



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 885 T2** 2006.02.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 062 514 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 885.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/04897**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 912 296.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/046594**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **16.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/574** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

77372 P 09.03.1998 US

(73) Patentinhaber:

**Wisconsin Alumni Research Foundation,
Madison, Wis., US**

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

ROSS, Jeffrey, Madison, US

(54) Bezeichnung: **C-MYC-BINDENDEN PROTEIN "C-MYC CODING REGION DETERMINANT-BINDING PROTEIN (CRD-BP)"**

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

[0001] Das c-myc-Protein ist ein Mitglied der Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (HLH/LZ) (Bei den hier verwendeten Abkürzungen handelt es sich um: HLH/LZ, Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper; AURE, AU-reiches Element; UTR, untranslatierter Bereich; CRD, Kodierungsbereichsdeterminante; CRD-BP, Kodierungsbereichsdeterminante-bindendes Protein; DTT, Dithiothreitol; EGTA, Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-(tetraessigsäure); PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid; S130, postpolysomaler Überstand; SDS, Natriumdodecylsulfat; RSW, Ribosomen-Salzwäsche; PCR, Polymerasekettenreaktion; bp, Basenpaare; EST, Expressed Sequence Tags; RACE, schnelle Amplifikation von cDNA-Enden; BAC, künstliches Bakterienchromosom; GCG, Genetik-Computergruppe; IP, Immunpräzipitation; mRNP, Messenger(Boten)-Ribonucleoprotein; hnRNPK, heterogenes, nukleäres Ribonucleoprotein K; HRP, Meerrettich-Peroxidase; HSP-90, Hitzeschockprotein-90; MOPS, Morpholinpropansulfonsäure; KH, K-Homologie; ORF, offenes Leseraster (engl.: open reading frame); FMR, familiäre Geistesschwäche; FMRP, FMR-RNA-bindendes Protein; hKOC, humanes KH-Domäne-Protein, das bei humanem Krebs überexprimiert wird; PAG, Polyacrylamidgel; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; ECL, verstärkte Chemilumineszenz.)-Familie von Transkriptionsfaktoren, das Heterodimere mit Max bildet (1 – 3). Im Allgemeinen werden trans-aktivierende Myc:Max-Heterodimere in proliferierenden Zellen gefunden, während trans-hemmende Mad:Max-Heterodimere in differenzierten Zellen gefunden werden. Der c-myc-Proteinpegel beeinflusst die Zellproliferation, Differenzierung und neoplastische Transformation, vermutlich durch Beeinflussen des Gleichgewichts zwischen Myc:Max- und Mad:Max-Heterodimeren (4). Wenn das c-myc-Protein überexprimiert wird oder zu ungünstigen Zeitpunkten induziert wird, wird dieses Gleichgewicht gestört und die Zellproliferation und die Differenzierung werden unterbrochen. Beispielsweise verhindert oder verzögert die c-myc-Überexprimierung die Zelldifferenzierung (5, 6). Sie blockiert auch Serumausgehungerte Zellen vom Eintreten in die G₀-Phase des Zellzyklus und veranlaßt sie statt dessen, in die Apoptose einzutreten (7). Die c-myc-Überexprimierung ist auch bei der Tumorbildung bei Versuchstieren und bei humanen Patienten mit Burkitt-Lymphom beteiligt (8, 9). Diese und andere schädliche Folgen von abnormer c-myc-Expression zeigen die Wichtigkeit auf, alle Aspekte der c-myc-Genregulation zu verstehen.

[0002] Das c-myc-Protein wird durch Phosphorylierung, Protein-Protein-Wechselwirkungen und Änderungen seiner Halbwertszeit reguliert (10-12). c-myc-mRNA-Pegel werden transkriptional und post-transkriptional reguliert, und Änderungen der c-myc-mRNA-Stabilität können große Schwankungen von c-myc-Proteinpegeln verursachen. Die c-myc-mRNA-Halbwertszeit beträgt normalerweise nur 10 bis 20 Minuten, kann aber nötigenfalls um das 3- bis 6-fache verlängert werden. Beispielsweise ist die c-myc-mRNA beim Replizieren von fötalen Nager-Hepatozyten, die reichlich c-myc-mRNA erzeugen, relativ stabil. Sie ist in nichtwachsenden adulten Hepatozyten, die wenig oder keine c-myc-mRNA enthalten, weitaus weniger stabil (13, 14). Sie wird jedoch auf ein Mehrfaches hochreguliert und stabilisiert, wenn adulte Hepatozyten nach einer partiellen Leberresektion replizieren (15, 16).

[0003] Zwei cis-arbeitende Sequenzelemente in der c-myc-mRNA tragen zu derer intrinsischen Instabilität und eventuell auch zu derer post-transkriptionalen Regulation bei: ein AU-reiches Element (AURE) im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) und eine Kodierungsbereichsdeterminante (CRD) von 180 Nukleotiden. Die CRD kodiert einen Teil der HLH/LZ-Domäne und ist am 3'-Ende des mRNA-Kodierungsbereichs lokalisiert. Vier Beobachtungen zeigen, wie die c-myc-CRD Funktionen unabhängig von dem AURE wirkt, um die c-myc-mRNA-Expression zu beeinflussen. (i) c-myc-mRNA, der ihre CRD fehlt, ist stabiler als Wildtyp-c-myc-mRNA (17-20). (ii) Die CRD wird bei der post-transkriptionalen Herunterregulierung von c-myc-mRNA, die auftritt, wenn kultivierte Myoblasten fusionieren, um Myotuben zu bilden, benötigt (20, 21). (iii) Das Einbringen der c-myc-CRD in das Raster (engl. frame) innerhalb des β -Globin-mRNA kodierenden Bereichs destabilisiert die normalerweise sehr stabile β -Globin-mRNA (22). (iv) Die c-myc-CRD ist zur Hoch- und Herunterregulierung der c-myc-mRNA-Pegel bei transgenen Mäusen, die nach einer partiellen Leberresektion eine Leberregenerierung erfahren, notwendig (13, 15, 16, 23-25). Zusammengefasst gesagt, beeinflusst die c-myc-CRD die c-myc-mRNA-Stabilität bei Tieren und kultivierten Zellen.

[0004] Wir haben die c-myc-mRNA-Stabilität und die Funktion von CRD unter Verwendung eines zellfreien mRNA-Abbausystems, das Polysome aus kultivierten Zellen umfasst, untersucht. Die Polysome enthalten sowohl Substrate (mRNAs) zum Abbau als auch wenigstens einige der Enzyme und Kofaktoren, die die mRNA-Stabilität beeinflussen. Die Polysome werden über verschiedene Zeiträume in einem geeigneten Puffersystem inkubiert, und die Abbauraten von polysomalen mRNAs, wie beispielsweise c-myc, werden durch Hybridierungstests aufgezeichnet. Dieses System gibt viele Aspekte des mRNA-Abbaus in intakten Zellen wieder (26-29). Beispielsweise sind mRNAs, die in Zellen instabil sind, auch in vitro relativ instabil; mRNAs, die in Zellen stabil sind, sind auch in vitro stabil (26). In Standardreaktionen wurde polysomengebundene c-myc-mRNA schnell in Richtung von 3' nach 5' abgebaut, wahrscheinlich durch eine Exonuclease (29). Ein alternativer Ab-

bauweg wurde aktiviert, als die Reaktionen durch eine der c-myc-CRD entsprechende 180 Nucleotide-umfassende Richtungsstrang-Konkurrenz-RNA ergänzt wurden. Diese CRD-RNA induzierte eine endonukleolytische Spaltung innerhalb der c-myc-CRD, was zu einer Destabilisierung der c-myc-mRNA um das Achtfache führte (30). Diese Wirkungen schienen spezifisch für c-myc zu sein. Andere Konkurrenz-RNAs destabilisierten die c-myc-mRNA nicht, und die c-myc-CRD-Konkurrenz-RNA destabilisierte andere mRNAs, die getestet wurden, nicht.

[0005] Auf der Grundlage dieser Beobachtungen stellten wir die Hypothese auf, dass ein Protein an die c-myc-CRD gebunden war. Wir schlugen ferner vor, dass dieses Protein die CRD gegenüber einem Endonucleaseangriff abschirmte, dass die CRD-Konkurrenz-RNA das Protein von der mRNA abtitrierte, und dass die ungeschützte c-myc-CRD dann von einer Endonuclease angegriffen wurde. Im Einklang mit diesem Modell entdeckten wir ein Protein, das in vitro stark an eine c-myc-CRD-³²P-RNA-Sonde bindet (30). Dieses Protein, das c-myc-Kodierungsbereichs-determinante-bindende Protein (CRD-BP), wurde anschließend bis zur Homogenität gereinigt (31). Wir haben dann gefunden, dass das CRD-BP entwicklungsbezogen reguliert wird, da es in fötalen und neonatalen Ratten, aber nicht in adulten Tieren, exprimiert wird (32).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] In den nachstehend beschriebenen Beispielen berichten wir das Klonieren von Maus-CRD-BP-cDNA, einem neuen Mitglied der RNA-Bindungsproteinfamilie. Wir zeigen außerdem, dass CRD-BP in vitro an Ribosomen binden kann und dass das meiste CRD-BP, das in Zellextrakten vorhanden ist, im Cytoplasma lokalisiert ist und mit Polysomen und Ribosomen assoziiert ist. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Rolle von CRD-BP beim Abschirmen von polysomaler c-myc-mRNA gegenüber endonukleolytischem Angriff, was bedeutet, dass CRD-BP dazu beiträgt, dass c-myc-mRNA erhalten bleibt und es ihr ermöglicht wird, zur Herstellung von c-myc-Protein verwendet zu werden. Wir vermuten, dass das Blockieren der CRD-BP-Expression zu der sehr schnellen Zerstörung der c-myc-mRNA und der nachfolgenden Entleerung von c-myc-Protein der Zelle führen könnte.

[0007] Wir haben auch gezeigt, dass das CRD-BP sowohl in Krebszelllinien, die im Labor gezüchtet wurden, als auch in fötalem Gewebe von Nagern reichlich exprimiert wird (32). Im Gegensatz dazu ist das CRD-BP in Geweben von adulten Nagern nicht nachweisbar (32). Wir vermuten, dass diese letztgenannten Beobachtungen im Einklang mit der Idee stehen könnten, dass das CRD-BP ein onkofötales Protein ist – das heisst ein Protein, das im Fötus und in Krebszellen der Postnatalperiode, aber nicht in normalen (nicht-krebsartigen) Geweben der Postnatalperiode exprimiert wird. Falls dem so ist, dann sollte CRD-BP in Krebsgeweben, aber nicht in normalen Geweben in der Postnatalperiode vorhanden sein.

[0008] Die spezifische, beschränkte Expression von CRD-BP in krebsartigen Geweben könnte bedeuten, dass CRD-BP ein potentieller diagnostischer bzw. prognostischer Marker für humanen Krebs ist. Da CRD-BP anscheinend c-myc-mRNA vor schneller Zerstörung schützt und da c-myc-Protein für das Zellwachstum erforderlich ist, könnte ferner das Entfernen von CRD-BP aus Krebszellen zu deren Wachstumsstillstand oder sogar zu deren Tod führen.

[0009] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur Diagnose der Anwesenheit oder Abwesenheit von Krebs bei einem humanen Patienten, umfassend folgende Stufen: Untersuchen von Patientengewebe auf die CRD-BP-Expressionsniveaus und Vergleichen dieses Expressionsniveaus mit einer Kontrolle oder Untersuchen von Patientenserum auf Antikörper gegen CRD-BP und Vergleichen dieses Antikörperpegels mit denen von normalen Kontrollen (vorzugsweise unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht). Bei der CRD-BP-Expressionsniveau-Kontrolle handelt es sich vorzugsweise um nicht-krebsartiges Gewebe aus der gleichen Quelle wie das Testgewebe. Beispielsweise sollte ein Brusttest vorzugsweise über eine Brustgewebekontrolle verfügen. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Krebs aus der Gruppe bestehend aus Brustkrebs, Kolonkrebs und Pankreaskrebs ausgewählt.

[0010] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst der Nachweis von CRD-BP die Stufe des Homogenisierens von Biopsiegewebe und Erhalten eines rohen Proteinextrakts. Danach kann man den Extrakt auf den CRD-BP-Pegel prüfen.

[0011] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich auch um ein quantitatives Verfahren zum Bestimmen des Stadiums von Krebs bei einem humanen Patienten, umfassend die Stufe des Untersuchens von Patientengewebe auf das CRD-BP-Expressionsniveau und Korrelieren des Expressionsniveaus mit der Krankheitsprognose.

[0012] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich auch um ein ex vivo-Verfahren zum Hemmen von Krebszellenwachstum, umfassend den Entfernungs- oder Erniedrigungsschritt des CRD-BP-Pegels in krebsartigen Zellen.

[0013] Es ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass ein Verfahren zur Diagnose von humanem Krebs offenbart wird.

[0014] Es ist ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass ein ex vivo-Verfahren und Medikamente zur Hemmung von Krebszellenwachstum offenbart werden.

[0015] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt daher ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von Krebs in einem von einem humanen Patienten entnommenen Gewebe bereit, umfassend folgende Stufen: a) Prüfen des Patientengewebes auf das CRD-BP-Expressionsniveau; und b) Vergleichen des Ergebnisses von Stufe (a) mit dem Expressionsniveau in nicht-krebsartigem Gewebe aus der gleichen Quelle, wobei ein erhöhtes CRD-BP-Niveau im Patientengewebe im Vergleich mit dem nicht-krebsartigen Gewebe die Diagnose von Krebs bedeutet.

[0016] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Bestimmung des Stadiums von Krebs in einem von einem humanen Patienten entnommenen Gewebe bereit, umfassend folgende Stufen: a) Prüfen der Patientengewebe auf die CRD-BP-Expressionsniveaus und b) Korrelieren des Expressionsniveaus mit der Krankheitsprognose.

[0017] Die Erfindung stellt ferner ein ex vivo-Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit eines anti-CRD-BP-Antikörpers im Serum eines Patienten bereit, umfassend die folgende Stufe: a) Behandeln eines Patientenserums mit CRD-BP und Bestimmen, ob ein anti-CRD-BP-Antikörper vorhanden ist.

[0018] Die Erfindung stellt zusätzlich ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von CRD-BP im Serum eines Patienten bereit, umfassend die Stufe:

a) Behandeln des Patientenserums mit CRD-BP-Antikörper und Bestimmen, ob CRD-BP vorhanden ist.

[0019] Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines Mittels, das zur Beseitigung oder Absenken des CRD-BP-Pegels in Krebszellen befähigt ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von Krebs bereit. Bei einer solchen Verwendung kann es sich bei dem Mittel um eine Konkurrenz-RNA, die die Fähigkeit von CRD-BP zum Schützen von c-myc-mRNA vor einer schnellen Zerstörung beseitigen oder verringern kann, handeln. Bei dem Mittel kann es sich um einen Inhibitor, der das Binden von CRD-BP an c-myc-mRNA-CRD blockieren und somit die Fähigkeit des CRD-BP zum Schützen von c-myc-mRNA vor einer schnellen Zerstörung verringern oder beseitigen kann, handeln.

