroblasten ist c-fos das wesentliche Fos-Protein, das mit c-Jun oder Jun B innerhalb der ersten Stunde nach Seruminduktion assoziiert ist. Danach ist c-Fos nicht mehr länger detektierbar und es wird durch FraJ1 und FraJ2 im AP-1-Komplex ersetzt. In c-fos-exprimierenden Zellen wird FIGF stark exprimiert, wenn die Zellen unter Bedingungen mit wenig Serum gehalten werden, und es sinkt auf nicht-detektierbare Spiegel innerhalb sechs Stunden nach Seruminduktion ab (**Fig. 5A**). Dieses Muster der FIGF-Expression kann sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in Zellen beobachtet werden, die c-fos konstitutiv exprimieren (**Fig. 5A**). Daher beobachten wir eine Diskrepanz zwischen der erwarteten Spitze der c-fos-Expression und dem Auftauchen von FIGF, dessen mRNA sich in der untätigen Phase anhäuft. Das FIGF-Regulationsmuster legt nahe, dass neben der Expression von c-fos zusätzliche regulatorische Steuerungen für seine Aktivierung erforderlich sind. Obwohl FIGF der PDGF/VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren angehört, ist seine Expression zu denjenigen Genen am ähnlichsten, die für die Hinderung an der Zellteilung spezifisch sind (engl. „growth arrest specific genes“, gas). Interessanterweise wirkt eines von diesen, gas6, als Wachstumsfaktor. Sowohl der PDGF- als auch der VEGF-Wachstumsfaktor sind an der Tumorbildung beteiligt (Kim et al., (1993)). Darüber hinaus ist PDGF das Hauptserummitogen, das die Transkriptionsaktivierung von c-fos induziert. Um das Muster der Expression dieser Wachstumsfaktoren mit demjenigen von FIGF zu vergleichen, haben wir die mRNA-Spiegel von PDGF und VEGF in Fibroblasten gemessen, die sich hinsichtlich der c-fos-Expression unterscheiden. Wie in der **Fig. 5B** zu sehen ist, unterscheidet sich die Regulation der mRNA sowohl von PDGF als auch von VEGF von derjenigen von FIGF. Diese Wachstumsfaktoren werden nach der Seruminduktion schnell induziert, und ihre Expression ist von c-fos unabhängig. Die Tumorphorprogression ist durch morphologische Veränderungen des Tumors gekennzeichnet, was zum Verlust der mutierten Zellen hinsichtlich ihrer Adhäsion mit den ursprünglichen Nachbarn und einer Ablösung aus dem Ursprungsgewebe führt. c-fos wurde mit der Tumorphorprogression in Zusammenhang gebracht und seine Überexpression induziert eine transformierte Zellmorphologie in Fibroblasten und epithelialen Zellen. Da FIGF ein c-fos-abhängiger Wachstumsfaktor ist, wurde analysiert, ob seine Überexpression eine morphologische Transformation von Fibroblasten induzieren könnte. Wie in **Fig. 7** zu sehen ist, induziert die konstitutive Expression von FIGF in Fibroblasten einen transformierten Phänotyp. Von c-fos(-/-)-Zellen abgeleitete stabile Klone, die FIGF konstitutiv expri-

mieren, nehmen eine spindelförmige Morphologie an, werden lichtbrechender und lösen sich von der Platte ab (**Fig. 7, B** versus A). Im Gegensatz dazu nehmen stabile Klone, welche die FIGF-Antisense-mRNA exprimieren, einen flachen und weniger lichtbrechenden Phänotyp an (**Fig. 7C**), der mit dem Phänotyp von c-fos(-/-)-Zellen, die unter Bedingungen von wenig Serum gehalten werden (**Fig. 7G**), am ähnlichsten ist. Die Überexpression von c-fos verändert die Morphologie von c-fos(-/-)-Zellen ähnlich zu derjenigen, die bei der Überexpression von FIGF beobachtet wird, obwohl der Phänotyp weniger ausgeprägt ist (**Fig. 7D**). Die Überexpression von sowohl c-fos als auch FIGF führt zu einem extremen Phänotyp in Fibroblasten: Die Zellen werden länger, unorganisiert und verlieren ihre Kontakte (**Fig. 7E**). Die Expression der FIGF-Antisense-mRNA in Zellen, die c-fos konstitutiv exprimieren, induziert eine Umkehrung des transformierten Phänotyps (**Fig. 7F**). Somit verlieren Zellen, die c-fos exprimieren, jedoch in Bezug auf FIGF verarmt sind, das meiste des transformierten Phänotyps, was nahelegt, dass die in c-fos konstitutiv exprimierenden Zellen beobachtete Morphologie auf FIGF zurückzuführen ist. Ähnliche morphologische Veränderungen werden ebenfalls durch eine Zellbehandlung mit gereinigtem rekombinantem FIGF beobachtet. c-fos(-/-)-Fibroblasten, die für 120 Stunden in Medium, das 0,5% Serum enthält, gehalten werden, hören auf zu wachsen, werden großflächig und weniger lichtbrechend (**Fig. 7G**). Eine Zellbehandlung mit rekombinantem FIGF induziert einen lichtbrechenden, elongierten und nicht-adhären Phänotyp (**Fig. 7H**).

[0098] Von Zellen mit fehlerhaftem c-fos abgeleitete Tumoren können keine maligne Progression durchmachen, selbst wenn sie das aktivierte v-H-Ras aufweisen. Somit ist die Expression von c-fos für die Aktivierung von Zielgenen essentiell, die für den malignen Phänotyp verantwortlich sind. FIGF ist ein c-fos-abhängiger autokriner Wachstumsfaktor, der dazu befähigt ist, den Eintritt in die Zellteilung, und, wenn es überexprimiert wird, einen transformierten Phänotyp in Fibroblasten zu induzieren. Die Daten legen nahe, dass die Rolle von c-fos in der Aktivierung des malignen Phänotyps auf die Aktivierung von FIGF zurückzuführen ist.

[0099] Weitere Experimente in Bezug auf FIGF unter Verwendung einer für FIGF spezifischen Sonde in einer Northern-Analyse mit aus Mausegeweben gewonnener RNA zeigen, dass das FIGF-Gen nur in Fos-exprimierenden Zellen und wenig in Zellen exprimiert wird, welche das Fos-Onkogen nicht aufweisen (**Fig. 5**). Der in dem Northern-Test verwendete RNA-Blot wurde von Clontec erhalten. Die Analyse seiner Expression in den Mausegeweben zeigt, dass FIGF hauptsächlich in der Lunge exprimiert wird (**Fig. 6**) und bereits am Tag 7 der Embryonalentwicklung der Maus vorhanden ist (nicht gezeigt).

[0100] FIGF ist daher ein mit dem Wachstumsfaktor VEGF verwandtes Molekül, das durch das Onkogen Fos positiv reguliert wird. Es kann mit Tumoren und mit der Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden.

Literatur

1. Angel et al., (1988), Cell 55, Seiten 875–885
2. Angel und Karin, (1991), Biochim. Biophys. Acta, 1072, Seiten 129–57
3. Bauer et al., (1993), NAR, 21, Seiten 4272–4280
4. Bergens et al., (1994), EMBO J., 13, Seiten 1176–1188
5. Brenner et al., (1989), Nature, 337, Seiten 661–663
6. Cantor et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, Seiten 10932–10936
7. Curren et al., (1983), Mol. Cell, Biol., 3, Seiten 914–921
8. Distel et al., (1987), Cell, 49, Seiten 835–844
9. Farrar et al., (1989), Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 5, Seiten 229–261
10. Ferrero et al., (1995), Human Molecular Genetics, 4, Seiten 1821–1827
11. Gius et al., (1990), Mol. Cell. Biol., 10, Seiten 4243–4255
12. Gurney et al., (1992), J. Biol. Chem., 267, Seiten 18133–18139
13. Hasty et al., (1990), Arthritis Rheum., 33, Seiten 388–397
14. Hay et al., (1989), Genes Dev., 3, Seiten 293–303
15. Heuertz et al., (1993), Genomics, 18, Seiten 100–104
16. Holt et al., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, Seiten 4794–4798
17. Hu et al., (1994), EMBO J., 13, Seiten 3094–3103
18. Keck et al., (1989), Science, 246, Seiten 1309–1311
19. Kerr et al., (1988), Science, 242, Seiten 1424–1427
20. Kim et al., (1993), Nature, 362, Seiten 841–844
21. Kovary & Bravo, (1991), Mol. Cell. Biol., 11, Seiten 2451–2459
22. Kovary & Bravo, (1991), Mol. Cell. Biol., 11, Seiten 4466–4472
23. Leung et al., (1989), Science, 246, Seiten 1306–1309
24. Liang et al., (1993), NAR, 21, Seiten 3269–3275
25. Liotta und Stetler, (1990), Semin. Cancer Biol., 1, Seiten 99–106
26. Lord et al., (1993), Mol. Cell. Biol., 13, Seiten 841–851
27. Miller et al., (1984), Cell, 36, Seiten 51–60
28. Plate et al., (1993), Cancer Research, 53, Seiten 5822–5827
29. Riabowol et al., (1988), Mol. Cell. Biol., 8, Seiten 1670–1676
30. Rollins et al., (1988), Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 85, Seiten 3738–3742
31. Ruther et al., (1989), Oncogene, 4, Seiten 861–865
32. Sambrook et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
33. Sassone et al., (1988), Nature, 334, Seiten 314–319
34. Schonthal et al., (1988), Cell, 54, Seiten 325–334
35. Schusled et al., (1995), Brain Res., 670, Seiten 14–28
36. Seed & Aruffo, (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, Seiten 3365–3369
37. Superti-Furga et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, Seiten 5114–5118
38. Takeshita et al., (1994), J. Clin. Invest., 93, Seiten 662–670
39. Tsunoda et al., (1994), Anti-cancer Res., 14, Seiten 2637–2642
40. Vaziri et al., (1995), Mol. Cell. Biol. 15, Seiten 1244–1253
41. Woessner und Gurja, (1991), J. Rheumatol., Erg. 27, Seiten 99–101
42. EP-A-0120693
43. EP-A-0125023