[0020] Andere Aufgaben, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden offensichtlich werden, nachdem ein Fachmann die Beschreibung, Ansprüche und Zeichnungen geprüft hat.

KURZE BESCHREIBUNG DER VERSCHIEDENEN ANSICHTEN DER ZEICHNUNGEN

[0021] Fig. 1. Maus-CRD-BP-cDNA und die vorhergesagte Proteinsequenz (SEQ ID NO: 1 bzw. 2). Die Peptidsequenzen, die nukleären Lagen und nukleären Exportsignalen ähneln, sind durch einfache Unterstreichung bzw. Oberlinien kenntlich gemacht. Peptidsequenzen, die der RGG-Box und den KH-Domänen ähneln, sind durch den Kasten bzw. die Doppeltunterstreichungen kenntlich gemacht. Ein Stern zeigt die Translationsabbruchstelle an und das Polyadenylatsignal ist einfach unterstrichen. Wir haben nicht schlüssig gezeigt, dass die Translationsstartstelle, die in der Figur gekennzeichnet ist, korrekt ist oder die einzige Startstelle ist. Die 5'-UTR könnte unvollständig sein, da die Startstelle der Transkription nicht kartiert worden ist.

[0022] Fig. 2. CRD-BP-Alignments mit verschiedenen übereinstimmenden Sequenzen für RNA-Bindungsproteine (SEQ ID NO: 3-30). Es werden Alignments von Maus-CRD-BP (mCRD-BP) mit den RGG-Domänen (A) (SEQ ID NO: 3-9), nukleären Exportsignalen (B) (SEQ ID NO: 10-16) und KH-Domänen (C) (SEQ ID NO: 17-30) von anderen RNA-Bindungsproteinen gezeigt. In **Fig. 2** zeigen die mit einem Kasten umgebenen Residuen Identität mit oder Konservierung von übereinstimmenden Sequenzresiduen an. Die Genbank-Hinterlegungsnummern der Proteine sind folgende: hKOC, U97188; hnRNPK, S74678; Fibrillarin, X56597; Nucleolin, M60858/J05584; FMRP, S65791; Rev, X58781.

[0023] Fig. 3. Immunoblot-Test, der die gemeinsame Wanderung (engl.: co-migration) von rekombinantem

und aus Zellen stammendem CRD-BP zeigt. Die ribosomale Salzwäsche (RSW) wurde von K562 und NIH/3T3-Zellpolysomen und von Polysomen, die aus Retikulozyten-Transkriptions-/Translationsreaktionen, die mit CRD-BP-DNA oder mit Vektor-DNA programmiert waren, isoliert wurden, hergestellt. Etwa $7,5 \times 10^5$ Zelläquivalente der K562- oder NIH/3T3-RSW oder 3 % der RSW, die von einer 50 µl Translationsreaktion gewonnen war, wurden auf einem 10 %-igen SDS-PAG einer Elektrophorese unterworfen und auf eine Membran, die mit anti-CRD-BP-IgY-Antikörper und danach mit HRP-konjugiertem anti-IgY-Antikörper inkubiert war, übertragen. Das Signal wurde mit Supersignal-Chemilumineszenz-Reagenzien entwickelt. Es werden die Positionen des CRD-BP und eines kreuzreagierenden Proteins (p85) gezeigt. Die Positionen von vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern sind in kDa rechts gezeigt.

[0024] Fig. 4. Gelretardations-Test, der die spezifische Bindung von rekombinantem CRD-BP an c-myc-CRD-RNA zeigt. (A) Die RSW wurde von K562-Zellpolysomen und von Transkriptions-/Translationreaktionen, die mit CRD-BP-cDNA, Luciferase-cDNA (Luc) oder mit einer Vektor-DNA programmiert waren, hergestellt. Äquivalente Volumina (2 µl) der jeweiligen RSW wurden mit 50 000 cpm synthetischer c-myc-CRD-³²P-RNA inkubiert. RNA/Protein-Komplexe wurden von der freien (ungebundenen) Sonde durch Elektrophorese in einem 6 %-igen nicht-denaturierenden PAG abgetrennt. „OHNE“ kennzeichnet eine Gelretardationsreaktion, zu der kein Protein zugegeben wurde. Die Positionen der CRD-BP/CRD-Komplexe (GEBUNDEN) und der ungebundenen RNA (FREI) sind links gekennzeichnet. (B) Konkurrenztest. Die gezeigte RSW wurde mit c-myc-CRD-³²P-RNA in Gegenwart oder Abwesenheit von Puffer (OHNE) oder mit 200-fachem molaren Überschuss von unmarkierter synthetischer c-myc-CRD-RNA oder β-Globin-RNA inkubiert. RNA/Protein-Komplexe wurden dann in einem 6 %-igen nicht-denaturierenden PAG abgetrennt. Die Positionen der CRD-BP/CRD-Komplexe (GEBUNDEN) und der ungebunden RNA (FREI) sind links gekennzeichnet.

[0025] Fig. 5. Co-Fraktionierung von rekombinantem CRD-BP mit Retikulozyten-Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten. Radiomarkiertes rekombinantes CRD-BP (gefüllte Kreise) und Luciferase (LUC; offene Kreise) wurden in getrennten Retikulozyten-Translationstests synthetisiert. Jeder Extrakt wurde dann durch Sedimentation mit einem 20-40 %-igen linearen Sucrosegradienten fraktioniert. Äquivalente Mengen jeder Gradientenfraktion wurde mit Elektrophorese mit einem 10 %-igen SDS-PAG und Quantifizierung in einem Phosphorimager auf radiomarkiertes Protein untersucht. Die Menge von CRD-BP und Luciferase ist in willkürlichen Einheiten gegeben. Die Positionen der ribosomalen Untereinheiten, Monosomen und Polyribosomen wurden durch Messen von A260 und durch Durchführen einer Elektrophorese mit einem Teil jeder Fraktion in einem Agarosegel bestimmt, um die 18S- und 28S-rRNA zu identifizieren.

[0026] Fig. 6. Co-Fraktionierung von endogenem CRD-BP mit K562-Zellpolysomen und Fehlen von CRD-BP in Nuklei. Von exponentiell wachsenden K562-Zellen wurden subzelluläre Fraktionen hergestellt (experimentelle Verfahren). Gleiche Zelläquivalente (6×10^5) jeder Fraktion wurden auf einem 10 %-igen SDS-PAG abgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit entweder (A) anti-CRD-BP-IgY oder (B) anti-HSP-90-IgG inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten sekundären Antikörpern. Immunoreaktive Proteine wurden unter Verwendung von ECL-Reagenzien sichtbar gemacht. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern in kDa sind links gezeigt.

[0027] Fig. 7. Co-Fraktionierung von CRD-BP mit ribosomalen Untereinheiten aus K562-Zellen. Die Polysome von exponentiell wachsenden K562-Zellen wurden in Puffer resuspendiert und danach mit 20 mM EDTA inkubiert, um ribosomale Untereinheiten (60S und 40S) von einander und von der mRNP zu trennen. Ein Aliquot der Untereinheiten wurde in einem linearen 5-30 %-igen Sucrosegradienten, der EDTA enthielt, zentrifugiert. Fraktion 1 ist das obere Ende des Gradienten, Fraktion 18 ist die letzte Fraktion des Gradienten und Fraktion 19 ist das Pellet, das vom Boden des Zentrifugenröhrchen resuspendiert wurde. Feld A: Extinktion von jeder Fraktion bei 250 nm. Feld B: RNA, die aus einem Aliquot jeder Fraktion isoliert war, wurde in einem 1 %-igen Agarosegel einer Elektrophorese unterzogen, wobei das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt war und unter UV-Licht photographiert wurde. Die Positionen der 28S- bzw. 18S-rRNAs aus den großen und kleinen ribosomalen Untereinheiten sind links gekennzeichnet. Feld C: Ein Aliquot jeder Fraktion wurde durch Immunoblotting durch Verwenden von anti-CRD-BP-IgY analysiert. Die immunreaktiven Proteine wurden durch Verwenden von ECL-Reagenzien sichtbar gemacht. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern in kDa sind links gezeigt. Das CRD-BP und das kreuzreagierende p85 sind rechts gekennzeichnet.

[0028] Fig. 8. Co-Fraktionierung von CRD-BP mit 60S-ribosomalen Untereinheiten, bestimmt durch Immunopräzipitation mit einem anti-P-Protein-Antikörper. Ein Aliquot von mit EDTA getrennten K562-Zellpolysomen wurde mit anti-P-Protein-Antikörper (I) oder mit normalem humanen Serum (N) inkubiert. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden immunpräzipitiert (IP'd) und die IP'd-Proteine wurden einem Immunoblotting unterzogen und durch Verwenden von anti-P-Protein-IgP (Feld A) oder anti-CRD-BP-IgY (Feld B) analysiert. Die im-

munreaktiven Proteine wurden unter Verwendung von ECL-Reagenzien sichtbar gemacht. Die Positionen der P-Proteine (P_0 , P_1 und P_2) und des CRD-BPs sind rechts gekennzeichnet. Die Positionen von vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern in kDa sind links gezeigt. H-Kette (engl.: heavy chain) zeigt die Kreuzreaktivität mit der IgG-H-Kette auf der Membran an.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

A. Allgemeines

[0029] Die Halbwertszeit von c-myc-mRNA wird reguliert, wenn Zellen ihre Wachstumsraten ändern oder differenzieren. Zwei Sequenzen innerhalb des c-myc-mRNA-Moleküls bestimmen dessen Halbwertszeit, eine davon im 3'-untranslatierten Bereich, und die andere im Kodierungsbereich. Ein cytoplasmatisches Protein, das Kodierungsbereichsdeterminante-bindende Protein (CRD-BP), bindet in vitro an die Stabilitätsdeterminante des c-myc-Kodierungsbereichs.

[0030] Auf der Grundlage von Beobachtungen durch Verwenden eines zellfreien mRNA-Abbau-Systems schlagen wir vor, dass CRD-BP, wenn es an das mRNA gebunden ist, die mRNA gegen endonukleolytischen Angriff abschirmt und dadurch die mRNA-Halbwertszeit verlängert. Wir beschreiben hiermit die Klonierung und weitere Charakterisierung von Maus-CRD-BP, einem Protein mit 577 Aminosäuren, das vier hnRNP-K-Homologiedomänen, eine RGG-RNA-bindende Domäne und nukleäre Import- und Exportsignale enthält. Das CRD-BP ist einem humanen Protein, das bei bestimmten humanen Krebsarten überexprimiert wird, ähnlich. Rekombinantes Maus-CRD-BP bindet spezifisch an c-myc-CRD-RNA in vitro und reagiert mit Antikörpern gegen humanes CRD-BP. In vitro-translatiertes CRD-BP bindet in Abwesenheit von c-myc-mRNA an Ribosomen, und in Zellsysaten ist ein großer Teil des CRD-BP an Ribosomen gebunden.

[0031] Nachstehend beschreiben wir auch vorgeschlagene Verfahren der vorliegenden Erfindung. Bei einer Ausführungsform schlagen wir ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von Krebs in einem humanen Patienten vor, umfassend die Schritte des Untersuchens von Patientengewebe auf die CRD-BP-Expressionsniveaus und Vergleichen dieses Ergebnisses mit einer Kontrollprobe und/oder Untersuchen von Patientenserum auf Antikörper gegen CRD-BP und Vergleichen dieses Antikörperpegels mit dem von normalen Kontrollen (vorzugsweise unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht). Bei der Kontrollprobe für das CRD-BP-Expressionsniveau in Geweben handelt es sich vorzugsweise um ein nicht-krebsartiges Gewebe aus der gleichen Quelle. Beispielsweise würde man die CRD-BP-Pegel einer Testprobe aus Brustgewebe mit den CRD-BP-Pegeln von Brustgewebe, das als nicht-krebsartig bekannt ist, vergleichen.

[0032] Diese Untersuchung kann folgende Formen zum Untersuchen eines rohen Proteinextrakts auf den CRD-BP-Pegel annehmen: vorzugsweise durch einen Zwei-Antikörper-Sandwich-Test, Antigen-Konkurrenz-Test, Antikörper-Abfangtest oder Unterwerfen des rohen Proteinextrakts einem Immunblotting mit einem Antikörper von CRD-BP. Man kann die Zellen in der Gewebeprobe auch direkt auf Anwesenheit oder Abwesenheit von CRD-BP mit Hilfe von immunologischen Verfahren, die Sondieren einer Gewebesektion mit einem Antikörper von CRD-BP umfassen, oder über in situ-Hybridisierungsverfahren, die Sondieren einer Gewebesektion mit einer Nucleinsäuresonde, die für CRD-BP spezifisch ist, umfassen, untersuchen.

[0033] Bei einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um ein Verfahren zur Bestimmung einer Krebserkrankungsprognose.

[0034] Man kann die CRD-BP-Expressionsniveaus in einer Gewebeprobe eines Patienten bestimmen und diese CRD-BP-Pegel mit der Krankheitsprognose korrelieren.

[0035] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich auch um die Verwendung von CRD-BP bei immunologischen Tests, um anti-CRD-BP-Antikörper in Patienserum zu identifizieren und zu quantifizieren. Vorzugsweise kann man rekombinantes CRD-BP in immunologischen Standardtests verwenden. Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich auch um die Verwendung von anti-CRD-BP-Antikörpern, um CRD-BP selbst im Serum von Krebspatienten zu identifizieren und zu quantifizieren.

[0036] Wir gehen davon aus, dass bestimmte Expressionsniveaus von CRD-BP mit bestimmten Krebsarten direkt korreliert werden können, und daher voraussagen können.

[0037] Wir schlagen auch ein ex vivo-Verfahren und die Herstellung von Medikamenten zum Hemmen von Krebszellwachstum durch Entfernen oder Absenken des CRD-BP-Pegels von krebsartigen Zellen vor. Vor-

zugsweise handelt es sich bei diesem Verfahren um bzw. wirkt dieses Medikament durch das Bereitstellen von Konkurrenz-RNA in der Zelle oder die Verwendung eines Inhibitors, der das Binden von CRD-BP-Bindung an c-myc-mRNA-CRD blockiert.

[0038] Mit „CRD-BP“ bezeichnen wir vorzugsweise das Protein, das hier als SEQ ID NO:2 und in der nachstehend genannten Referenz 30, 31 und 32 beschrieben ist.

[0039] Ein typischer Weg zum Erhalten eines CRD-BP-Antikörpers ist es, große Mengen von rekombinatem CRD-BP in entweder bakteriellen Zellen, Hefezellen oder Insektenzellen, die mit dem Baculovirus infiziert sind, herzustellen. Dieses Protein wird dann Kaninchen, Schafen oder Ziegen injiziert, um einen polyklonalen Antikörper herzustellen. Epitop-spezifische Antikörper können auch durch Verwenden von synthetischen Peptiden (8-15 Aminosäuren) als Immunogen hergestellt werden. Dies sind dem Fachmann bekannte Routineverfahren.

B. Nachweisen von CRD-BP in klinischen Proben

[0040] Wir haben vorhergesagt, dass es sich bei dem CRD-BP um ein onkofötales Protein handeln könnte. Diese Hypothese basiert auf unseren Ergebnissen, dass CRD-BP in fötalen Rattengeweben, aber nicht in normalen Geweben adulter Ratten, exprimiert wird. Es wird auch in Gewebekulturzelllinien, die neoplastisch sind, exprimiert.

[0041] Nachstehend zeigen wir in den Beispielen, dass CRD-BP in Tumorgewebe bedeutend reichlicher als in einem normalen adulten Gewebe vorhanden ist. Deshalb stellen wir uns vor, dass die Anwesenheit von CRD-BP in Biopsieproben anzeigt, dass die Proben Tumorzellen enthalten. Wir stellen uns vor, dass die Anwesenheit von CRD-BP Neoplasien anzeigt und ein prognostischer und diagnostischer Indikator sein kann.

[0042] Es gibt viele mögliche Nachweissysteme für CRD-BP. Das beste System wird von den folgenden Variablen abhängen: der Menge von exprimiertem CRD-BP im Tumorgewebe, der Spezifität und der Bindungskraft der Antikörper für CRD-BP, und dem Ausmaß der Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen Proteinen neben CRD-BP. Nachstehend werden verschiedene mögliche Nachweissysteme umrissen.

[0043] Wahrscheinlich ist es am besten sicher zu stellen, dass die Antikörper spezifisch für CRD-BP sind. Dies können wir durch Herstellen von Antikörpern gegen CRD-BP-Peptide oder durch Verwenden von monoklonalen Antikörpern, die auf Westernblots nur mit CRD-BP und nicht mit anderen zellulären Proteinen reagieren, bewerkstelligen.

1. Nachweis von CRD-BP durch Verwenden von Proteinextrakten: Biopsiegewebe kann homogenisiert werden und ein roher Proteinextrakt kann hergestellt werden (Vorschlag).

a. Beispielhafte Nachweissysteme, bei denen Antigen oder Antikörper an einen festen Träger gebunden ist.

i. Zwei-Antikörper-Sandwich-Test:

[0044] Ein monoklonaler Antikörper, der ein CRD-BP-Epitop erkennt, wird an einen festen Träger, wie beispielsweise eine Mikrotitervertiefung gebunden. Der Sandwich-Test könnte auch mit zwei polyklonalen Antikörpern funktionieren, sofern jeder Antikörper gegen ein anderes Epitop im CRD-BP gerichtet ist. Ein Extrakt des Gewebes wird zugegeben und man lässt CRD-BP, das im Extrakt vorliegt, an den Antikörper zu binden. Danach wird ein zweiter monoklonaler Antikörper, der ein anderes CRD-BP-Epitop erkennt, zugegeben. Der zweite Antikörper kann mit ^{125}I oder ^3H markiert sein. Die gebundene Menge des markierten Antikörpers stellt dann ein Maß für die Menge von CRD-BP, die an den ersten Antikörper gebunden ist, bereit.

[0045] Alternativ kann ein markierter sekundärer Antikörper zur Quantifizierung verwendet werden. Dieser sekundäre Antikörper kann mit einem Enzym wie beispielsweise Meerrettich-Peroxidase oder mit einer Sonde wie z. B. Biotin markiert sein. Die Menge des gebundenen sekundären Antikörpers wird dann durch Standardtests nachgewiesen und ist ein Maß für die Menge von CRD-BP im Gewebeextrakt.

ii. Antigen-Konkurrenztest:

[0046] Ein Anti-CRD-BP-Antikörper wird an einen festen Träger wie z. B. eine Mikrotitervertiefung gebunden. Der Gewebeextrakt wird dann mit gereinigtem, radiomarkiertem CRD-BP gemischt. Wenn das Gewebe genügend CRD-BP enthält, konkurriert dieses CRD-BP mit dem markierten CRD-BP um die Bindung an den be-

schränkenden Antikörper. Somit ist die Menge von CRD-BP in dem Extrakt umgekehrt proportional zu der Menge von markiertem CRD-BP, das an die Mikrotitervertiefung gebunden ist. Wir kennen die Nucleinsäuresequenz des humanen CRD-BP-Kodierungsbereichs. Daher sollten wir in der Lage sein, hoch gereinigtes, radiomarkiertes CRD-BP durch Verwenden von Bakterien, Hefe oder Insektenzellen herzustellen.

[0047] Prokipcak, et al. (31) offenbarten ein Verfahren zur Reinigung von CRD-BP. Wir stellen uns auch ein einfacheres Reinigungssystem vor, das zugegebene Epitope ausnutzt. Anstatt unmodifiziertes CRD-BP in Bakterien, Hefe oder Zellen, die mit Baculovirus infiziert sind, herzustellen, könnten wir Molekulartechnologien verwenden, um eine CRD-BP-komplementäre DNA zu entwerfen, die ein „Epitop-markiertes“-CRD-BP erzeugt. Wir könnten das markierte CRD-BP in Zellen exprimieren und danach das CRD-BP in einem einzigen Affinitätsreinigungsschritt, der den Marker ausnutzt, um CRD-BP von allen anderen Zellproteinen zu trennen, reinigen.

iii. Antikörper-Abfangtest:

[0048] Der Gewebeextrakt wird an eine eine Mikrotitervertiefung gebunden. Antikörper wird zugegeben und die Menge des gebundenen Antikörpers bestimmt. Der Antikörper kann markiert oder nicht markiert sein. Falls er nicht markiert ist, wird die gebundene Menge indirekt durch Verwenden von anti-Antikörper-Antikörpern und Nachweisen davon durch Peroxidase oder Biotinmarkierung wie vorstehend beschrieben bestimmt.

b. Exemplarischer Nachweis von CRD-BP durch Immunoblotting (Western Blotting)

[0049] Der Gewebeextrakt wird einer Elektrophorese mit einem denaturierenden Gel unterworfen, und die Proteine werden auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Die Membran wird dann mit einem anti-CRD-BP-Antikörper sondiert und die Menge von gebundenem Antikörper wird durch eines von einer Vielzahl von Nachweisverfahren durch Verwenden von markierten anti-Antikörper-Antikörper bestimmt. Der Nachteil des Western-Blotting ist, dass es zeitaufwändiger ist als Tests, bei denen der Proteinextrakt oder der Antikörper an einen festen Träger gebunden ist. Der Vorteil ist, dass spezifische Wechselwirkungen leichter erkannt werden und Artefakte verhindert werden. Die Anwesenheit von CRD-BP in einem Westernblot wird durch eine Bande im ~68 kDa-Bereich des Gels angezeigt.

[0050] Wir stellen uns vor, dass der Test bis zu dem Ausmaß vereinfacht werden könnte, dass ein Messstäbchen oder kolorimetrischer Test verwendet werden kann.

2. Nachweis von CRD-BP in Zellen durch Immunhistochemie

[0051] Bei einem typischen Verfahren wird das Biopsiegewebe in eine dünne Sektion geschnitten und fixiert und dann durch Verwenden von Standard-immunhistochemischen Verfahren analysiert. Das Nachweissystem wird von der Menge von CRD-BP in dem Gewebe abhängen. Obwohl dieses Verfahren zeitaufwändiger ist als Verfahren durch Verwenden von Gewebeextrakten, kann die Immunhistochemie seltene anormale Zellen identifizieren. Beispielsweise könnte eine Biopsieprobe hauptsächlich normale Zellen mit nur kleinen Flecken neoplastischer Zellen enthalten. Wenn die neoplastischen Zellen CRD-BP exprimieren, können sie durch Immunhistochemie durch Verwenden von CRD-BP-spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

3. Nachweis von CRD-BP in Zellen durch in situ-Hybridisierung

[0052] Bei einem typischen Verfahren wird das Biopsiegewebe in eine dünne Sektion geschnitten und fixiert und dann unter Verwendung von Standard- in situ-Hybridisierungs-Verfahren mit einer CRD-BP-DNA- oder -RNA-Sonde analysiert. Wie im Fall der Immunhistochemie ist ein Vorteil des in situ-Hybridisierungs-Verfahrens, dass seltene krebsartige Zellen inmitten einer Mehrzahl von normalen Zellen nachgewiesen werden können.

C. Nachweisen von CRD-BP oder CRD-BP-Antikörper in Patientenseren

[0053] Das CRD-BP ist ein cytoplasmatisches Protein. Deshalb sollte es in der Regel nicht Immunzellen ausgesetzt sein. Wenn es jedoch in humanen Tumorzellen überexprimiert wird und wenn diese Zellen eine Lyse erfahren oder das Protein aus welchen Gründen auch immer aus den Zellen austritt, könnte das CRD-BP selbst in Patientenseren nachgewiesen werden und/oder Antikörper von CRD-BP könnten bei Patienten mit Tumoren auftreten. Nachweisen von CRD-BP oder von solchen Antikörpern in einer kleinen Menge Patientenserum würde ein schnelles und bequemes Screening für Krebs bereitstellen. Das vorstehende Kapitel führte

Verfahren zum Nachweisen von CRD-BP aus. Strategien zum Nachweisen von anti-CRD-BP-Antikörpern könnten Verfahren ähnlich denen zum Nachweisen von CRD-BP in Gewebeextrakten von Biopsiematerial benutzen. Es gibt viele Wege zum Nachweisen von Antikörpern. Einige dieser Verfahren, die zum Nachweisen von anti-CRD-BP-Antikörpern in Patientenserum geeignet sind, sind nachstehend zusammengefasst.

i. Zwei-Antikörper-Sandwich-Test

[0054] Das CRD-BP selbst wird in Bakterien-, Hefe- oder Insektenzellen durch Verwenden von Standardverfahren hergestellt. Dieses rekombinante CRD-BP wird dann an einen festen Träger, wie z. B. eine Mikrotitervertiefung, gebunden. Das Patientenserum wird zugegeben und dem anti-CRD-BP-Antikörper im Serum wird erlaubt, an das CRD-BP binden. Die Platten werden dann ausgiebig gewaschen und ein zweites anti-humanes Serum wird zugegeben. Der zweite Antikörper kann mit ^{125}I oder ^3H oder mit einem Fluoreszenzmarker markiert sein. So stellt die Menge des gebundenen markierten Antikörpers ein Maß für die Menge von anti-CRD-BP-Antikörper, die an das rekombinante CRD-BP auf der Platte gebunden ist, bereit. Alternativ kann ein markierter sekundärer Antikörper zur Mengenbestimmung verwendet werden. Dieser sekundäre Antikörper kann mit einem Enzym wie z. B. Meerrettich-Peroxidase, oder mit einer Sonde, wie z. B. Biotin, markiert sein. Die Menge von gebundenem sekundären Antikörper wird dann durch Standardtests nachgewiesen und ist ein Maß für die Menge von anti-CRD-BP-Antikörper im Serum des Patienten.

ii. Antikörper-Abfangtest

[0055] Das Patientenserum wird an einen festen Träger, wie z. B. eine Mikrotitervertiefung, gebunden. Danach wird das radiomarkierte, rekombinante CRD-BP zugegeben. Nichtgebundenes CRD-BP wird von der Platte abgewaschen und die Menge von gebundenem Antigen wird gemessen. Das radiomarkierte CRD-BP kann in vivo in Bakterien oder Hefe durch Verwenden von ^{35}S oder in vitro mit radioaktivem Iod markiert werden.

D. Ex vivo-Behandlung von Krebs und Medikamente zur Behandlung von Krebs durch Entfernen von CRD-BP aus den Krebszellen

[0056] Die Grundidee der vorliegenden Erfindung steht hauptsächlich auf der Grundlage zweier Vorstellungen: dass CRD-BP die c-myc-mRNA in Zellen stabilisiert und dass CRD-BP postnatal in Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen, exprimiert wird. Als Ergebnis wird c-myc-mRNA in Tumorzellen überexprimiert oder unangemessen exprimiert. Wenn das CRD-BP entfernt werden könnte, würde c-myc-mRNA destabilisiert. Wenn c-myc-mRNA für das Wachstum oder die Lebensfähigkeit von Tumorzellen essentiell wäre, würden die Tumorzellen zu wachsen aufhören oder absterben. Die Selektivität wäre gewährleistet, wenn das CRD-BP vorwiegend in Tumorzellen exprimiert werden würde.

[0057] Zwei Herangehensweisen zum Eingreifen in die Wechselwirkung von CRD-BP mit c-myc-mRNA sind bevorzugt:

1. Genmanipulation

[0058] Die Art und Weise wie wir c-myc-mRNA in unserem zellfreien mRNA-Abbausystem destabilisiert haben war, überschüssige Konkurrenz-RNA zu den Reaktionen zuzugeben. Die RNA enthält die 180 Nucleotide der c-myc-mRNA-Kodierungsbereichsdeterminante (CRD). Es wird vermutet, dass die Konkurrenz-RNA das CRD-BP von der c-myc-mRNA abtitriert. Als Ergebnis wird die CRD der c-myc-mRNA nicht mehr durch das CRD-BP abgeschirmt und die mRNA wird durch eine Ribonuclease rasch abgebaut.

[0059] Um eine ähnliche Strategie in intakten Zellen zu benutzen, wäre es nötig, Genmanipulationsverfahren anzuwenden, um c-myc-mRNA-CRD-RNA in dem betroffenen Gewebe oder Organ zu überexprimieren. Man könnte DNA, die fähig ist, CRD-Konkurrenz-RNA in dem Gewebe oder Organ zu exprimieren, einführen. Alternativ könnte es machbar sein, eine Ribonuclease-resistente, langlebige Form von CRD-RNA einzuführen. Es ist wichtig anzumerken, dass Spezifität erreicht werden kann, wenn die Target-Krebszellen CRD-BP exprimieren, während es nicht-krebsartige Zellen nicht exprimieren. Unter diesen Umständen hätte die Konkurrenz-CRD-RNA nur auf die Krebszellen eine zerstörende Wirkung.

2. Verwendung eines Inhibitors, der das Binden von CRD-BP an die c-myc-mRNA-CRD hemmt.

[0060] Wir vermuten, dass das CRD-BP in einer solchen Weise gefaltet ist, dass es fähig ist, ein bestimmtes

Segment der c-myc-mRNA zu erkennen, nämlich das CRD-RNA-Segment. Man könnte Peptide oder Nucleinsäureanaloga oder andere Verbindungen entwerfen, die an das CRD-BP binden, um seine Fähigkeit zur Wechselwirkung mit c-myc-mRNA in den Zellen zu hemmen. Das ähnelt Strategien, die in der pharmazeutischen Industrie in Betracht gezogen werden, in der Hoffnung, antivirale Verbindungen mit der Fähigkeit in Zellen einzudringen und mit viral-abstammenden Proteinen und Nucleinsäuren zu wechselwirken, zu entwerfen. Die Protease-Inhibitoren, die bei HIV-infizierten Patienten verwendet werden, sind ein Beispiel eines solchen Arzneimittels, das gegen ein spezifisches virus-kodiertes Produkt gerichtet ist.

BEISPIELE

A. Experimentelle Verfahren

Zelllinien und Herstellung von subzellulären Fraktionen.

[0061] Alle Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) erhalten. K562-humane Erythroleukämiezellen wurden in einem RPMI-1640-Medium, das 10 %-iges Kälberserum und einen Penicillin/Streptomycin-Mix enthielt, kultiviert. NIH/3T3-Zellen wurden in DMEM (4,5 g/l Glucose), das 10 %-iges Kälberserum und Antibiotika enthielt, aufgezogen. Alle Antibiotika und Seren wurden von Gibco/BRL Life Technologies bezogen.