Patentansprüche

1. Nukleotidmolekül mit mindestens 80% zu der zwischen Nt. 283 und Nt. 1356 der [Fig. 1](#) angegebenen Nukleotidsequenz, wobei das Nukleotidmolekül ein Protein mit mitogener Aktivität codiert, oder ein Fragment dieses Nukleotidmoleküls, wobei das Fragment ein Protein mit mitogener Aktivität codiert.
2. Nukleotidmolekül mit mindestens 80% Homologie zu der zwischen Nt. 242 und Nt. 1303 der [Fig. 2](#) angegebenen Nukleotidsequenz, wobei das Nukleotidmolekül ein Protein mit mitogener Aktivität codiert, oder ein Fragment dieses Nukleotidmoleküls, wobei das Fragment ein Protein mit mitogener Aktivität codiert.
3. Protein, das durch das Nukleotidmolekül oder ein Fragment des Nukleotidmoleküls nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 codiert wird.
4. Vektor zur Expression des Nukleotidmoleküls nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, umfassend einen Promotor und das Nukleotidmolekül.
5. Wirtszelle, die mit dem Vektor nach Anspruch 4 transformiert ist.
6. Wirtszelle nach Anspruch 5, die eine Chinesischer-Hamster-Ovarien-Zelle ist.
7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 5 oder Anspruch 6 unter Bedingungen, die zur Produktion des Proteins führen, und Ge-

winnen des Proteins.

8. Nukleotidmolekül nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 zur Verwendung in der Therapie.

9. Verwendung des Nukleotidmoleküls nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Behandlung von Entwicklungsstörungen.

10. Verwendung des Proteins nach Anspruch 3 zur Identifizierung des Rezeptors für das Protein.

11. Verwendung des Proteins nach Anspruch 3 in einem Test zur Identifizierung von Antagonisten oder Agonisten des Proteins.

12. Verwendung des Nukleotidmoleküls nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, des Proteins nach Anspruch 3 zur In-vitro-Diagnose eines pathologischen Zustands oder einer Prädisposition für eine Erkrankung.

13. Verwendung der Nukleotidsequenz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 zur Erzeugung eines nicht-humanen transgenen Tieres.

Es folgen 31 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

10 30 50
ggaagatatgaccacctoctgattattttgcagcgggaaactttgaaatattttctatt . .

70 90 110
gctttctccataactaagaattgtgtgagcagtgaggagtccttgacttactcaag . .

130 150 170
tcattcatggattttaattacaactgatcatgtgattgttttttccatgtaaagttt . .

190 210 230
ggggctcaactttgctctggagaaatgccttttgcaacacttttcagtagctgcctgg . .

250 270 290
aaacaactgcttagtcatcggtagacatttaaaatatcaaaatgtatggagaatgggga . .

M Y G E W G

FIG. 1 (I)

310
 atgggaatacctcatgatgtccatgtgtacttggtgcagggttcaggagcgaacat
 M G N I L M F H V Y L V Q G F R S E H
 330 350

370
 ggaccagtgaaggattttcttttgagcgatcaccgggtccatggttggaacgatctgaa
 G P V K D F S F E R S S R S M L E R S E
 390 410

430
 caacagatccgagcagcttctagttaggaggtgctgcaaatcgcgcaactctgaggac
 Q Q I R A A S S L E E L L Q I A H S E D
 450 470

FIG. 1 (II)

```

490      .        .        .        .        .        .        .        .        .        .
      . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
      tggaagctgtggcgtgccgggttgaggctcaaaagtcttgccagtagtgactcaccgctca
      W K L W R C R L K L K S L A S M D S R S
530

550      .        .        .        .        .        .        .        .        .        .
      . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
      gcatccatcgctccaccagatttgcggcaactttctatgacactgaaacactaaaagt
      A S H R S T R F A A T F Y D T E T L K V
590

610      .        .        .        .        .        .        .        .        .        .
      . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
      atagatgaagaatggcagagaccatgtagcagccctagagagacatgtagatgtagcagcc
      I D E E W Q R T Q C S P R E T C V E V A
650

670      .        .        .        .        .        .        .        .        .        .
      . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
      agtgagctggggaagacaaccaacacattcttcaagccccctgtgtaaatgtcttccgg
      S E L G K T T N T F F K P P C V N V F F R

```


FIG. 1 (III)

730 750 770

 tgtggaggctgctgcaacgaagagggtgtgatgtgtatgaacacaagcacctcctacatc
 C G C C N E E G V M C M N T S T S Y I

790 810 830

 tccaacagctcttgagatatcagtgccctctgacatcagtgcccggagttagtcctgtt
 S K Q L F E I S V P L T S V P E L V P V
 850 870 890

.
 aaaattgccaaaccatacgggttgtaagtgtgcccacggggccccgccatccttactca
 K I A N H T G C K C L P T G P R H P Y S
 910 930 950

.
 attatcagaagatccattcagaccccagaagaagatgaatgtcctcattccaagaactc
 I I R R S I Q T P E E D E C P H S K K L
 970 990 1010

.
 tgtcctattgacatgctgtgggataaacacccaatgtaaatgtgttttgcaagacgagact
 C P I D M L W D N T K C K C V L Q D E T

FIG. 1 (IV)

1030 1070
 1050
 ccactgcctgggacagaagaccactcttacctccaggaaccactctctgtggaccgcac
 P L P G T E D H S Y L Q E P T L C G P H

 1090 1130
 1110
 atgacgtttgatgaagatcgctgtgagtgcgctgtgtaagcaccatgtccgggagatctc
 M T F D E D R C E C V C K A P C P G D L
 1150 1190
 1170
 attcagcaccggaaactgcagttgctttgagtgcaaaagaagtctggagagctgctgc
 I Q H P E N C S C F E C K E S L E S C C
 1210 1250
 1230
 caaagcacaagattttcaccagacacctgcagctgtgaggacagatgtccttttcac
 Q K H K I F H P D T C S C E D R C P F H
 1270 1310
 1290
 accagaacatgtgcaagtagaaagccagcctgtggaaagcactggcgctttccaaggag
 T R T C A S R K P A C G K H W R F P K E

FIG. 1 (V)

```

1330      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
acaagggccaggactctacagccaggagaacccttgattcaacttccttcaagtccc
T  R  A  Q  G  L  Y  S  Q  E  N  P
1350      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1370      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1390      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
cccatctgtcatTTtaaacagctcactgctTTgtcaagttgctgtcactgttgcccac
1410      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1430      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1450      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
taccctgccccccccctccccccaggtgtagaaaagttgatttgacctagtgt
1470      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1490      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1510      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
catggtaaagccacatttccatgcaatggcggctaggtagtcccagttcactgacaaa
1530      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1550      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1570      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1590      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
1610      .           .           .           .           .           .           .           .           .           .
tgactttagcttcagatgtctttgcgccatcagcactcagaaaggaaggggtctgagga