[0062] Subzelluläre Fraktionen wurden wie folgt hergestellt. Alle Stufen, die nach dem Ernten der Zellen folgten, wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden in 1-Liter-Rührkolben bis zu einer Dichte von $3-5 \times 10^5$ Zellen/ml aufgezogen. Sie wurden geerntet, durch niedrigtourige Zentrifugation gesammelt und drei mal mit kaltem F12-Medium ohne Serum gewaschen. Das Zellpellet wurde bei einer Dichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml mit Puffer A (1 mM Kaliumacetat, 1,5 mM Magnesiumacetat, 2 mM DTT, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 7,4), der 100 mM EGTA, 100 mg/ml PMSF und 2 mg/ml von jeweils Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A (alle von Sigma) enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden mit 30-40 Schlägen eines Dounce Homogenisierers lysiert und das Ly-sat wurde 10 Minuten bei $20\,000 \times g$ zentrifugiert, um die Nuklei und andere Organellen zu pelletieren. Der Überstand (S20) wurde über ein Kissen von 30 %-iger (Gew./Vol.) Sucrose, die in Puffer A gelöst war, geschichtet und 2,5 Stunden bei $130\,000 \times g$ zentrifugiert, um die Polysome zu pelletieren. Der Überstand (S130) über dem Sucrosekissen wurde geerntet und das polysomale Pellet in Puffer A, der PMSF, Leupeptin, Pepstatin A und Aprotinin enthielt, resuspendiert. Das S20-Pellet (rohe Nuklei) wurde einmal mit Puffer A gewaschen und zentrifugiert, und das nukleäre Waschungs-material im Überstand wurde geerntet und aufbewahrt. Die pelletierten, gewaschenen Nuklei wurden dann in 300 µl Puffer B (1,5 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl, 20 Glycerin, 10 mM Tris-Cl, pH-Wert 8,0) aufgenommen und durch Zusetzen von 2,7 ml Puffer C (5,0 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-Cl, pH-Wert 6,8) lysiert. Der Extrakt wurde dann 10-mal durch eine 18-er Nadel geführt und 15 Minuten gekocht. Um die ribosomale Salzwäsche (RSW) sowohl von den Gewebekulturzellen als auch von den Retikulozyten-Translationsreaktionen zu isolieren, wurde ein Aliquot von Polysomen 20 Minuten bei 4 °C mit 1 M NaCl in Puffer A inkubiert, gefolgt von einer 2,5-stündigen Zentrifugation bei $130\,000 \times g$, um die mit Salz gewaschenen Polysomen wieder zu pelletieren (26). Glycerin wurde auf 10 % zu dem Überstand (RSW) über dem Sucrosekissen zugegeben, und die mit Salz gewaschenen Polysomen wurden in Puffer A, der die Proteaseinhibitoren enthielt, resuspendiert. Alle Fraktionen wurde bei -70 °C aufbewahrt.

Proteinreinigung und Mikrosequenzierung.

[0063] Das humane c-myc-CRD-BP wurde von der K562-Zell-RSW wie in (31) beschrieben gereinigt. Zwei unabhängige Präparationen von CRD-BP aus verschiedenen RSW-Isolierungen wurden für die vorliegende Untersuchung mikrosequenziert. Die erste Sequenz wurde an der Protein Sequence and Peptide Synthesis Facility of the University of Wisconsin Biotechnology Center (Madison, WI) bestimmt. Die zweite Sequenz war von der ersten verschieden, überlappte nicht und wurde an den Keck Laboratories, Yale University (New Haven, CT) bestimmt. Die zweite Sequenz wurde zur Herstellung von PCR-Primern verwendet.

Klonieren von Maus-CRD-BP-cDNA

1. CRD-BP-cDNA-Klonierung.

[0064] Zuerst stellten wir eine humane CRD-BP-cDNA her und verwendeten ihre Sequenz, um Maus-CRD-BP-cDNA zu identifizieren. DNA-Oligomere wurden durch die Nucleic Acid Sequence and Oligomer Synthesis Facility of the University of Wisconsin Biotechnology Center (Madison, WI) oder durch GIB-

CO-BRL Life Technologies (Grand Island, NY) synthetisiert. Eine K562-(Human)-Zell-cDNA-Lambda-Genbank (Clontech, Palo Alto, CA) wurde zuerst mit einer degenerierten PCR durchgemustert (engl.: screened), um eine 45 bp große DNA-Sequenz auf der Grundlage von 15 Aminosäuren der zweiten CRD-BP-Peptidsequenz zu amplifizieren. Die folgenden Primer wurden verwendet: 5'-GTBAAYGARYTBCARAA-3' (kodierend) (SEQ ID NO: 31) und 5'-GGVACVACVACYTCDGC-3' (nicht-kodierend) (SEQ ID NO: 32). Die Bedingungen waren 30 Zyklen, 30 Sekunden 94 °C, 30 Sekunden 45 °C, 1 Minute 72 °C, AMPLITAQ DNA Polymerase (Perkin Elmer). Die PCR-Produkte von diesen und den nachfolgenden Reaktionen wurden direkt in pT7 Blue (Novagen, Madison, WI) zur Sequenzierung, die durch PCR durch Verwenden eines ABI Prism AmpliTaq FS Dye Terminator Reaction Kit (Applied Biosystems, Inc.) gemäß Herstellerempfehlungen durchgeführt wurde, subkloniert. Ein 45 bp-Produkt, das die erwartete 15 Aminosäure-Sequenz kodiert, wurde auf diese Weise isoliert. Die gleiche cDNA-Genbank wurde dann für eine nicht-degenerierte PCR mit einem CRD-BP-spezifischen Kodierungsprimer aus der Mitte der 45 bp-Sequenz (5'-GCTGCCGTCAAATTCTG-3') (SEQ ID NO: 33) und einem lambda-spezifischen Primer (5'-TCGACGGTTTCCATATG-3') (SEQ ID NO: 34) unter den folgenden Bedingungen verwendet: 30 Zyklen, 30 Sekunden 94 °C, 30 Sekunden 50 °C, 3 Minuten 72 °C, AMPLITAQ DNA Polymerase. Diese Stufe erzeugte eine 227 bp große cDNA. Die gleiche Genbank wurde dann ausplattiert, in zweifacher Ausfertigung auf Nitrocellulosefilter übertragen und durch Hybridisierung mit der 227 bp-³²P-DNA als Sonde durchgemustert. Dieser Schritt erzeugte eine partielle humane CRD-BP-cDNA von 1069 bp mit einem offenen Leseraster, die beide Peptide, die durch Sequenzieren der gereinigten CRD-BP erhalten waren, kodierte. Diese cDNA enthielt nicht den 5'-Teil des Kodierungsbereichs, den 5'-UTR oder den größten Teil des 3'-UTR.

[0065] Um das Klonieren des 3'-terminalen Bereichs zu vervollständigen, wurde eine schnelle 3'-Amplifikation der cDNA-Enden (3'-RACE) durchgeführt. Das Oligomer Not(dT) (5'-AACCCGGCTCGAGCGGCCGCTT-TTTTTTTTTTTTTTTT-3') (SEQ ID NO: 35) und Superscript II (GIBCO-BRL) wurden gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet, um 0,5 µg K562-Zell-poly(A) + mRNA revers zu transkribieren. Die cDNA-Matrize wurde dann unter Verwendung von VENT DNA Polymerase (New England Biolabs) mit den Oligomeren CRD-BP1 (5'-ACGGCAGCTGAGGTGGTAGTACC-3') (SEQ ID NO: 36) und NotAdaptmer (5'-AACCCGGCTC-GAGCGGCCGCT-3') (SEQ ID NO: 37) als 5'- bzw. 3'-Primer amplifiziert. Die Bedingungen waren 1 Zyklus mit 1 Minute 94 °C, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 Sekunden 94 °C, 30 Sekunden 60 °C, 1,5 Minuten bei 72 °C.

2. Klonieren von Maus-CRD-BP-cDNA.

[0066] Die partielle humane CRD-BP-cDNA, die wie vorstehend beschrieben erzeugt wurde, wurde verwendet, um Maus-CRD-BP-cDNA in der EST-Datenbank unter Verwendung des NCBI-Blast-Programms zu identifizieren. Die größere der beiden ESTs, AA073514, wurde von Genome Systems, Inc. (St. Louis, MO) erhalten und wurde sequenziert. Die von ihr kodierte Aminosäuresequenz war zu 99 % identisch mit der unseres humanen CRD-BP, was zeigt, dass sie dem Maus-CRD-BP entspricht. Sie enthielt den gesamten 3'-UTR und den größten Teil des Kodierungsbereichs. Um die 5'-Sequenz zu verlängern, wurde ein 5'-RACE mit einer 17-Tage-alten Maus embryonalen Marathon-Ready-cDNA-Genbank (Clontech) unter Verwendung einer ADVANTAGE KlenTaq DNA Polymerase (Clontech) gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Bei den ersten Reaktionen wurde eine "touchdown PCR" mit den Oligomeren AP1 (Clontech) und CRD-BP2 (5'-AGGTTCCGTCCTTCCTTGCCAATG-3') (SEQ ID NO: 38) als 5' bzw. 3'-Primer durchgeführt. Die Bedingungen waren 1 Zyklus von 1 Minute 94 °C, 5 Zyklen von 10 Sekunden 94 °C, 7,5 Minuten 72 °C, 5 Zyklen von 10 Sekunden 94 °C, 7,5 Minuten 70 °C, 20 Zyklen von 10 Sekunden 94 °C, 7,5 Minuten 68 °C, 10 Zyklen von 10 Sekunden 94 °C, 20 Sekunden 60 °C, 7,5 Minuten 68 °C. Die DNA-Banden wurden aus einem 1 %-igen Agarosegel ausgeschnitten, und mit diesen wurde eine zweite PCR durch Verwenden von geschachtelten (engl.: nested) 5'- und 3'-Primern [Oligomere AP2 (Clontech) bzw. CRD-BP3 (5'-AACTTCATCTGCCGTTTTGG-5') (SEQ ID NO: 39)] durchgeführt. Die Bedingungen waren 1 Zyklus von 1 Minute 94 °C, gefolgt von 25 Zyklen von 15 Sekunden 94 °C, 30 Sekunden 60 °C, 5 Minuten 68 °C. Da der erzeugte Klon keine Translations-Startstelle oder irgendeinen 5'-UTR enthielt, wurde eine Maus-BAC-Genbank auf das CRD-BP-Gen durch PCR mit den Primern CRD-BP4 (5'-CATCAACTGGAGAACCATG-3') (SEQ ID NO: 40) und CRD-BP5 (5'-GACTGCGTCTGTTTTGTGATG-3') (SEQ ID NO: 41) durchgemustert. Ein BAC-Klon, der das Maus-CRD-BP-Gen enthält, wurde von Genome Systems erhalten. Der Rest des Kodierungsbereichs und wenigstens ein Teil des 5'-UTR wurde von diesem BAC-Klon durch Verwenden von Oligomer CRD-BP6 (5'-CTGTAGGAGATCTTGTGCTC-3') (SEQ ID NO: 42) als Primer sequenziert. Sequenzvergleiche wurden durch Verwenden von Bestfit- und Gap-Algorithmen der Genetics Computer Group (GCG) erzeugt. Theoretische Translationen wurden mit dem „GCG Translate program“ durchgeführt.

In vitro-Translation von Maus-CRD-BP.

[0067] Ein Teil des Maus-CRD-BP wurde in pSPUTK (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert, um den Transla-

tionsklon pSPUTK-CRD-BP wie folgt zu erzeugen: die Mutation einer einzelnen Base (unterstrichen) wurde in dem 5'-Primer (5'-CGCACC GCC ACC ATGACAAGCTTTACATCGG-3') (SEQ ID NO: 43) durchgeführt, um eine NcoI-Stelle zum Subklonieren zu erzeugen. Die Mutation ersetzt ein Asparagin durch eine Asparaginsäure. Der 3'-Primer (5'-ACTGGGATCTGACCCATCCT-3') (SEQ ID NO: 44) gehörte zu dem CRD-BP-3'-UTR. Die Bedingungen waren 1 Zyklus von 1 Minute 94 °C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 Sekunden 94 °C, 30 Sekunden 55 °C, 3 Minuten 68 °C. pSPUTK-CRD-BP, pSPUTK-Luciferase oder pSPUTK Vektormatrizen wurden unter Verwendung von TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) gemäß den Herstelleranweisungen transkribiert und translatiert.

Immunpräzipitation, Immunblotting und Gelretardationstests.

[0068] Die Immunpräzipitation (IP) von 60S-ribosomalen Untereinheiten wurden im Wesentlichen wie bereits beschrieben (33) durchgeführt. Kurz gesagt wurde humanes anti-P-Proteinserum (Immunovision) oder normales humanes Serum an Protein-G-Plus-Sepharosekügelchen (Oncogene Science) konjugiert. Das anti-P-Proteinserum erkennt drei Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (P_0 -38 kDa, P_1 -19 kDa, P_2 -17 kDa; Ref. 34). Die K562-Polysome wurden durch 20 minütige Inkubation mit 20 mM EDTA bei 4 °C zu mRNP und ribosomalen Untereinheiten dissoziiert. Protein-G-Plus-Sepharose-konjugierte Antikörper wurden dann mit 10 µl der dissoziierten Polysomen in IP-Puffer (100 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 100 µg/ml PMSF, 0,5 % Aprotinin und 2 µg/ml von jeweils Leupeptin und Pepstatin A, 10 mM HEPES, pH-Wert 7,3) bei 4 °C für 16 Stunden untermäßigem Rühren inkubiert. Die Kügelchen wurden dreimal 20 Minuten jeweils bei 4 °C mit IP-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Resuspendieren der Kügelchen in Puffer D (2,3 % SDS, 10 % Glycerin, 62,5 mM Tris-Cl, pH-Wert 6,8) und Inkubieren der Kügelchen von 5 Minuten bei 95 °C eluiert.

[0069] Das Immunblotting wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (32). Bezüglich CRD-BP handelte es sich bei dem primären Antikörper um ein anti-CRD-BP-IgY aus Huhn, der gegen das gereinigte humane Protein gebildet wurde (31, 32), und bei dem sekundären Nachweisantikörper handelte es sich um ein Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Kaninchen-anti-Huhn-IgY (Promega). Bezüglich der ribosomalen P-Proteine handelte es sich beim Primärantikörper um humanes anti-P-Proteinserum (siehe oben), und beim sekundären Nachweisantikörper handelte es sich um HRP-konjugiertes Ziege-anti-Human-IgG (Promega). Bezüglich des Hitzeschockproteins-90 (HSP 90) handelte es sich bei dem Primärantikörper um ein Kaninchen-anti-Maus-HSP-90-polyklonales IgG (eine freundliche Überlassung von Dr. Alan, Polen), und bei dem sekundären Nachweisantikörper handelte es sich um ein HRP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Sigma). Die Blots wurden durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL) durch Verwenden von entweder Standard-(Amersham) oder Supersignal ULTRA (Pierce)-Reagenzien entwickelt. Getrennte Banden wurden mit präimmunem Antikörpern, normalem humanem Serum oder sekundären Antikörpern allein nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Wo gezeigt, wurden die Blots 30 Minuten bei 50 °C mit 2 %-igem SDS, 100 mM β -mercaptoethanol, 50 mM K_2HPO_4 , pH-Wert 6,8 gestriipt und dann ausgiebig mit Puffer, der 5 %-ige fettfreie Trockenmilch enthielt, gewaschen, um das SDS und das β -Mercaptoethanol zu entfernen. Gelretardationstests wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (31, 32).