```

FIG. 1 (VI)

```

1630 . . . . . 1650 . . . . . 1670 . . . . .
      gcccttgtttgatgaa taagaaagg ttgcctgaaacagagtagtagtgccactcga
1690 . . . . . 1710 . . . . . 1730 . . . . .
      ttggttcctcgggctggcaag tccaagg caatgctcatgagtta ttgtgcttcttct
1750 . . . . . 1770 . . . . . 1790 . . . . .
      tatgcggaatttcat ttgtatgatcagcactgatcaattcccat tccacttgactttt
1810 . . . . . 1830 . . . . . 1850 . . . . .
      aggttactgaagcactg cctgatgttt tataatgtataatgtattaaaggaaataaacac
1870 . . . . . 1890 . . . . .
      tgttatgcagcccacaaaa aaaaaaa aaaaaaa

```

FIG. 2

```

GGCACGAGGTTTTTTTTTTTTTTCATCTCTCTCCCCACCCCTAAGATTGTGCAA 60
CCGTCCAAAATAAAAAAAAAAGTAGAGAGAGGGGTGGGATTTCTAACACGTTT
G T R F F F F F I S L S P P L R L C K -
A R G F F F F S S L S P H P * D C A K -
H E V F F F F H L S L P T P K I V Q K -
AAAAGCGTACCTTGCCCTAATTGAAATAATTTCATTTGGATTTGATCAGAACTGATATT 120
TTTTCCGATGGAACGGATTAACTTTATTAAGTAACCTAAACTAGTCTTGACTAATAAA
K S V P C L I E I I S L D F D Q N * L F -
K A Y L A * L K * F H W I L I R T D Y L -
K R T L P N * N N F I G F * S E L I I W -
GGTTTCTGTGTGAGTTTGTAGGTTTCAAACTTCTTCTGGAGAATGCCTTTGGAAAC 180
CCAAAAGACACTTCAAACTCCAAAGTTTGAAAGGAAGACCTTCTACGGAAAACCTTGG

```

FIG. 2 (I)

```

G F L C E V L R F Q T F L L E N A F * N -
V F C V K F * G F K L S F W R M P F E T -
F S V * S F E V S N F P S G E C L L K Q -
AAATTTCTAGCTGCCGTGATGTCAACTGCTTAGTAATCAGTGGATATTGAAATATCAA + 240
TAAAGAGATCGACGGACTACAGTTGACGGAATCATTAGTCACCTATACTTTATAAGTT

N F L * L P D V N C L V I S G Y * N I Q -
I F S S C L M S T A * * S V D E E I F K -
F S L A A * C Q L L S N Q W I L K Y S K -
AATGACAGAGTGGTAGTGGTGAATGTTTTCATGATGTTGTACGTCACGCTGGTGCA + 300
TTACATGTCCTCACCCATCACCACTTACAATAAGTACTACAACATGCAGGTCGACCACGCT

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

```

FIG. 2 (II)

301 GGGCTCCAGTAAATGAACATGGACCAGTGAAGCCATCTCAGTCCACATTTGGAACGATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CCCGAGGTCACTTACTTGTACTGGTCACTTGGTCACTTCCGCTAGTAGAGTCAGGTGTAACCTTGCTAG

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

 251 TGAACAGCAGATCAGGGCTGCTTCTAGTTGGAGGAACTACTTTCGAATTACTCACTCTGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 ACTTGTCTAGTCCCGACGAGATCAAAACCTCCTTGATGAAGCTTAATGAGTGAGACT

 * T A D Q G C F * F G G T T S N Y S L * -
 E Q Q I R A A S S L E E L L R T T H S E -
 N S R S G L L V W R N Y F E L L T L R -

 GGACTGGAAGCTGTGGAGATGCAGGCTGAGGCTCAAAGTTTACCAGTATGGACTCTCG

FIG. 2 (III)

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTGACCTTCGACACCTCTACGTCGACTCCGAGTTTCAAAAATGGTCAATACCTGAGAGC
L E A V E M Q A E A Q K F Y Q Y G L S -
D W K L W R C R L R L K S F T S M D S R -
T G S C G D A G * G S K V L P V W T L A -
CTCAGCATCCCATCGGTCCTAGGTTTGGGCAACTTCTATGACATGAAACACTAAA 540
GAGTCGTAGGTTAGCCAGGTGATCCAAACGCCGTTGAAAGATACGTAACTTTGTGATTT
L S I P S V H * V C G N F L * H * N T K -
S A S H R S T R F A A T F V D I E T L K -
Q H P I G P L G L R Q L S M T L K H * K -
AGTTATAGATGAAGAATGGCAAGAACTCAGTGCAGCCCTAGAGAAACGTGCGTGAGGT 600
TCAATATCTACTTCTTACCGTTTCTTGAGTCACGTGCGGATCTCTTTCACGACCTCCA
S Y R * R M A K N S V Q P * R N V R G G -
V I D E E W Q R T Q C S P R E T C V E V -
L * M K N G K E L S A A L E K R A W R W -

FIG. 2 (IV)

601 GGCAGTGAGCTGGGAAGAGTACCAACACATTCCTCAAGCCCCCTGTGTGAACGTGTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGTCACCTCGACCCCTTCATGGTTGTAAAGAAGTTCGGGGGAACACACTTGCCAAA
 660
 G Q * A G E E Y Q H I L Q A P L C E R V -
 A S E L G K S T N T F F K P P C V N V E -
 P V S W G R V P T H S S S P L V * T C S -
 CCGATGTGGTGGTGTGCAATGAAGAGAGCtTTATgTGATGAACACCAGCACCTCGTA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 661 GGCTACACCACCaaCAACGGTACTTCTCTCGaaATACACATACTGTGGTGGAGCAT
 720
 P M W W L L Q * R E L Y V Y E H Q H L V -
 R C G G C C N E E S F M C M N T S T S Y -
 D V V V V A M K R A L C V * T P A P R T -
 CATTCCAACAGCTCTTGAGATATCAGTGCCCTTTGACATCAGTACCCTGAATTAGTGCC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 721 GTAAGGTTTTCGAGAAACTCTATAGTCACGGAAACTGTAGTCATGGACTTAATCACGG
 780
 H F Q T A L * D I S A F D I S T * I S A -
 I S K Q L F E I S V P L T S V P E L V P -
 F P N S S L R Y Q C L * H Q Y L N * C L -

FIG. 2 (V)

781 TGTTAAAGTTGCCAATCATACAGGTTGTAAGTCTTGCCAACAGCCCCCGCCATCCATA + 840
 ACAATTCAACGGTTAGTATGTCCAAACATTCACGAACGGTTGTCGGGGGGGGTAGGTAT

C * S C Q S Y R L * V L A N S P P P S I -
 V K V A N H T G C K C L P T A P R H P Y -
 L K L P I I Q V V S A C Q Q P P A I H T -

841 CTC AATTATCAGAAGATCCAGATCCCTGAAGAAGATCGTGTCCCATTC AAGAA + 900
 GAGTTAATAGTCTTAGGTAGGCTTAGGGACTTCTTAGCGCACAGGTAAGGTTCTT

L N Y Q K I H P D P * R R S L F P F Q E -
 S I I R R S I Q I P E E D R C S H S K K -
 Q L S E D P S R S L K K I A V P I P R N -

ACTCTGCTATTGACATGCTATGGGATACCAACAATGTAATGTGTTTGCAGGAGGA

FIG. 2 (VI)

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

TGAGACAGGATAACTGTACGATACCCATCGTTGTTTACATTTACACAAAACGTCCTCCT

T L S Y * H A M G * Q Q M * M C F A G G - -

L C P I D M L W D S N K C K C V L Q E E

S V L L T C Y G I A T N V N V F C R R K - -

AAATCCACTTGCTGGAACAGAGACCACTCTCATCTCCAGGAACCAGCTCTGTGGGCC

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

TTTAGGTGAACGACCTTGCTCTCTGGTGAGAGTAGAGGTCCCTTGGTCCGAGAGACACCCGG

K S T C W N R R P L S S P G T S S L W A - -

N P L A G T E D H S H L Q E P A L C G P

I H L L E Q K T T L I S R N Q L S V G H - -

ACACATGATGTTGACGAAGATCGTTGCGAGTGTCTGTGTAATAACACCATGTCCCAAAGA

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

TGTGTACTACAAACTGCTTCTAGCAACGCTCACACAGACATTTTGGTACAGGGTTTCT

T H D V * R R S L R V C L * N T M S Q R - -

D M M E D E D R C E C V C K T P C P K D

T * C L T K I V A S V S V K H H V P K I - -

FIG. 2 (VII)

1081 TCTAATCCAGCACCCAAAACATGCAGTTGCTTTGAGTGCAAGAAGTCTGGAGACCTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 AGATTAGGTCGTGGGTTTGTGACGTCAACGAAACTCACGTTTCTTTCAGACCTCTGGAC