Sucrosegradienten-Zentrifugation und ribosomale RNA-Analyse.

[0070] Alle Vorgänge wurden bei 4 °C durchgeführt. Um die CRD-BP-Assoziation an ribosomale Untereinheiten zu analysieren, wurde ein Aliquot von K562-Zellpolysomen (50 µl) oder eines cytoplasmischen Lysats (S20; 150 µl) auf eine Endkonzentration von 20 mM EDTA gebracht. Das Material wurde mäßig gemischt, 20 Minuten auf Eis belassen, über einen 10 ml-linearen 5-30 %-igen Sucrosegradienten mit Puffer E (100 mM KCl, 10 mM Kaliumacetat, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM HEPES, pH-Wert 7,3) geschichtet (33), und in einem Beckman SW41.1-Rotor 4 Stunden bei 4 °C, 38 000 rpm ($178\,000 \times g$) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden nacheinander 500 µl-Fractionen von dem oberen Ende des Gradienten pipettiert. Das Pellet am unteren Ende des Röhrchens wurde in 500 µl Puffer E, der 5 % Sucrose enthielt, resuspendiert. Die Proteine wurden mit Methanol und Chloroform vor dem Immunblotting ausgefällt. Von jeder Fraktion wurde RNA unter Verwendung von TRIzol-Reagens (Gibco/BRL) gemäß Herstelleranweisungen isoliert und wurde in einem 1 %-igen Agarosegel, das 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM MOPS, pH-Wert 7,0 enthielt, einer Elektrophorese unterzogen. Ribosomale DNA-Banden wurden durch Färben mit Ethidiumbromid (0,05 µg/ml) sichtbar gemacht.

[0071] Rekombinantes, ^{35}S -markiertes CRD-BP oder Luciferase wurde mit Retikulozyten-Extrakten synthetisiert und durch Sucrosegradientenzentrifugation analysiert, im Wesentlichen wie bereits beschrieben (35) mit geringfügigen Änderungen. Die Reaktionen (100 µl) wurden auf Eis gekühlt, über einen 4ml linearen 20-40 %-igen Sucrosegradienten, der 25 mM Kaliumacetat, 1,5 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 20 mM Tris-Cl,

pH-Wert 7,2 enthielt, geschichtet und in einem Beckman SW60-Rotor 5 Stunden bei 4 °C, 133 000 × g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden nacheinander vom oberen Ende des Gradienten pipettiert und jeweils 5 µl davon wurden auf einem 10 %-igen SDS-PAG einer Elektrophorese unterzogen. CRD-BP in gesamter Länge und das Luciferaseprotein wurden durch eine Phosphorimager-Analyse durch Verwenden des ImageQuant-Programms (Molecular Dynamics) quantifiziert. Die ribosomale RNA einer jeden Fraktion wurde extrahiert, einer Elektrophorese auf einem 1 %-igen Agarosegel unterzogen und durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

B. Ergebnisse

Klonieren der cDNA, die CRD-BP, ein neues KH-Domäne-RNA-bindendes Protein, kodiert.

[0072] In getrennten Experimenten wurden zwei Präparationen von hoch-gereinigtem CRD-BP aus den humanen K562-Zellpolysomen isoliert. Jede Präparation wurde mikrosequenziert, und jede ergab eine andere, nichtüberlappende Sequenz, wobei es sich bei der ersten um P-A-Q-V-G-A-I-Q/I-G-k/r-I/K-Y/G-Q-X-i/I-k (SEQ ID NO: 45) und bei der zweiten um -N-E-L-Q-N-L-T-A-A-E-V-V-V-P (SEQ IDNO: 46) handelte. Kleinbuchstaben zeigen Residuen an, die eine geringere Zuverlässigkeit als die mit Großbuchstaben aufweisen. Eine K562-cDNA-Genbank wurde dann mit PCR durch Verwenden von degenerierten Primern auf Grundlage von Amino- und Carboxylenden des zweiten Peptids durchgemustert (experimentelle Verfahren). Ein 45 bp-Produkt wurde erzeugt, subkloniert, sequenziert und von ihm gefunden, dass es die zweite Aminosäuresequenz kodiert. Nachfolgende PCR-Amplifikation und Genbank-Screening identifizierte eine partielle humane cDNA von 1069 bp, die ein offenes Leseraster (ORF) enthielt, der beide Peptidsequenzen, die durch Mikrosequenzieren erhalten waren, einschloss.

[0073] Um unsere Untersuchung der Eigenschaften und Entwicklungsregulierung des Maus-CRD-BP fortzusetzen, nutzten wir die humane cDNA-Sequenz, um eine mögliche Maus-CRD-BP-cDNA zu isolieren (experimentelle Verfahren). Ein Klon, der wenigstens einen Teil des 5'-UTR, einen vollständigen Kodierungsbereich und einen vollständigen 3'-UTR enthielt, wurde erhalten und sequenziert (**Fig. 1**). Zwei AUG-Startkodons im Raster befinden sich nahe dem 5'-Ende der cDNA. Wir haben das stromabwärts-AUG vorläufig als Translationsstartstelle benannt, da es in eine Sequenz eingebunden ist, die als Translationsstartsignal bevorzugt ist (36). Im Gegensatz dazu liegt das stromaufwärts-AUG nicht innerhalb eines bevorzugten Translationsstartmotivs.

[0074] Die vorhergesagte Sequenz der murinen cDNA enthält mehrere KH-Domänen und eine RGG-Box, wobei es sich um charakteristische Motive, die in einigen RNA-bindenden Proteinen gefunden werden, handelt. Es gibt vier KH-Domänen, die in zwei Paaren von Wiederholungen angeordnet sind (**Fig. 1**, doppelt unterstrichen). Jedes Wiederholungspaar ist durch etwa 30 Residuen getrennt, und die beiden Wiederholungspaare sind durch 78 Residuen getrennt. Die mögliche RGG-Box (mit einem Kasten versehen) ist stromaufwärts der KH-Domänen angeordnet. Es gibt zwei mögliche nukleäre Exportsignale (überstrichen). Eines ist ähnlich demjenigen, das im FMR-RNA-bindenden Protein (FMRP), das mit familiärer Geistesschwäche in Zusammenhang steht (37-38). Das andere ist ähnlich dem des HIV Rev-Proteins. Es gibt auch ein mögliches nukleäres Ortssignal (unterstrichen).

[0075] Die RGG-, Nukleärexport- und KH-Domänen-Bereiche des CRD-BP sind denjenigen ähnlich, die in verschiedenen anderen RNA-bindenden Proteinen gefunden wurden (**Fig. 2**). Ferner sind die humanen und murinen CRD-BP-Sequenzen einer humanen cDNA, die hKOC, ein Akronym für humanes KH-Domänen-Protein genannt wird, das bei humanem Krebs überexprimiert wird, ähnlich (**Fig. 2**). Das offene Leseraster von hKOC kodiert ein Protein von unbekannter Funktion, das auf Grund seiner Überexprimierung in humanem Pankreaskrebsgewebe kloniert wurde (40). Der Maus-CRD-BP-Kodierungsbereich ist mit dem Kodierungsbereich des humanen CRD-BP auf Nucleinsäure- und Proteinsequenzebene zu 88,8 % bzw. 99,1 % identisch. Im Vergleich dazu ist Maus-CRD-BP mit dem hKOC-Kodierungsbereich auf Nucleinsäure- und Proteinsequenzebene zu 66,6 % bzw. 74,0 % identisch. Auf der Grundlage dieses Vergleichs und der nachstehend gezeigten Daten schließen wir, dass unsere cDNA CRD-BP kodiert und nicht das Maus-Homologe des humanen KOC ist. Weitere Hinweise (nachstehend gezeigt) legen nahe, dass das CRD-BP und das hKOC Mitglieder einer neuen Unterfamilie der KH-Domäne-enthaltenden RNA-bindenden Proteine sind.

Vergleich von in vitro-synthetisiertem CRD-BP mit aus Zellen stammenden CRD-BP.

[0076] Um zu bestimmen, ob unser muriner cDNA-Klon CRD-BP mit den erwarteten Eigenschaften eines c-myc-mRNA-bindenden Proteins in voller Länge kodiert, synthetisierten wir das Protein in vitro und analysier-

ten es durch Immunoblotting und Gelretardationstests. Die Retikulozyten-Transkriptions-/Translationsreaktionen wurden mit CRD-BP-cDNA, die in einen pSPUTK-Vektor subkloniert war, programmiert. Die CRD-BP-Sequenzen im Subklon begannen mit dem AUG, das als Translationsstartstelle in **Fig. 1** bezeichnet ist. Dieser Subklon enthielt den stromaufwärts-AUG und innerhalb des Rasters nicht. Der Translationsextrakt wurde durch ein SDS-PAGE fraktioniert und durch Immunoblotting mit einem anti-CRD-BP-Antikörper analysiert. Ein ~68 kDa großes Protein aus der cDNA-Translation wurde durch den anti-CRD-BP-Antikörper erkannt und wanderte nahe an die Positionen der authentischen CRD-BPs aus humanen (K562)- und Maus-(NIH/3T3)-Zellen (**Fig. 3**, Bahnen 1-3). Eine immunreaktive Bande wurde bei Kontrollbanden, die dem Extrakt, der mit dem pSPUTK-Vektor (**Fig. 3**, Bande 4) oder mit Luciferase-cDNA (Daten nicht gezeigt) programmiert war, enthielten, nicht beobachtet, was zeigt, dass der Antikörper spezifisch das CRD-BP nachweist und nicht ein endogenes, Retikulozyten-Protein. Deshalb kodiert unsere cDNA CRD-BP. Bei der kreuzreaktiven Bande (p85), die in den K562- und NIH/3T3-RSW-Bahnen zu sehen ist, handelt es sich um ein Protein, das bereits beobachtet wurde (32). Seine Identität und Funktion sind nicht bekannt. p85 bindet nicht an c-myc-CRD-RNA (32) und befindet sich in anderen subzellulären Fraktionen im Vergleich zu CRD-BP (siehe unten).

[0077] Die Gelretardationstests wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob rekombinantes CRD-BP spezifisch an c-myc-CRD-RNA binden könnte. Bei Vorläuferexperimenten bemerkten wir, dass der größte Teil des rekombinanten CRD-BPs mit Retikulozyten-Ribosomen co-fraktioniert (siehe unten). Deshalb wurden die Gelretardationstests durch Verwenden von RSW aus Zellen oder von Retikulozyten-Translationsreaktionen durchgeführt. Die RSWs wurden mit c-myc-CRD-³²P-RNA inkubiert und die RNA/Protein-Komplexe wurden durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese von freier ³²P-RNA getrennt. Ein RNA/Protein-Komplex wurde mit Protein aus K562-Zellen und aus dem Translationsextrakt, der mit CRD-BP-cDNA programmiert war, beobachtet (**Fig. 4A**, Bahnen 1 bzw. 2). Diese Komplexe wanderten zu ähnlichen oder zu identischen Positionen im Gel. Ein RNA/Proteinkomplex wurde mit dem Protein der Luciferase (Luc)-Kontrollreaktion, der Vektorkontrollreaktion oder der Kontrollreaktion ohne mRNA (OHNE) nicht beobachtet (**Fig. 4A**, Bahnen 3-5). Deshalb assoziiert das in vitro-synthetisierte CRD-BP, wie sein Gegenstück aus Zellen, mit c-myc-CRD-RNA in vitro.

[0078] Eine frühere Arbeit zeigte, dass aus Zellen stammendes CRD-BP nicht an andere von uns getestete RNA bindet, was nahe legt, dass es eine deutliche Spezifität für c-myc-CRD-RNA aufwies (30, 31). Ein Konkurrenztest wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob rekombinante CRD-BP ähnliche Spezifität aufweist. RNA-Protein-bindende Reaktionen enthielten c-myc-CRD-³²P-RNA als Sonde und RSW als Proteinquelle. Die Reaktionen wurden nicht mit Konkurrenz-RNA oder mit einem 200-fachen molaren Überschuss von entweder nichtmarkierter c-myc-CRD-RNA oder β -Globin-RNA ergänzt. Die CRD-BP/CRD-³²P-RNA-Komplexe wurden durch Überschuss von nichtmarkierter CRD-RNA, aber nicht mit β -Globin-RNA (**Fig. 4B**), in Konkurrenz gebracht. Dieses Ergebnis bestätigt weiter, dass diese cDNA funktionales c-myc-CRD-BP kodiert.

Co-Fraktionierung von rekombinantem CRD-BP mit Ribosomen in Retikulozyten-Extrakten.

[0079] Wie vorstehend ausgeführt, zeigten Vorläuferexperimente, dass ein hoher Prozentsatz von rekombinantem CRD-BP mit Retikulozyten-Polysomen co-sedimentierte. Es war wichtig, dieses Ergebnis zu bestätigen, da Retikulozyten keine c-myc-mRNA enthalten, wie durch Northernblotting bestimmt. Deshalb war es möglich, dass CRD-BP ähnlich wie FMRP (33) eine Affinität für Ribosomen sogar in Abwesenheit von dem, was wir für seinen natürlichen mRNA-Liganden halten, aufweist. ³⁵S-Markiertes CRD-BP und Luciferase wurden in Retikulozyten-Extrakten synthetisiert und jeder Extrakt wurde in einem Sucrosegradienten sedimentiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und mit Gelelektrophorese auf den Ribosomengehalt und mit Gelelektrophorese und Phosphorimager-Analyse auf das Protein getestet. Während die gesamte Luciferase nahe dem oberen Ende des Gradienten sedimentierte (**Fig. 5**, offene Kreise), co-sedimentierte mehr als 95 % des CRD-BP mit Monosomen und ribosomalen Untereinheiten (gefüllte Kreise). Deshalb kann CRD-BP in vitro an Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten in Abwesenheit von c-myc-mRNA binden.

Lokalisierung von CRD-BP im Cytoplasma und Co-Fraktionierung mit Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten.