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

1141 CTGCCAGAAGCACAGCTATTTACCCAGACACCTGCAGCTGTGAGGACAGATGCCCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 GACGGTCTTCGTTCGATAAAGTGGTCTGTGGACGTCGACACTCCTGTCTACGGGAA

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

1201 TCATACCAGACCATGTGCAAGTGGCAAAACAGCATGTGCAAGAAGCATTGCCGCTTCCAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 AGTATGGTCTGGTACACGTTTACCCTTTGTCGTACACGTTTTCGTAACGGCGAAAGGTTT

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

FIG. 2 (VIII)

1261 GGAAAAGGGCTGCCAGGGCCACAGCCGAAAGAATCCT**TGAT**TCAGCGTTCCAAG + 1320
 CCTCTTTCCCGACGGTCCCGGGTGTGGCTTCTTAGGAAC**TAA**GTGCGCAAGGTTCC
 G E K G C P G A P Q P K E S L I Q R S K -
E K R A A Q G P H S R K N P * F S V P S -
 R K G L P R G P T A E R I L D S A F Q V -
 1321 TTCCCATCCCTGTCA**TTT**TAAACAGCATGCTGCTT**TG**CC**AA**GTGCTGCTGCTGTTT
 AAGGGTAGGGACAGTAA**AAA**ATTGCTCGTACGACGAAACGGTTCAACGACAGTGACAA**AAA** + 1380
 F P I P V I F N S M L L C Q V A V T V F -
 S P S L S F L T A C C F A K L L S L F F -
 P H P C H F * Q H A A L P S C C H C F F -
 TTCCAGGTGTTAA**AAAA**AAATCCATTTTACACAGCAC**CA**CGTGAATCCAGACCA**ACC**

FIG. 2 (IX)

```

1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      AAGGGTCCACAATTTTTTTTAGGTAATAATGTGTCGGTGTCACTTAGGTCCTGGTTGG
      F P G V K K K I H F T Q H H S E S R P T -
      S Q V L K K K S I L H S T V N P D Q P -
      P R C * K K N P F Y T A P Q * I Q T N L -

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      TTCCATTCACACCAGCTAAGGAGTCCCTGGTTCATGATGGATGTCCTTAGCTGCAGAT
      AAGGTAAGTGTGTCGATTCCCTCAGGGACCAAGTAACCTACAGAAAGATCGACGCTCA
      F H S H Q L R S P W F I D G C L L A A D -
      S I H T S * G V P G S L M D V F * L Q M -
      P F T P A K E S L V H * W M S S S C R C -

1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
      GCCCTCGCCACCAAGGAATGGAGAGGGGACCCATGTAATCCTTTTGTAGTTTIG
      CGGAGACGGTGTTCCTTACCTCCTCCCTGGGTACATTAGGAAACAATCAAAAC
      A S A H Q G M E R R G P M * S F C L V L -
      P L R T K E W R G G D P C N P F V * F C -
      L C A P R N G E G T H V I L L F S F V -

```

FIG. 2 (X)

```

1561 TTTTGTGTTTGGTGAATGAGAAAGGTGTGCTGGTCAATGGAATGGCAGGTGTCATATGA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
AAAAACA AAAACCCTACTCTTCCACACGACCAGTACCTTACCCTCCACAGTATACT

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

1621 CTGATTACTCAGAGCAGATGAGGAAACTGTAGTCTCTGAGTCCCTTTCCTAATCCCAACT
-----+-----+-----+-----+ 1680
GACTAATGAGTCTCGTCTACTCCTTTTGACATCAGAGACTCAGGAACGATTAGCGTTGA

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

1681 CTTGTGAATTATCTGATTCCTTTTATGCAGAAATTGATTCGTATGATCAGTACTGACT
-----+-----+-----+-----+ 1740
GAACACTTAATAAGACTAAGAAAAAATACGCTTAAACTAAGCATACTAGTCACTGACTGA

L V N Y S D S F L C R I * F V * S V L T -
L * I I L I L F Y A E F D S Y D Q Y * L -
C E L F * F F F M Q N L I R M I S T D F -

```

FIG. 2 (XI)

1741 TTCTGATTACTGTCCAGCTTATAGTCTTCCAGTTTAATGAACCTACCATCTGATGTTTCAT +-----+-----+-----+-----+-----+ 1800

AAGACTAATGACAGGTCGAAATATCAGAAGGTCAAATTACTTGGTAGCTACAAAGTA

F * L L S S L * S S S L M N Y H L M F H -
S D Y C P A Y S L P V * * T T I * C F I -
L I T V Q L I V F Q F N E L P S D V S Y -

1801 ATTTAAGTGTAATTAAGAAAATAAACACCATTAATCAAGCCATATAAAAAAATAAA +-----+-----+-----+ 1860

TAAATTCACATAAATTTCTTTTATTTGGTAATAAGTTCGGTATATTTTTTTTTTTT

I * V Y L K K I N T I I Q A I * K K K K -
F K C I * R K * T P L F K P Y K K K K K -
L S V F K E N K H H Y S S H I K K K K K -

AAAA

FIG. 3

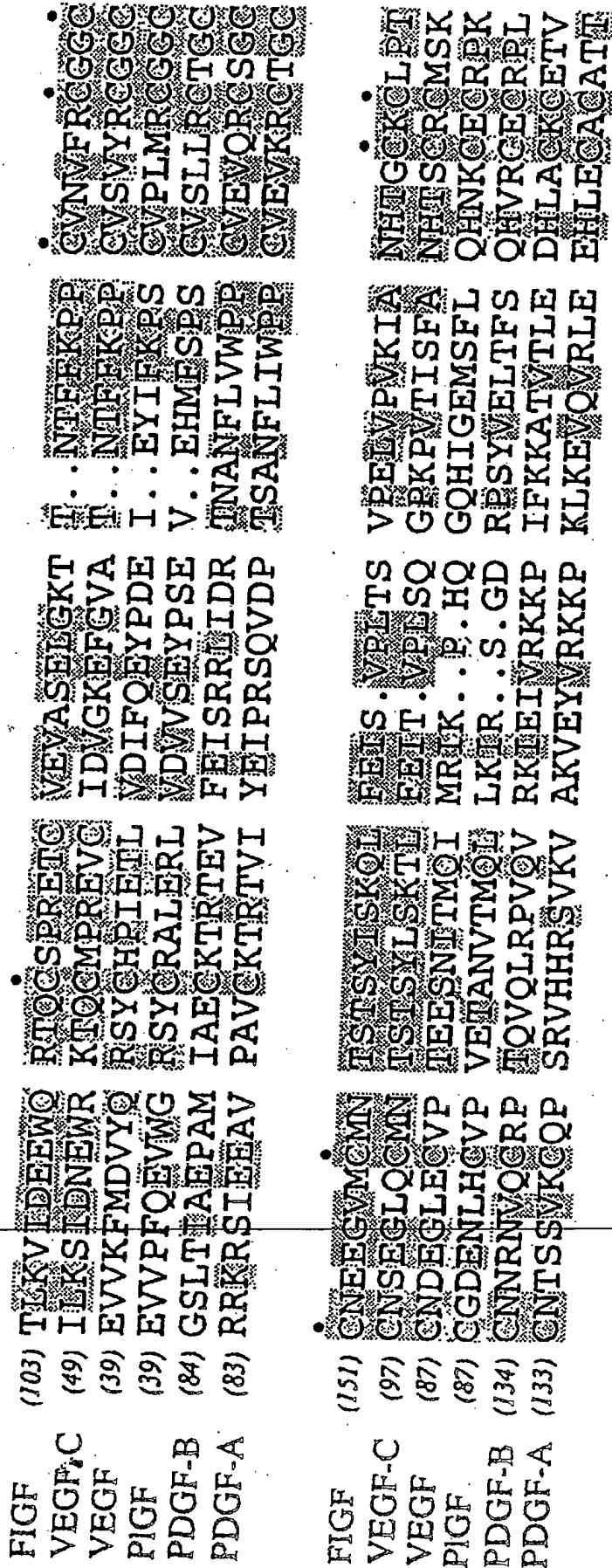
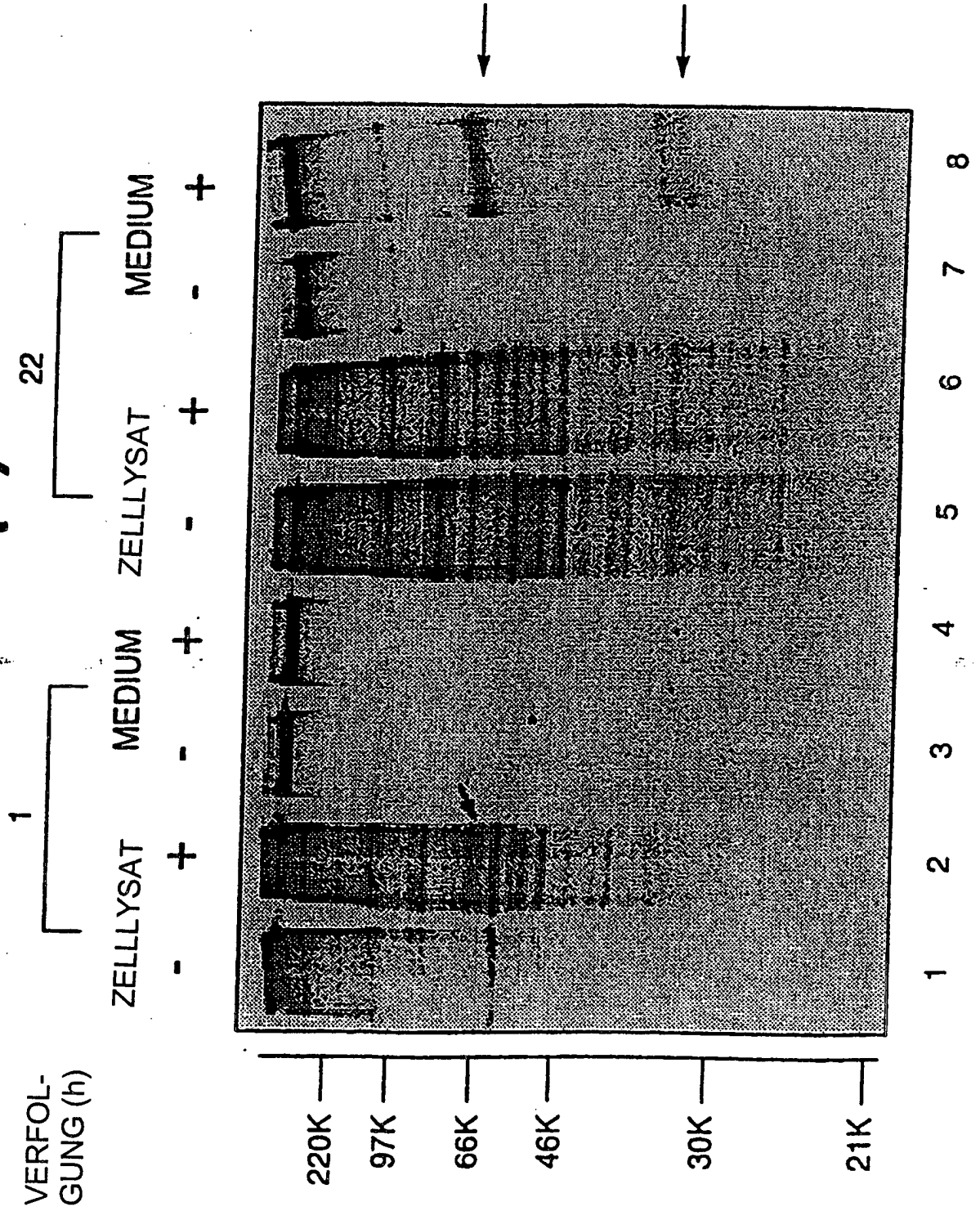


FIG. 4(A)



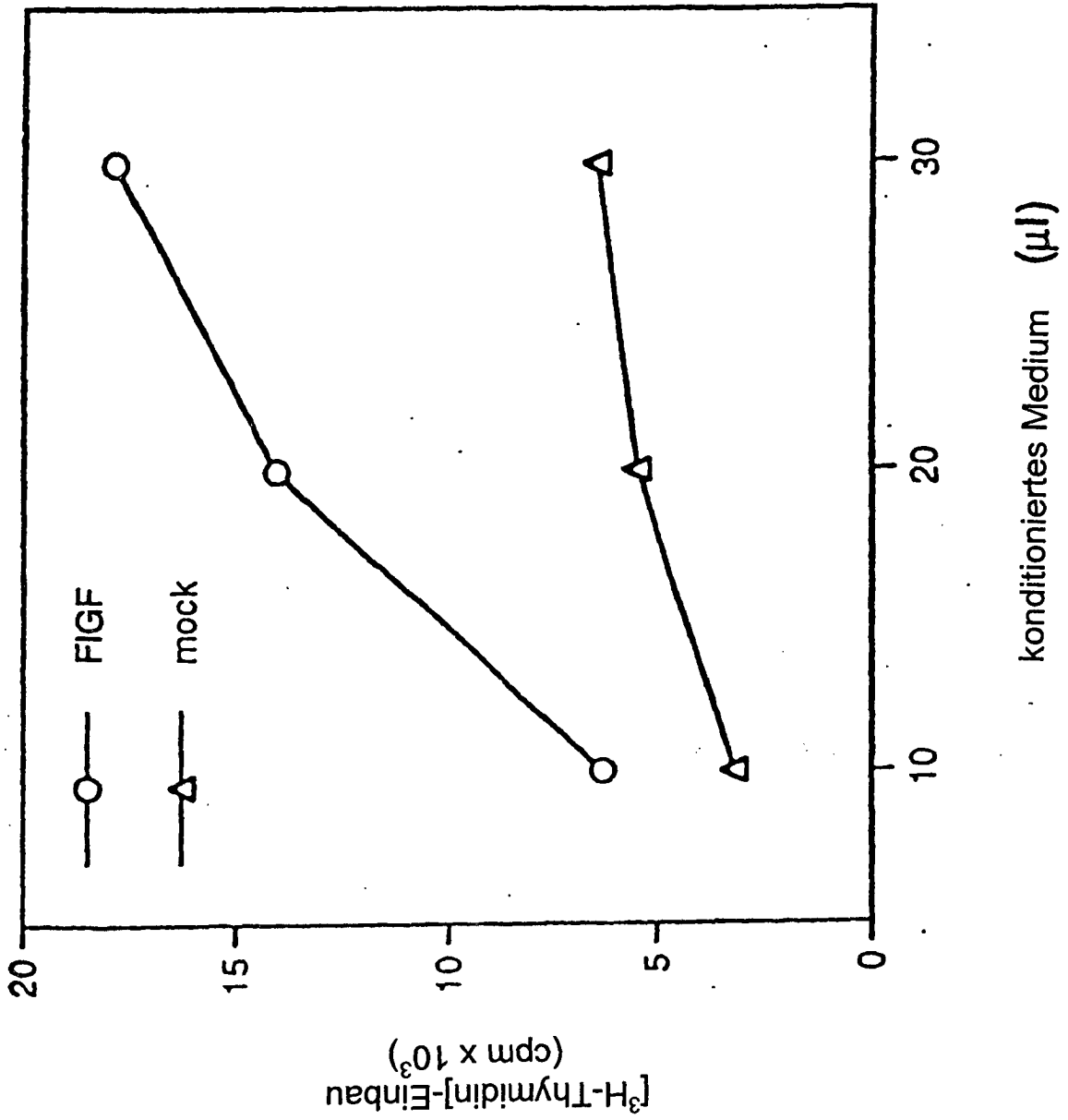


FIG. 4(B)