[0080] Das CRD-BP ist hauptsächlich in der cytoplasmatischen Fraktion von K562-Zellextrakten zu finden, und ein großer Teil ist mit Polysomen assoziiert (Ref. 31 und nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtung steht im Einklang mit seiner vermeintlichen Rolle als mRNA-bindendes Protein. Die Menge an CRD-BP pro K562-Zellen übersteigt jedoch die Menge von c-myc-mRNA um mindestens das 1000-fache (31). Mehrere Faktoren könnten zu dem „überschüssigen“ CRD-BP in diesen Zellen beitragen: i) Das CRD-BP könnte neben c-myc mit anderen mRNAs assoziiert sein. ii) Ein Teil davon könnte mit Ribosomen und/oder ribosomalen Untereinheiten assoziieren, wie es bei FMRP der Fall ist (33). Eine Assoziation zwischen CRD-BP und Riboso-

men in Zellen würde mit der Assoziation von neusynthetisiertem CRD-BP mit Retikulozyten-Ribosomen in Einklang stehen ([Fig. 5](#)). Zur Zeit laufen Experimente, um zu bestimmen, ob das CRD-BP in Zellen an c-myc-mRNA gebunden ist. Um zu bestimmen, wie viel davon mit Zellribosomen und ribosomalen Untereinheiten co-fraktioniert, und wie viel, wenn überhaupt, mit Nuklei co-fraktioniert, wurden exponentiell wachsende K562-Zellen geernetet, lysiert, und in 6 Fraktionen getrennt (experimentelle Verfahren). Gleiche Zelläquivalente jeder Fraktion wurden durch Immunblotting mit einem CRD-BP-Antikörper analysiert. Mindestens 95 % des gesamten Zell-CRD-BPs befand sich in der Polysomfraktion, und mehr als 90 % dieses CRD-BPs wurde mit der einsmolaren Salzwäsche eluiert ([Fig. 6A](#), RSW). Wenig oder kein CRD-BP wurde in Fraktionen, die Nuklei oder post-polysomalen Überstand enthielten, nachgewiesen ([Fig. 6A](#), Nuklei bzw. S130). Die Abwesenheit von CRD-BP in diesen Fraktionen konnte nicht durch nichtunterscheidende Proteolyse während der Probenpräparation erklärt werden, da HSP-90 in allen Fraktionen nachgewiesen werden konnte ([Fig. 6B](#)). Etwas p85 wurde sowohl in den nukleären als auch in den polysomalen Fraktionen nachgewiesen. Dieses Ergebnis, in Zusammenhang mit denen, die nachstehend gezeigt werden, erhärten weiter, dass sich CRD-BP und das kreuzreagierende p85 nicht gemeinsam in den Zellen anordnen und dass sie funktionell verschiedene Proteine sind.

[0081] Um zu bestimmen, ob wenigstens etwas CRD-BP mit ribosomalen Untereinheiten assoziiert ist, wurden K562-Zellpolysomen durch Zentrifugation gereinigt, und dann in einem Puffer, der 20 mM EDTA, das Polysome in ribosomale Untereinheiten und freie mRNP dissoziiert, enthielt, resuspendiert. Die EDTA-behandelten Polysome wurden dann mit einem Sucrose-Gradienten fraktioniert. Jede Gradientenfraktion und das Material im Pellet am Boden des Röhrchens wurde durch Gelelektrophorese auf den ribosomalen RNA-Gehalt und durch Immunblotting auf CRD-BP analysiert. Die kleinen ribosomalen Untereinheiten sedimentierten hauptsächlich in den Fraktionen 6-11, während die großen Untereinheiten in den Fraktionen 10-14 zu finden waren ([Fig. 7](#), Felder A und B). Das CRD-BP co-sedimentierte mit den Untereinheiten und wurde auch in dem pelletierten Material, von dem zu erwarten ist, dass es undissoziierte Polysome und Monosome enthält, nachgewiesen ([Fig. 7C](#)). Deshalb co-fraktioniert CRD-BP mit den ribosomalen Untereinheiten in K562-Zellen. Die Natur der CRD-BP/Untereinheit-Assoziation ist unklar. In Anbetracht des breiten Fraktionenbereichs von CRD-BP haben wir nicht versucht, die relativen CRD-BP-Pegel von einer Fraktion zur nächsten zu quantifizieren.

[0082] Die Daten von Gelretardationsgels und RNA-Protein-Bindungsexperimente zeigen, dass p85 nicht an die c-myc-CRD-RNA bindet (31, 32). [Fig. 7C](#) zeigt auch, dass der kleine Anteil von p85, der mit den Polysomen gemeinsam ausfällt, nicht an die dissoziierten ribosomalen Untereinheiten gebunden ist. Vielmehr sedimentiert er am oberen Ende des Gradienten ([Fig. 7C](#)). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Verwenden von rohem cytoplasmatischen Lysat (S20), das mit EDTA behandelt war, erhalten (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass p85 mit polyklonalen anti-CRD-BP-Antikörpern reagiert, aber nicht an c-myc-mRNA bindet (30,31) und in den Zelllysaten nicht mit dem CRD-BP co-fraktioniert.

[0083] Um die Assoziation von CRD-BP mit ribosomalen Untereinheiten durch Verwenden eines unabhängigen Verfahrens zu bestätigen, wurden Immunpräzipitations(IP)-Experimente unter Verwendung von P-Protein-Antikörpern, die spezifisch mit an die große (60S)-Untereinheit assoziierten Proteine reagieren, durchgeführt. Die K562-Zellpolysome wurden in Gegenwart von 20 mM EDTA in Untereinheiten dissoziiert und mit anti-P-Antikörperserum oder normalem humanen Serum immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden dann durch Immunoblotting durch Verwenden von Antikörpern gegen P-Proteine und das CRD-BP analysiert. Die anti-P-Protein-Antikörper immunpräzipitierten wie erwartet die drei 60S-Proteine (P_0 , P_1 und P_2) ([Fig. 8A](#), Bahn I). Keines dieser Proteine wurde durch normales humanes Serum immunpräzipitiert (Bahn N). Die anti-P-Protein-Antikörper immunpräzipitierten auch das CRD-BP ([Fig. 8B](#), Bahn I). Diese Ergebnisse bestätigen, dass das CRD-BP mit den ribosomalen Untereinheiten in K562-Zellextrakten assoziiert ist.

C. Diskussion

[0084] Es wird vermutet, dass CRD-BP c-myc-mRNA durch Abschirmen ihres Kodierungsbereiches vor endonukleolytischem Angriff stabilisiert (22, 30, 31). In dieser Hinsicht könnte es dem „iron response“-Protein ähnlich sein, das an den 3'-UTR der Tranferrin-Rezeptor-mRNA bindet und ihn schützt (Übersicht in 41). Das CRD-BP unterscheidet sich jedoch von dem „iron response“-Protein und von vielen anderen mRNA-bindenden Proteinen in wenigstens zwei Punkten. (i) Die meisten solcher Proteine binden innerhalb des 3'-UTR, während CRD-BP an den c-myc-mRNA-bindenden Bereich bindet. Es bindet in vitro an keine RNA-Substrate von nichttranslatierten c-myc-Bereichs (30). Der Kodierungsbereich von c-fos-mRNA enthält ebenfalls eine mRNA-Halbwertsdeterminante, die eine Proteinbindungsstelle ist (42). Möglicherweise betrifft die Funktion der myc- und fos-mRNA-Kodierungsbereichsdeterminanten und ihre entsprechenden Bindungsproteine die Regu-

lation von myc- und fos-Proteinexpression. (ii) Das c-myc-CRD-BP wird entwicklungsbezogen reguliert und reichlich im fötalen und neonatalen Leben, aber nicht in adulten Tieren exprimiert (32). Möglicherweise weist CRD-BP eine spezielle Rolle bei der embryonalen/fötalen Entwicklung auf.

[0085] Das CRD-BP enthält vier KH-Domänen und eine RGG-Box und co-fraktioniert mit Polysomen und ribosomalen Untereinheiten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit seiner Eigenschaft als RNA-bindendes Protein, dessen Funktion sich in gewisser Weise auf Translation und/oder mRNA-Metabolismus bezieht. Das CRD-BP co-fraktioniert auch mit Ribosomen in Abwesenheit von c-myc-mRNA ([Fig. 5](#)). Möglicherweise ist es sowohl an c-myc-mRNA als auch an Ribosomen in intakten Zellen gebunden. Wenn das der Fall ist, könnte es mit den translatierenden Ribosomen als ein Reservoir zu der Verwendung, um bei Bedarf an jedes ungeschützte c-myc-mRNA-Molekül binden, mitgetragen werden. Das CRD-BP enthält auch eine mögliche nukleäre Ortssequenz und zwei mögliche nukleäre Exportsequenzen ([Fig. 1](#) und [2](#)). Wir wissen nicht, ob CRD-BP zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma pendelt. Falls es pendelt, scheint es jedoch die meiste Zeit im Cytoplasma von wachsenden Zellen zu verbringen, da nur wenig von ihm im Nukleus in „steady state“ gefunden wird ([Fig. 6](#)).

[0086] Es steht mit den vorstehend genannten einzigartigen Merkmalen von CRD-BP im Einklang, dass CRD-BP und hKOC-Protein eine eigene Unterfamilie der KH-Domänen-enhaltenden RNA-bindenden Proteinen darzustellen scheinen. Andere mögliche RNA-bindende Proteine, einschließlich des FUSE-bindenden Proteins, P-Element-somatischen Inhibitors und *C. elegans* M88.5, gleichen dem CRD-BP darin, dass sie der vier KH-Domänen enthalten(43). Diese Proteine unterscheiden sich jedoch in mehreren strukturellen Merkmalen von CRD-BP und hKOC. Die KH-Domänen des P-Element-somatischen Inhibitors und der FUSE-bindenden Proteine sind in Richtung ihrer Aminoenden lokalisiert und sind in vier gleich-beabstandeten Wiederholungseinheiten organisiert. Diese Proteine enthalten auch entweder glycinreiche oder glutaminreiche Bereiche an ihren Amino- und Carboxy-Enden. Die Gesamtorganisation der vier KH-Domänen von M88.5 ist sehr ähnlich zu CRD-BP und hKOC. Sie enthält zwei Paare von KH-Domänen, die durch 83 Aminosäuren getrennt sind. Im Gegensatz zu CRD-BP und hKOC, ist das Aminoende von M88.5 jedoch glutaminreich und weist keine RGG-Box auf. Das FUSE-Bindungsprotein enthält eine Sequenz, die einer RGG-Box gleicht, aber diese Sequenz liegt zwischen der dritten und vierten KH-Domäne, was bei dem CRD-BP und hKOC-Protein nicht der Fall ist. Letzlich sind die Sequenzen im Inneren der KH-Domänen dieser anderen Proteinr von denen von CRD-BP oder hKOC sehr unterschiedlich.

[0087] Es wurden auch mehrere strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten zwischen CRD-BP und FMRP, dem Protein, das durch das FMR1-Gen kodiert wird, dessen Mutationen für die häufigste Form von vererbter Geistesschwäche verantwortlich ist (44, 45), erkannt. Beide Proteine enthalten KH-Domänen und eine RGG-Box (37, 38), sowie ein nukleäres Import- und Export-Signal (39). Beide Proteine assoziieren mit Ribosomen und wahrscheinlich auch mit mRNA (33, 49, 46). Keines der Proteine ist für die Zelllebensfähigkeit erforderlich, da die Individuen, die FMRP nicht exprimieren, überleben, während völlig normale adulte Tiere CRD-BP nicht zu einem mit Immunblotting und/oder Gelretardationstests messbaren Pegel exprimieren (32). Es gibt auch einige signifikante Unterschiede zwischen FMRP und CRD-BP, insbesondere bei ihren Expressionsmustern. Beide werden reichlich während des fötalen Lebens exprimiert, aber nur FMRP wird in adulten Geweben nachgewiesen (47-49).

[0088] Die strukturellen Merkmale von CRD-BP und seine Entwicklungs-Regulationsmuster legen nahe, dass es aus folgenden Gründen ein onkofötales Protein sein könnte: (i) Es wird nur im fötalen und neonatalen Leben reichlich exprimiert (32). (ii) Alle Maus-CRD-BP-ESTs, die sich gegenwärtig in den Datenbanken befinden, stammen von entweder fötalem Gewebe oder aus Zelllinien, die embryonale Stammzellen umfassen. Diese umfassen AA073173 (von einem 13 Tage alten embryonalen Herzgewebe), AA619650 und AA399833 (von einer Präimplantations-Blastocyste), AA073514 (von der P19-embryonalen Karzinom-Zelllinie, die mit Retinsäure behandelt wurde), und D76662 und D76781 (von der F9-embryonalen Karzinom-Zelllinie). (iii) Das CRD-BP wird in vielen Zelllinien exprimiert, die alle neoplastisch oder präneoplastisch sind. Es wird zu hohen Pegeln in K562-HeLa und 3T3-Zellen ([Fig. 3](#) und [4](#) und nicht gezeigte Daten) und zu niedrigen Pegeln in anderen Zelllinien wie z.B. HL60, einer humanen promyelozytischen Leukämiezelle, und H4IIE, einer Rattenhepatomazelle (Daten nicht gezeigt), exprimiert. (iv) Es ist ähnlich, aber nicht identisch, zum hKOC-Protein, das bei Pankreaskrebs und bei einigen anderen Tumoren überexprimiert wird ([Fig. 2](#) und Ref. 40). Wenn es sich bei CRD-BP ein onkofötales Protein handelt, würde es sich in eine wachsende Liste von RNA-bindenden Proteinen, die die frühe Entwicklung des Organismus beeinflussen und/oder auf Carcinogenese einwirken, einreihen. Beispielsweise beeinflussen Mutationen bei Elav-Proteinen die *Drosophila*-Entwicklung (Übersicht in 50-53), während Mutationen in anderen RNA-bindenden Proteinen zu männlicher Infertilität oder Geistesschwäche führen (44).

D. Nachweisen von CRD-BP in klinischen Proben

[0089] Humane Tumorgewebe wurden von Ärzten und Chirurgen des UW-Madison Clinical Cancer Center bereitgestellt. Die Gewebe wurden homogenisiert und es wurde ein roher cytoplasmatischer Extrakt hergestellt. Der Extrakt wurde dann durch zweidimensionale Gelelektrophorese von den Kendrick Laboratories (Madison, WI) fraktioniert. Nach der Elektrophorese in die zweite Dimension wurden die Proteine auf PVDF-Membranen überführt und in unser Labor zurückgebracht.

[0090] Das CRD-BP wurde durch Inkubieren der Membranen mit Antikörper für Maus-CRD-BP sichtbar gemacht. Diese Antikörper kreuzreagieren mit humanem CRD-BP.

[0091] Die Ergebnisse sind wie folgt:

1. Wir weisen reichlich CRD-BP in humanem Brustkrebs-, Kolonkrebs- und Pankreaskrebs-Geweben nach. Wir erwarten ähnliche Ergebnisse bei anderen nicht-hämatopoietischen Krebsarten.
2. Eine deutlich geringere Menge von CRD-BP wird in einer normalen humanen Brustgewebeprobe nachgewiesen.
3. In mehreren humanen Leukämieproben wird kein CRD-BP nachgewiesen

[0092] Unsere Folgerung aus diesen Untersuchungen ist, dass das CRD-BP in humanen, nicht-leukämischen Karzinomen überexprimiert wird.