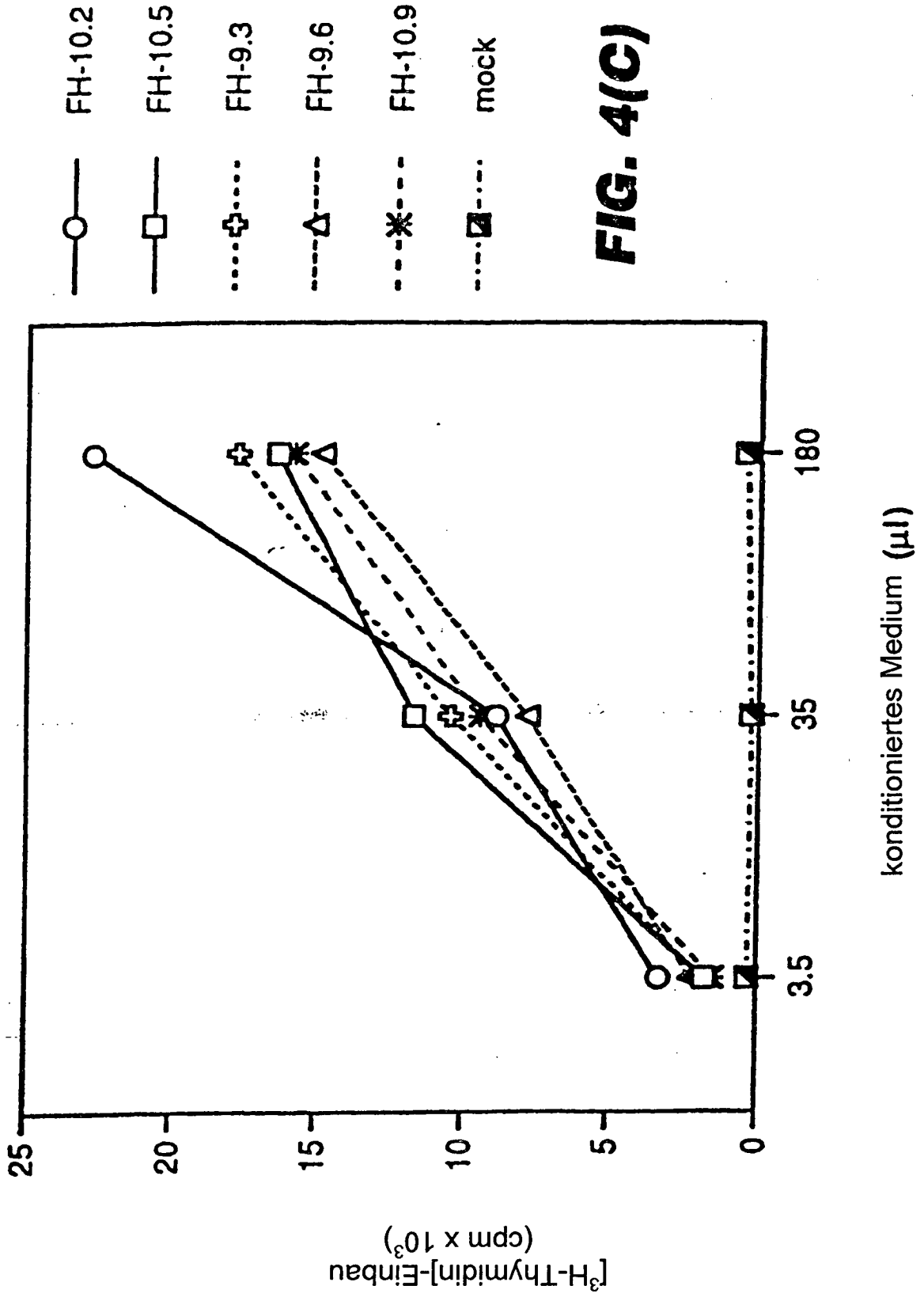


FIG. 4(C)

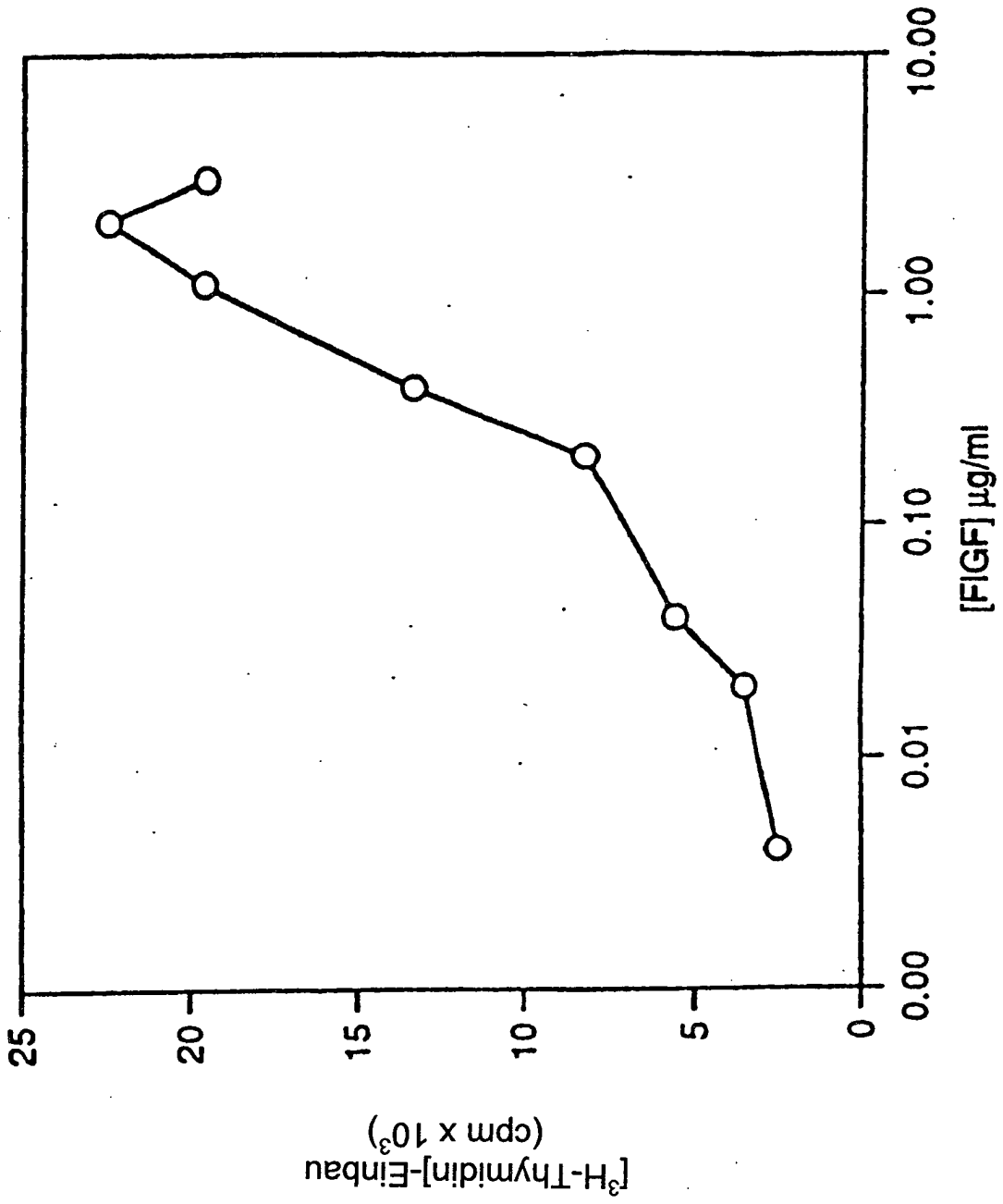


FIG. 4(D)

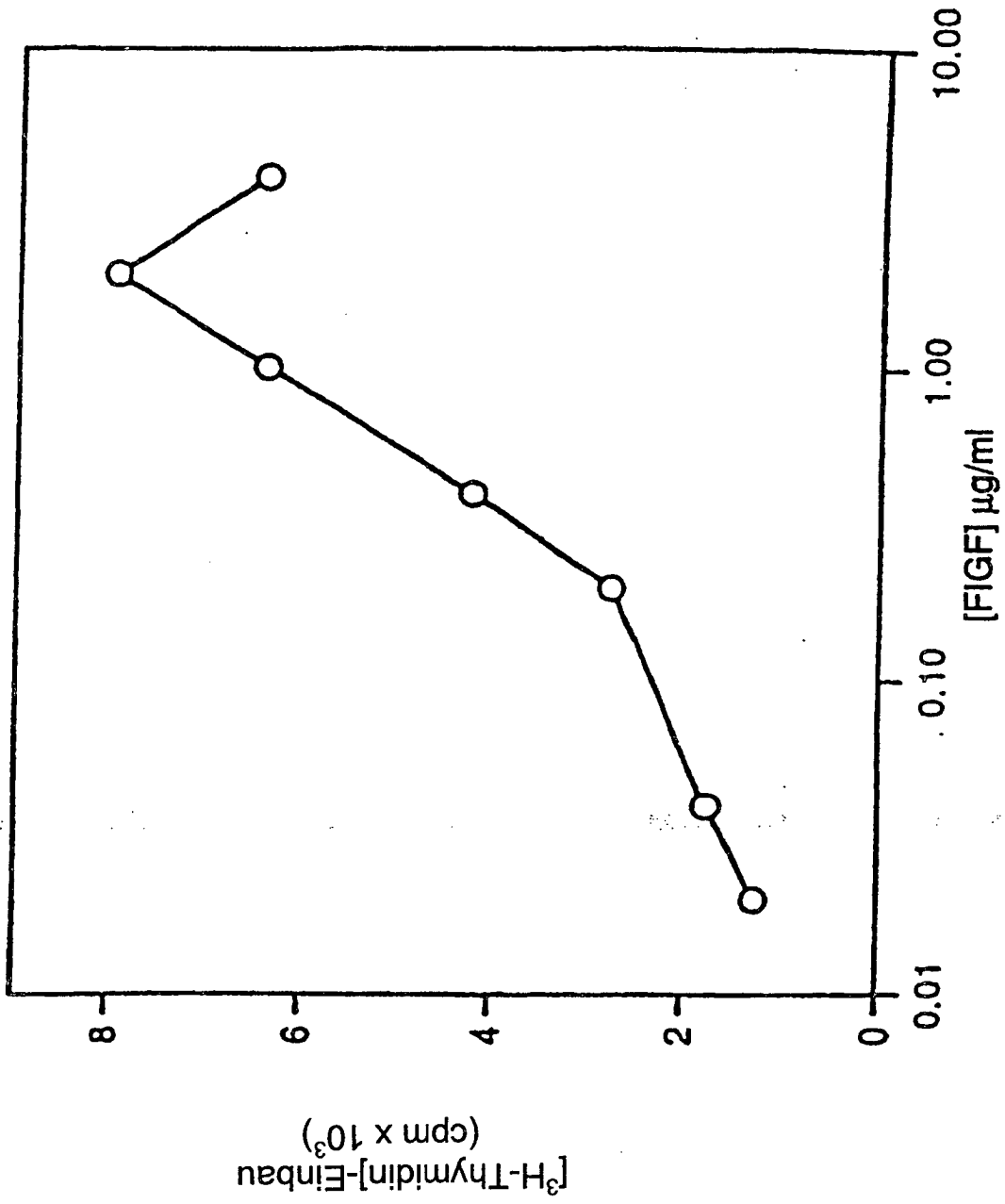


FIG. 4(E)

FIG. 5(A)

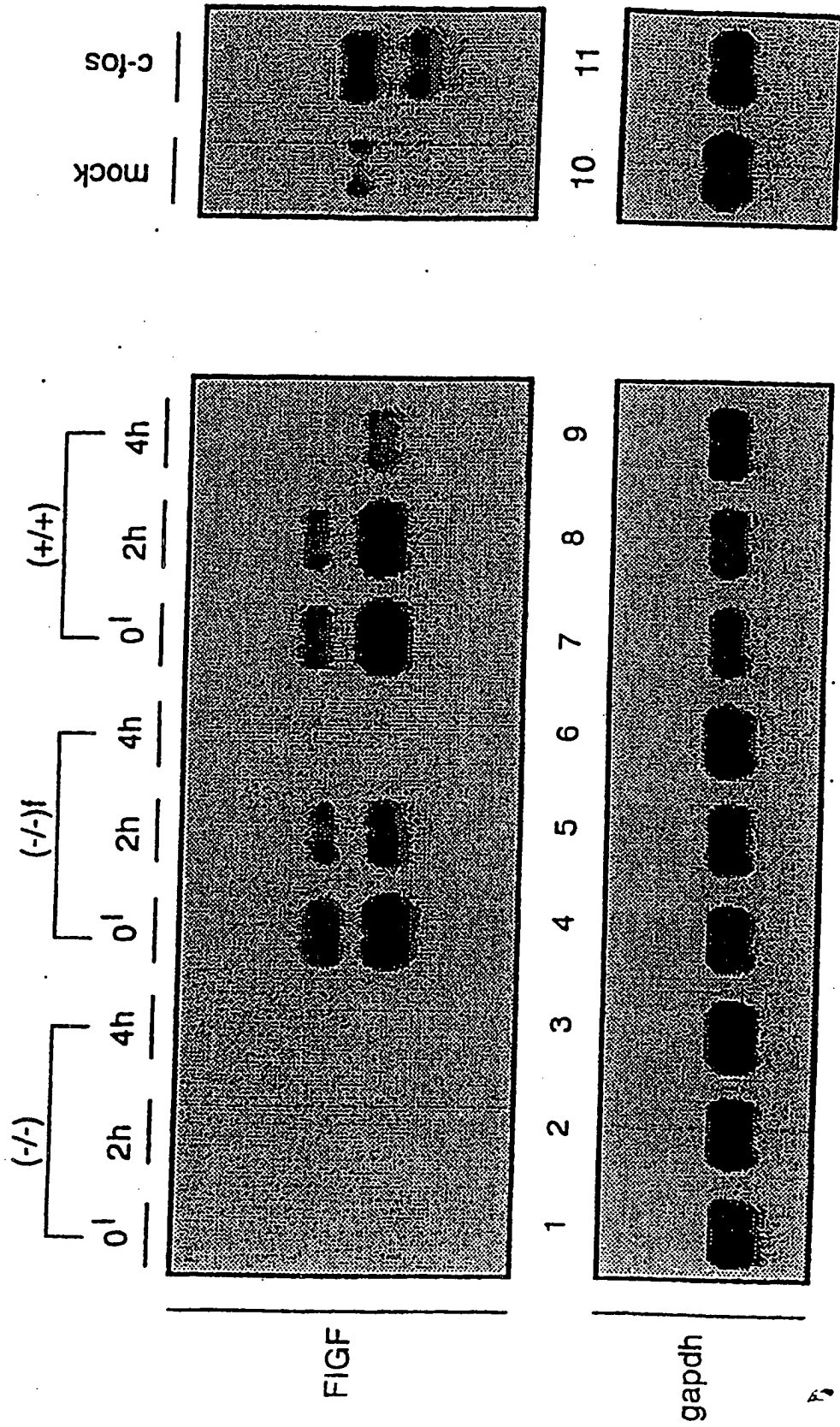


FIG. 5(B)