Referenzen

1. Ayer, D. E. und Eisenman, R. N., Genes Devel. 7: 2110-2119, 1993.
2. Ayer, D. E., Kretzner, L. und Eisenman, R. N., Cell 72: 211-222, 1993.
3. Zervos, A. S., Gyuris, J. und Brent, R., Cell 72: 223-232, 1993.
4. Spencer, C. A. und Groudine, M., Adv. Canc. Res. 56: 1-48, 1991.
5. Coppola, J. A. und Cole, M. D., Nature 320: 760-763, 1986.
6. Freytag, S. O., Dang, C. V. und Lee, W. M. F., Cell Growth Diff. 1: 339-343, 1990.
7. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Lund, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. und Hancock, D. C., Cell 69: 119-128, 1992.
8. Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. und Brinster, R. L., Nature 318: 533-538, 1985.
9. Klein, G., Genes, Chromosomes, Cancer 1: 3-8, 1989.
10. Loscher, B. und Eisenman, R. N., Genes Devel. 4: 2025-2035, 1990.
11. Spotts, G. D. und Hann, S. R., Mol. Cell. Biol. 10: 3952-3964, 1990.
12. Lutterbach, B. und Hann, S. R., Molec. Cell. Biol. 14: 5510-5522, 1994.
13. Morello, D., Asselin, C., Lavenu, A., Marcu, K. B. und Babinet, C. Oncogene 4: 955-961, 1989.
14. Gruppuso, P. A., FitzGerald, M. J. und Fausto, N., Pediatr. Res. 33: 49A, 1993.
15. Morello, D., Lavenu, A. und Babinet, C., Oncogene 5: 1511-1519, 1990.
16. Steer, C. J., FASEB J. 10: 559-573, 1996.
17. Jones, T. R. und Cole, M. D., Mol. Cell. Biol. 7: 4513-4521, 1987.
18. Wisdom, R. und Lee, W., J. Biol. Chem. 265: 19015-19021, 1990.
19. Wisdom, R. und Lee, W., Genes and Devel. 5: 232-243, 1991.
20. Yeilding, N. M., Rehman, M. T. und Lee, W. M. F., Mol. Cell. Biol. 16: 3511-3522, 1996.
21. Yeilding, N. M. und Lee, W. M. F., Mol. Cell. Biol. 17: 2698-2707, 1997.
22. Herrick, D. J. und Ross, J., Mol. Cell. Biol. 14: 2119-2128, 1994.
23. Lavenu, A., Pisto, S., Pournin, S., Babinet, C. und Morello, D., Mol. Cell. Biol. 15: 4410-4419, 1995.
24. Morello, D., Lavenu, A., Pournin S. und Babinet, C., Oncogene 8: 1921-1929, 1993.
25. Pisto, S., Roland, J., Babinet, C. und Morello, D., Molec. Cell. Biol. 16: 5107-5116, 1996.
26. Ross, J. und Kobs, G. J. Mol. Biol. 188: 579-593, 1986.
27. Ross, J., Peltz, S. W., Kobs, G. und Brewer, G., Molec. Cell. Biol. 6: 4362-4371, 1986.
28. Peltz, S. W. und Ross, J., Molec. Cell. Biol. 7: 4345-4356, 1987.
29. Brewer, G. und Ross, J., Mol. Cell. Biol. 8:1697-1708, 1988.
30. Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D. und Ross, J., Genes Devel. 6: 642-654, 1992.
31. Prokipcak, R. D., Herrick, D. J., und Ross, J., J. Biol. Chem. 269: 9261-9269, 1994.
32. Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A. und Ross, J., Oncogene 14: 1279-1286, 1997.
33. Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H. und Dreyfuss, G., Mol. Cell. Biol. 16: 3825-3832, 1996.
34. Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Moller, W., Dahno, W., Weissbach, H. und Brot, N., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 83: 7419-7423, 1986.

35. Henshaw, E. C., Methods in Enzymology 59: 410-421, 1979.

36. Kozak, M., J. Cell Biol. 108: 229-241, 1989.

37. Ashley, C. T., Wilkinson, K. D., Reines, D. und Warren, S. T., Science 262: 563-565, 1993.

38. Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L. und Dreyfuss, G., Cell 74: 291-298, 1993.

39. Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y. und Warren, S. T., Hum. Molec. Gen. 5: 1083-1091, 1996.

40. Mueller-Pillasch, F., Lacher, U., Wallrapp, C., Micha, A., Zimmerhackl, F., Hameister, H., Varga, G., Friess, H., Buchler, M., Beger, H. G., Vila, M. R., Adler, G. und Gress, T. M., Oncogene. 14: 2729-2733, 1997.

41. Harford, J. B., Rouault, T. A., und Klausner, R. D., Iron Metabolism in Health und Disease. J. H. Brock, J. W. Halliday, M. J. Pippard und L. W. Powell (Herausgeber), W. B. Saunders, Philadelphia, Seiten 123-149, 1994.

42. Chen, C-Y., You, Y. und Shyu, A-B., Mol. Cell. Biol. 12: 5748-5757, 1992.

43. Musco, G., Stier, G., Joseph, H., Antonietta, M., Morelli, C., Nilges, M., Gibson, T. J. und Pastore, A., Cell 85: 237-245, 1996.

44. Cooke, H. J. und Elliott, D. J., Trends Genet. 13: 87-89, 1997.

45. Nussbaum, N. L. und Ledbetter, D. N., Metabolic Basis of Inherited Disease, C. R. Scriver, A. Beaudet, W. S. Sly und D. Valle, Herausgeber, (McGraw-Hill, N. Y.), Seiten 759-810, 1995.

46. Khandjian, E. W., Corbin, F., Woerly, S. und Rousseau, F., Nature Genetics 12: 91-93, 1996.

47. Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T. und Hersch S. M., J. Neurosci. 17: 1539-1547, 1997.

48. Khandjian, E. W., Fortin, A., Thibodeau, A., Tremblay, S., Cote, F., Devys, D., Mandel, J. L. und Rousseau, F., Hum. Molec. Gen. 4: 783-789, 1995.

49. Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E. und Schalling, M., Nature Genetics 3: 36-43, 1993.

50. Burd, C. G. und Dreyfuss, G., Science 265: 615-621, 1994.

51. Herschlag, D., J. Biol. Chem. 270: 20871-20874, 1995.

52. Shamoo, Y., Abdul-Manan, N. und Williams, K. R., Nucl. Acids Res. 23, 725-728, 1995.

53. Gao, F-B. und Keene, J. D., J. Cell Science 109: 579-589, 1996.

Sequenzliste

<110> Ross, Jeffrey

<120> Das c-myc-Kodierungsbereichsdeterminante-bindende Protein (CRD-BP) und seine Nucleinsäuresequenz

<130> 960296.95131

<140>

<141>

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2224

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

gggtgggggtg ggtagaaagt ttgcgggtcc cgccgcccgt atccacgcct atcggcatag 60
gaggatatcc gcccgcgccc gcccggtatcg gcattgaatg gaacagtgtc cttgccccgc 120
caccgccacc atgaacaagc ttacatcgg caacctcaac gagagtgtga cccccgcaga 180
cttgagaaaa gtattcgcgg agcacaagat ctctacagc ggccagttct tgggtcaaatc 240
cggctacgcc ttcgtggatt gcccgcagc gcaactggcg atgaaggcca tcgaaacttt 300
ctcggggaaa gtagaactgc aaggaaaacg tctagagatt gaacactcag tccccaaaaa 360
acaaaggagt cggaaaatac agatccgcaa tattccacct cagctccgat gggaagtgtc 420
agatagcctg ctggctcagt acggtacagt ggagaactgt gagcaagtga acactgaaag 480
tgagacagcg gtggtcaacg tcacctactc taaccgggag cagaccaggc aagctatcat 540
gaagctaaat ggccatcaac tggagaacca tgccctgaag gtctcctaca tacctgatga 600
gcagataaca caaggtcctg agaatgggcg tcgtggaggc tttgggtctc gggggccagcc 660
ccggcaaggg tcgcccgtgg cagcaggggc tccagccaag cagcagccag tggacatccc 720
tctccggctc ctggtgccta cgcagtatgt aggcgctatc attggcaagg aggggtgccac 780
catccgaaac atcacaaaac agacgcagtc caaaatagac gtgcatagga aggagaatgc 840
gggcgctgcg gagaaggcca tcagcgtgca ttcaaccctc gaaggctgct cctccgcgtg 900
caagatgatc ttggagatta tgcacaagga ggcaaaggac accaaaacgg cagatgaagt 960
tcccctgaag atcctggctc ataacaactt cgctgggcca ctcatgggca aggaaggccg 1020
gaacctgaag aaggtggagc aggacacaga gacgaagatc accatctcat cgctccagga 1080
cctcacgctc tataaccctg agaggaccat cactgtgaag ggcgccattg agaactgttg 1140
cagggccgag caggagatca tgaagaaagt tcgagaggct tacgagaacg acgtggcccg 1200
catgagcttg cagtcccacc tcctccctgg gcttaacctg gctgcttgag gtctcttccc 1260
agcttcatcc agcgtgtgct ctctcctccc cagcagtgtc actggggctg ctccctatag 1320
ctccttcatg caggctccgg agcaggagat ggtacaagtg ttcatccccg ccagggtgt 1380
gggcgccatc attggcaaga agggccagca catcaaaca ctctcccgtt tcgccagcgc 1440
ctccatgaag attgtccac cagaaacacc tgactccaaa gttcgaatgg tcgtcatcac 1500
tggaacccca gaggtcagt tcaaggctca gggaagaatt tatggcaaac taaaagaaga 1560
gaatttcttt ggtcccaagg aggaagtaaa gctagagacc cacatacggg ttccggcttc 1620
agcagccggc cgcgtcatcg gcaaaggcgg caaacgggtg aatgagctgc agaacttgac 1680
tgacagttag gtggtagtgc caagagacca gaccccgat gagaacgacc aagtcattgt 1740
taagatcatc ggacatttct atgccagcca gatggctcag cggaagatcc gagacatcct 1800
ggctcaagtt aagcaacagc accagaaggg acagagcaac ctggcccagg cacggaggaa 1860
gtgaccccg cccctcctgt ccatttggt ccaagatcag caggaggaa acagaactgg 1920
aggggcgggg ggagggcggg tgtgttttcc ccagcaggcc tgagaatgag tgggaatcag 1980
ggcatttggg cctggctgga gatcaggttt gcacactgta ttgagaacaa tgttccagt 2040
aggaatcctg atctctcgcc cccaattgag ccagctggcc acagcccacc ccttggaata 2100
tcaccattgc aatcatagct tgggttgctt ttaaacgtgg attgtcttga agttctccag 2160
cctccatgga aggatgggtc agatcccagt ggggaagaga aataaaattt ccttcagggt 2220
ttat 2224

```

<210> 2

<211> 577

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

```

Met Asn Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu Asn Glu Ser Val Thr Pro Ala
 1          5          10          15

Asp Leu Glu Lys Val Phe Ala Glu His Lys Ile Ser Tyr Ser Gly Gln
          20          25          30

Phe Leu Val Lys Ser Gly Tyr Ala Phe Val Asp Cys Pro Asp Glu His
          35          40          45

Trp Ala Met Lys Ala Ile Glu Thr Phe Ser Gly Lys Val Glu Leu Gln
          50          55          60

Gly Lys Arg Leu Glu Met Glu His Ser Val Pro Lys Lys Gln Arg Ser
          65          70          75          80

Arg Lys Ile Gln Ile Arg Asn Ile Pro Pro Gln Leu Arg Trp Glu Val
          85          90          95

Leu Asp Ser Leu Leu Ala Gln Tyr Gly Thr Val Glu Asn Cys Glu Gln
          100          105          110

Val Asn Thr Glu Ser Glu Thr Ala Val Val Asn Val Thr Tyr Ser Asn
          115          120          125

Arg Glu Gln Thr Arg Gln Ala Ile Met Lys Leu Asn Gly His Gln Leu
          130          135          140

Glu Asn His Ala Leu Lys Val Ser Tyr Ile Pro Asp Glu Gln Ile Thr
          145          150          155          160

Gln Gly Pro Glu Asn Gly Arg Arg Gly Gly Phe Gly Ser Arg Gly Gln
          165          170          175

Pro Arg Gln Gly Ser Pro Val Ala Ala Gly Ala Pro Ala Lys Gln Gln
          180          185          190

Pro Val Asp Ile Pro Leu Arg Leu Leu Val Pro Thr Gln Tyr Val Gly
          195          200          205

Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln
          210          215          220

Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala
          225          230          235          240

Glu Lys Ala Ile Ser Val His Ser Thr Pro Glu Gly Cys Ser Ser Ala
          245          250          255

Cys Lys Met Ile Leu Glu Ile Met His Lys Glu Ala Lys Asp Thr Lys
          260          265          270

Thr Ala Asp Glu Val Pro Leu Lys Ile Leu Ala His Asn Asn Phe Val
          275          280          285

Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly Arg Asn Leu Lys Lys Val Glu Gln
          290          295          300

Asp Thr Glu Thr Lys Ile Thr Ile Ser Ser Leu Gln Asp Leu Thr Leu
          305          310          315          320

Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val Lys Gly Ala Ile Glu Asn Cys
          325          330          335