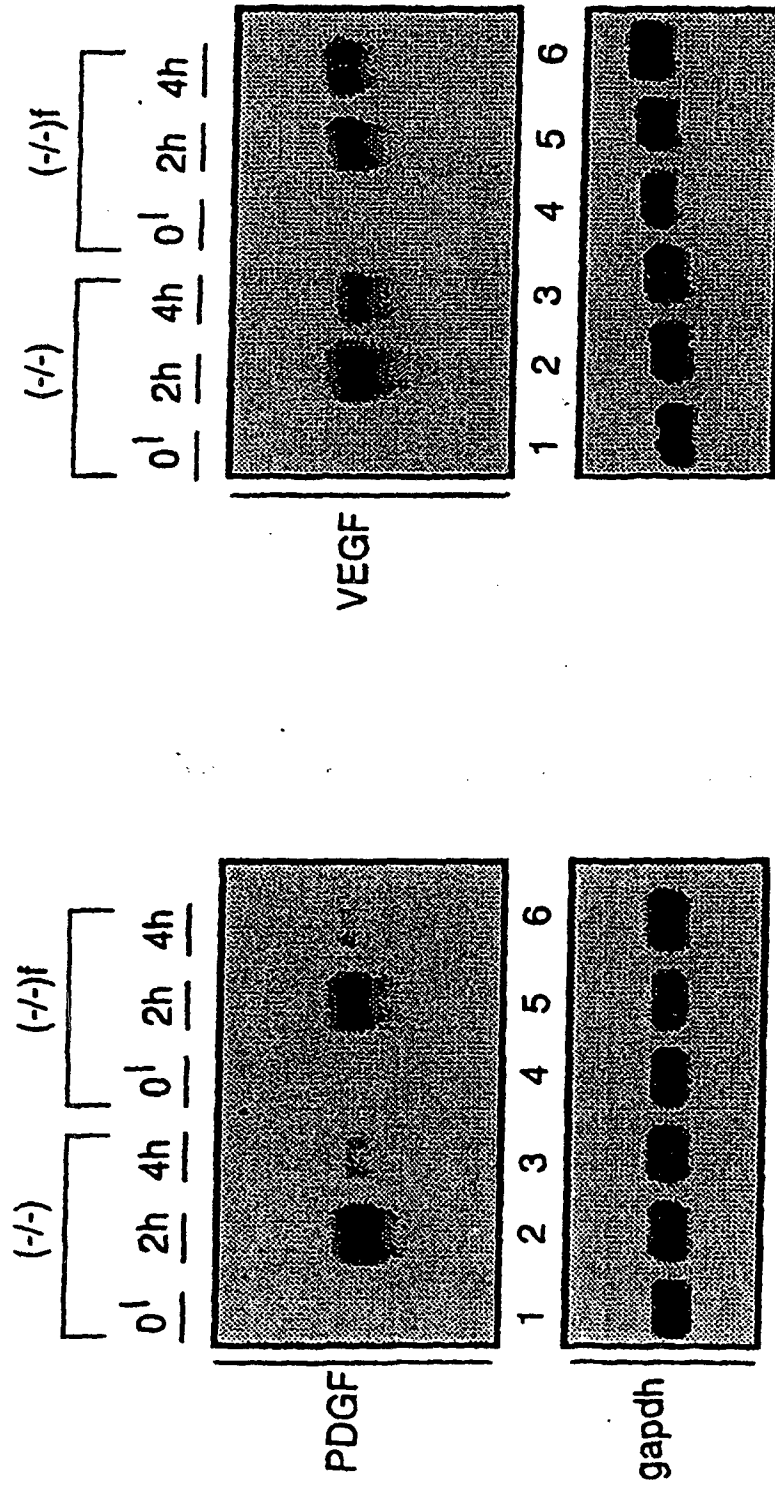


FIG. 6

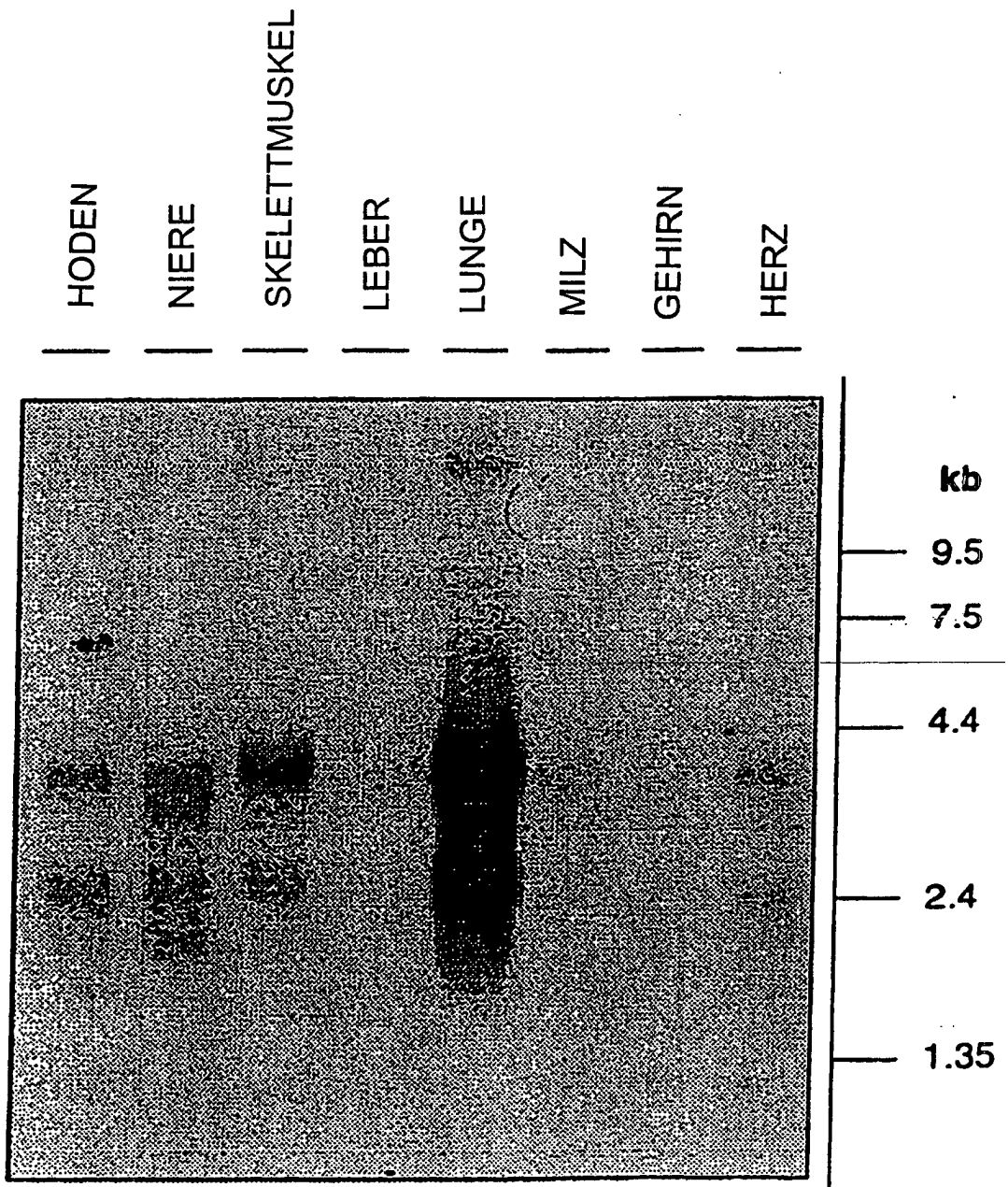


FIG. 7(A)



FIG. 7(B)

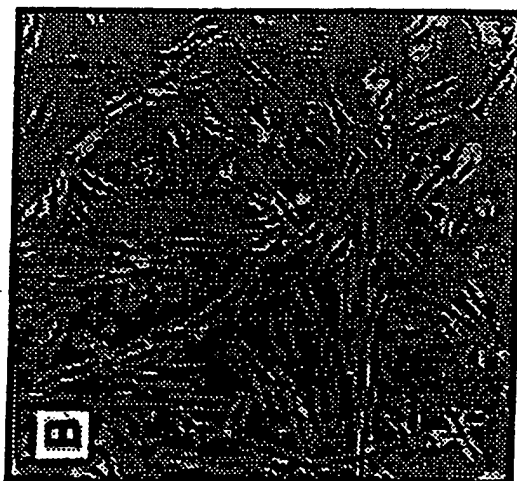


FIG. 7(C)

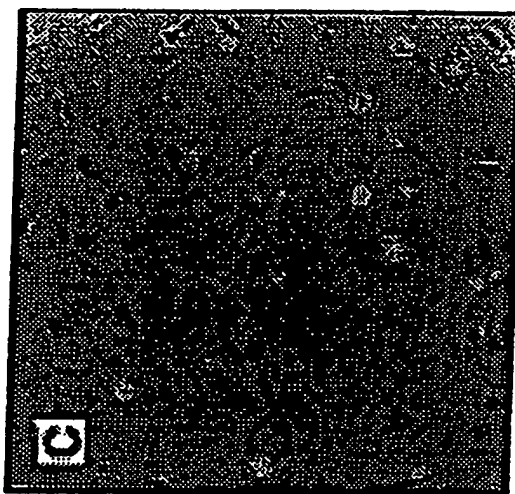


FIG. 7(D)

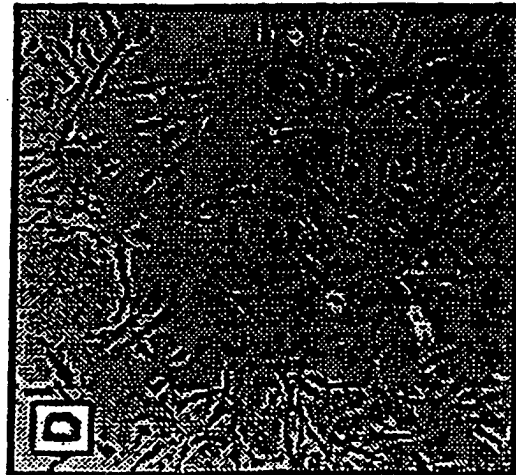


FIG. 7(E)

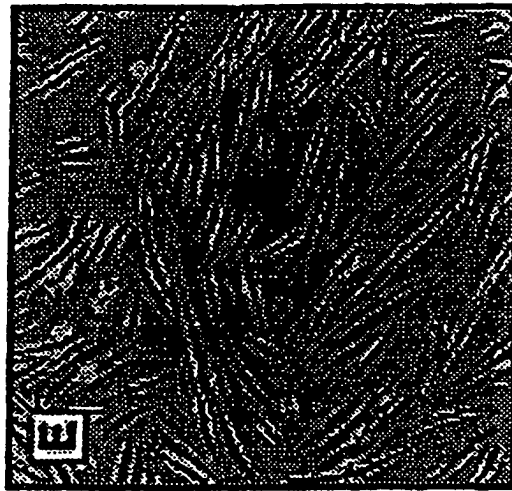


FIG. 7(F)

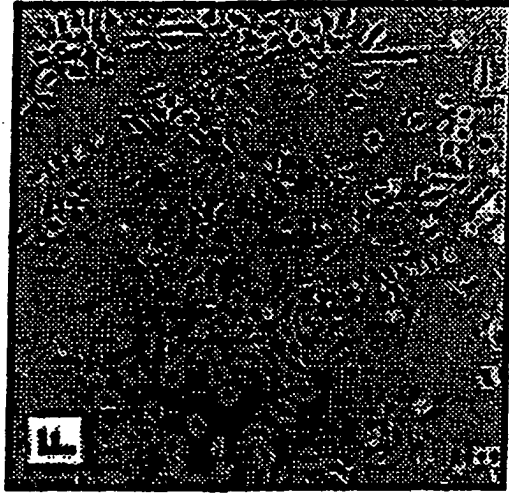


FIG. 7(G)



FIG. 7(H)