Cys Arg Ala Glu Gln Glu Ile Met Lys Lys Val Arg Glu Ala Tyr Glu
          340          345          350

```

Asn Asp Val Ala Ala Met Ser Leu Gln Ser His Leu Ile Pro Gly Leu
 355 360 365
 Asn Leu Ala Ala Val Gly Leu Phe Pro Ala Ser Ser Ser Ala Val Pro
 370 375 380
 Pro Pro Pro Ser Ser Val Thr Gly Ala Ala Pro Tyr Ser Ser Phe Met
 385 390 395 400
 Gln Ala Pro Glu Gln Glu Met Val Gln Val Phe Ile Pro Ala Gln Ala
 405 410 415
 Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Lys Gly Gln His Ile Lys Gln Leu Ser
 420 425 430
 Arg Phe Ala Ser Ala Ser Ile Lys Ile Ala Pro Pro Glu Thr Pro Asp
 435 440 445
 Ser Lys Val Arg Met Val Val Ile Thr Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe
 450 455 460
 Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys Leu Lys Glu Glu Asn Phe Phe
 465 470 475 480
 Gly Pro Lys Glu Glu Val Lys Leu Glu Thr His Ile Arg Val Pro Ala
 485 490 495
 Ser Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys Gly Gly Lys Thr Val Asn Glu
 500 505 510
 Leu Gln Asn Leu Thr Ala Ala Glu Val Val Val Pro Arg Asp Gln Thr
 515 520 525
 Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Ile Val Lys Ile Ile Gly His Phe Tyr
 530 535 540
 Ala Ser Gln Met Ala Gln Arg Lys Ile Arg Asp Ile Leu Ala Gln Val
 545 550 555 560
 Lys Gln Gln His Gln Lys Gly Gln Ser Asn Leu Ala Gln Ala Arg Arg
 565 570 575

Lys

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 Arg Arg Gly Gly Phe Gly Ser Arg Gly Gln Pro Arg Gln Gly
 1 5 10

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Gly Arg Arg Gly Leu Gly Gln Arg Gly Ser Ser Arg Gln Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Gly Arg Gly Gly Phe Asp Arg Met Pro Pro Gly Arg Gly Gly
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gly Arg Gly Gly Phe Gly Asp Arg Gly Gly Arg Gly Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Leu Arg Arg Gly Asp Gly Arg Arg Arg Gly Gly Gly Arg Gly
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 9
 Gly Arg Gly Gly Phe Gly Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Gln Leu Arg Trp Glu Val Leu Asp Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

His Leu Gln Trp Glu Val Leu Asp Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Leu Arg Leu Glu Arg Leu Gln Ile Asp
 1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Asp Leu Thr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Ile Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Menschlicher Immunschwächevirus

<400> 15

Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Asp
 1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 16

Gln Leu Leu Glu Leu Thr Leu
 1 5

<210> 17

<211> 47

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Leu Leu Val Pro Thr Gln Tyr Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val
 20 25 30

His Arg Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala Glu Lys Ala Ile Ser Val
 35 40 45

<210> 18
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18
 Ile Leu Ala His Asn Asn Phe Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Arg Asn Leu Lys Lys Val Glu Gln Asp Thr Glu Thr Lys Ile Thr Ile
 20 25 30
 Ser Ser Leu Gln Asp Leu Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr
 35 40 45
 Val

<210> 19
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19
 Val Phe Ile Pro Ala Gln Ala Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Lys Gly
 1 5 10 15
 Gln His Ile Lys Gln Leu Ser Arg Phe Ala Ser Ala Ser Ile Lys Ile
 20 25 30
 Ala Pro Pro Glu Thr Pro Asp Ser Lys Val Arg Met Val Val Ile
 35 40 45

<210> 20
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Ile Arg Val Pro Ala Ser Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys Gly Gly
 1 5 10 15
 Lys Thr Val Asn Glu Leu Gln Asn Leu Thr Ala Ala Glu Val Val Val
 20 25 30
 Pro Arg Asp Gln Thr Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Ile Val Lys Ile
 35 40 45

<210> 21
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Leu Leu Val Pro Thr Gln Phe Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Lys Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val
 20 25 30

His Arg Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala Glu Lys Ser Ile Thr Ile
 35 40 45

<210> 22
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Ile Leu Ala His Asn Asn Pro Val Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Arg Asn Leu Lys Lys Ile Glu Gln Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile
 20 25 30
 Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr
 35 40 45
 Val

<210> 23
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Gln Phe Ile Pro Ala Leu Ser Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln His Ile Lys Gln Leu Ser Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile
 20 25 30
 Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile
 35 40 45

<210> 24
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ile Arg Val Pro Ser Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys Gly Gly
 1 5 10 15
 Lys Thr Val Asn Glu Leu Gln Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val Val Val
 20 25 30
 Pro Arg Asp Gln Thr Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Val Val Lys Ile
 35 40 45

<210> 25
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Ile Leu Leu Gln Ser Lys Asn Ala Gly Ala Val Ile Gly Lys Gly Gly
 1 5 10 15
 Lys Asn Ile Lys Ala Leu Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ser Val Ser Val
 20 25 30

Pro Asp Ser Ser Gly Pro Glu Arg Ile Leu Ser Ile Ser Ala Asp Ile
 35 40 45

Glu Thr
 50

<210> 26
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Leu Leu Ile His Gln Ser Leu Ala Gly Gly Ile Ile Gly Val Lys Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Ile Lys Glu Leu Arg Glu Asn Thr Gln Thr Thr Ile Lys Leu
 20 25 30

Phe Gln Glu Cys Cys Pro His Ser Thr Asp Arg Val Val Leu Ile
 35 40 45

<210> 27
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Val Thr Ile Pro Lys Asp Leu Ala Gly Ser Ile Ile Gly Lys Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ile Lys Gln Ile Arg His Glu Ser Gly Ala Ser Ile Lys Ile
 20 25 30

Asp Glu Pro Leu Glu Gly Ser Glu Asp Arg Ile Ile Thr Ile
 35 40 45

<210> 28
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Phe Ile Val Arg Glu Asp Leu Met Gly Leu Ala Ile Gly Thr His Gly
 1 5 10 15

Ala Asn Ile Gln Gln Ala Arg Lys Val Pro Gly Val Thr Ala Ile Asp
 20 25 30

Leu Asp Glu Asp Thr Cys Thr Phe His Ile Tyr Gly
 35 40

<210> 29
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Ile Gln Val Pro Arg Asn Leu Val Gly Lys Val Ile Gly Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Ile Gln Glu Ile Val Asp Lys Ser Gly Val Val Arg Val Arg
 20 25 30

Ile Glu Ala Glu Asn Glu Lys Asn Val Pro Gln
 35 40

<210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 30
 Leu Leu Val Gly Leu Ile Gly Lys Gly Gly Leu Lys Leu Leu Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Ile

<210> 31
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 31
 gtbaaygary tbcaraa 17

<210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 32
 ggvacvacva cytcdgc 17

<210> 33
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 33
 gctgccgtca aattctg 17

<210> 34
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 34
 tcgacggttt ccatatg 17

<210> 35
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 35
 aaccgggctc gagcggcgc tttttttttt tttttttt 38

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 36 acggcagctg aggtggtagt acc	23
<210> 37 <211> 21 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 37 aaccgggctc gagcggccgc t	21
<210> 38 <211> 24 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 38 aggttccgtc cttccttgcc aatg	24
<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 39 aacttcacatc gccgttttgg	20
<210> 40 <211> 19 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 40 catcaactgg agaaccatg	19
<210> 41 <211> 21 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 41 gactgcgtct gttttgtgat g	21
<210> 42 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 42 ctgtaggaga tcttgtgctc	20
<210> 43 <211> 32 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<400> 43 cgcaccgcca ccatggacaa gctttacatc gg	32

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 44
 actgggatct gacccatcct

20

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> PEPTID
 <222> (8)
 <223> Xaa wobei Xaa = Gln oder Ile

<220>
 <221> PEPTID
 <222> (10)
 <223> Xaa wobei Xaa = Lys oder Arg

<220>
 <221> PEPTID
 <222> (11)
 <223> Xaa wobei Xaa = Ile oder Lys

<220>
 <221> PEPTID
 <222> (12)
 <223> Xaa wobei Xaa = Tyr oder Gly

<220>
 <221> PEPTID
 <222> (15)
 <223> Xaa wobei Xaa = Ile oder Leu

<400> 45
 Pro Ala Gln Val Gly Ala Ile Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Lys
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 46
 Asn Glu Leu Gln Asn Leu Thr Ala Ala Glu Val Val Val Pro
 1 5 10

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von Krebs in einem von humanen Patienten entnommenen Gewebe, umfassend folgende Stufen:

- Prüfen des Patientengewebes auf das CRD-BP-Expressionsniveau; und
- Vergleichen des Ergebnisses von Stufe (a) mit dem Expressionsniveau in nicht-krebsartigem Gewebe aus der gleichen Quelle, wobei ein erhöhtes CRD-BP-Niveau im Patientengewebe im Vergleich mit dem nicht-krebsartigen Gewebe die Diagnose von Krebs bedeutet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Nachweis von CRD-BP die Stufe des Homogenisierens des Biopsiegewebes, des Erhaltens eines rohen Proteinextrakts und des Prüfens dieses Extrakts auf das CRD-BP-Niveau umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei es sich bei dem Nachweis um einen Sandwichtest mit zwei Antikörpern handelt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei es sich bei dem Nachweis um einen Antikörper-Abfangtest handelt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei es sich bei dem Nachweis um einen Antigen-Konkurrenztest handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Nachweis von CRD-BP durch Immunoblotting erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Nachweis von CRD-BP in Zellen durch immunologische oder in situ-Hybridisierungsverfahren stattfindet.
8. Verfahren nach einem der vorliegenden Ansprüche, wobei es sich beim Krebs um Brustkrebs, Kolonkrebs oder Pankreaskrebs handelt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei es sich beim Patientengewebe um Brustgewebe und beim nicht-krebsartigen Gewebe um Brustgewebe handelt.
10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei es sich beim Patientengewebe um Kolongewebe und beim nicht-krebsartigen Gewebe um Kolongewebe handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei es sich beim Patientengewebe um Pankreasgewebe und beim nicht-krebsartigen Gewebe um Pankreasgewebe handelt.
12. Verfahren zur Bestimmung des Stadiums von Krebs in einem von humanen Patienten entnommenen Gewebe, umfassend folgende Stufen:
 - a) Prüfen der Patientengewebe auf CRD-BP-Expressionsniveaus und
 - b) Korrelieren des Expressionsniveaus mit der Krankheitsprognose.
13. Ex vivo-Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit eines anti-CRD-BP-Antikörpers im Serum eines Patienten, umfassend folgende Stufen:
 - a) Behandeln eines Patientenserums mit CRD-BP und Bestimmen, ob ein anti-CRD-BP-Antikörper vorhanden ist.
14. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von CRD-BP im Serum eines Patienten, umfassend die Stufe:
 - a) Behandeln eines Patientenserums mit CRD-BP-Antikörper und Bestimmen, ob CRD-BP vorhanden ist.
15. Ex vivo-Verfahren zur Hemmung von Krebszellwachstum, umfassend die Stufe des Beseitigens oder Verringerns der Konzentration von CRD-BP in den Krebszellen.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Fähigkeit von CRD-BP zum Schutz von c-myc-mRNA vor einer raschen Zerstörung dadurch beseitigt oder verringert wird, dass die Zelle mit einer Konkurrenz-RNA versehen wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Fähigkeit von CRD-BP zum Schutz von c-myc-mRNA vor einer raschen Zerstörung dadurch verringert oder beseitigt wird, dass ein Inhibitor verwendet wird, der die CRD-BP-Bindung an das c-myc-mRNA-CRD blockiert.
18. Verwendung eines Mittels, das zur Beseitigung oder Verringerung der Konzentration von CRD-BP in Krebszellen befähigt ist, bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung bei der Behandlung von Krebs.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei es sich bei dem Mittel um eine Konkurrenz-RNA handelt, die die Fähigkeit von CRD-BP zum Schutz von c-myc-mRNA vor einer raschen Zerstörung beseitigen oder verringern kann.
20. Verwendung nach Anspruch 18, wobei es sich bei dem Mittel um einen Inhibitor handelt, der die CRD-BP-Bindung an c-myc-mRNA-CRD blockieren und somit die Fähigkeit des CRD-BP zum Schutz von c-myc-mRNA vor einer raschen Zerstörung verringern oder beseitigen kann.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

FIG.1A

1 GGGTGGGTGGGTAGAAAGTTTGGGGCTCCCGCGCCCGGTATCCACGCCCTATCGGCATAG
 61 GAGGATATCCGCCCGCGCCCGCGGATCGGCATTGAATGGAACAGTGTCTTGTCCCGCGC
 121 CACCGCCACCATGAACAAGCTTTACATCGGCAACCTCAACGAGAGTGTGACCCCGCAGA
 1 M N K L Y I G N L N E S V T P A D

 181 CTTGGAGAAAGTATTCGGGAGCACAAAGATCTCTACAGCGGCCAGTTCTTGTCAAATC
 18 L E K V F A E H K I S Y S G Q F L V K S

 241 CGGCTACGCCCTTCGTGGATTGCCCGGACGAGCACTGGGGGATGAAGGCCATCGAACTTT
 38 G Y A F V D C P D E H W A M K A I E T F

 301 CTCGGGAAAGTAGAACTGCAAGGAAAACGTCTAGAGATTGAACACTCAGTCCCCAAAA
 58 S G K V E L Q G K R L E I E H S V P K K

 361 ACAAGGAGTCGGAAAATACAGATCCGCAATATTCACCTCAGCTCCGATGGGAAGTGCT
 78 Q R S R K I Q I R N I P P Q L R W E V L

 421 AGATAGCCCTGGCTCAGTACGGTACAGTGGAGAACTGTGAGCAAGTGAACACTGAAAG
 98 D S L L A Q Y G T V E N C E Q V N T E S

 481 TGAGACAGCGGTGTCAACGTACCTACTCTAACCGGAGCAGACCAGCAAGCTATCAT
 118 E T A V V N V T Y S N R E Q T R Q A I M

 541 GAAGCTAAATGGCCATCAACTGGAGAACCATGCCCTGAAGGTCTCCTACATACCTGATGA
 138 K L N G H Q L E N H A L K V S Y I P D E

FIG. 1B

601 GCAGATAACACAAGGTCCTGAGAATGGCGTCGTGGAGGCTTTGGGTCTCGGGGCCAGCC
 158 Q I T Q G P E N F R R G G F G S R G Q P

 661 CCGGCAAGGTCGCCCGTGGCAGCAGGGCTCCAGCCCAAGCAGCAGCCAGTGGACATCCC
 178 R Q G S P V A A G A P A K Q Q P V D I P

 721 TCTCCGGCTCCTGGTGCCCTACGCAGTATGTAGGCGCTATCATTTGGCAAGGAGGTGCCAC
 198 L R L L V P T Q Y V G A I I G K E G A T

 781 CATCCGAAACATCACAAACAGACGCGAGTCCAAATAGACGTGCATAGGAAGGAGAAATGC
 218 I R N I T K Q T Q S K I D V H R K E N A

 841 GCGCGCTCGGAGAAGGCCATCAGCGTGCATTCAACCCCTGAAGCTGCTCCTCCGCGTG
 238 G A A E K A I S V H S T P E G C S S A C

 901 CAAGATGATCTTGGAGATTATGCACAAGGAGGCAAGGACACCCAAACGGCAGATGAAGT
 258 K M I L E I M H K E A K D T K T A D E V
 961 TCCCTGAAGATCCGTGGCTCATAACAACCTCGTCGGCGGACTCATTTGGCAAGGAAGGCCG
 278 P L K I L A H N N F V G R L I G K E G R

 021 GAACCTGAAGAAGGTGGAGCAGGACACAGAGACGAAGATCACCATCTCATCGCTCCAGGA
 298 N L K K V E Q D T E T K I T I S S L Q D

FIG.1C

1081 CCTCAGCTCTATAACCCCTGAGAGGACCATCACTGTGAAGGGCCCATTGAGAACTGTTG
 318 L T L Y N P E R T I T V K G A I E N C C
 1141 CAGGGCCGAGCAGGAGATCATGAAGAAAGTTCGAGAGGCTTACGAGAACGACGTGGCCGC
 338 R A E Q E I M K K V R E A Y E N D V A A
 1201 CATGAGCTGCAGTCCACCTCATCCCTGGGCTTAACCTGGCTGCTGTAGTCTCTTCCC
 358 M S L Q S H L I P G L N L A A V G L F P
 1261 AGCTTCATCCAGCGCTGTCCCTCCTCCCTCCAGCAGTGTCACTGGGGCTGCTCCCTATAG
 378 A S S A V P P P P S S V T G A A P Y S
 1321 CTCCTTCATGCAGGCTCCGGAGCAGGAGATGGTACAAGTGTTCATCCCCCGCCAGGCTGT
 398 S F M Q A P E Q E M V Q V F I P A Q A V
 1381 GGGCGCCATATTGGCAAGAAGGGCCAGCACATCAAACTCTCCCGTTTCGCCAGCGC
 418 G A I I G K K G Q H I K Q L S R F A S A
 1441 CTCCATCAAGATTGCTCCACCAGAAACACCTGACTCCAAAGTTCGAATGGTCGTCATCAC
 438 S I K I A P P E T P D S K V R M V V I T
 1501 TGGACCCCGAGGCTCAGTTCAAGGCTCAGGGAAGAATTATGGCAAACATAAAGAAGA
 458 G P P E A Q F K A Q G R I Y G K L K E E

FIG. ID

1561 GAATTCTTTGGTCCCAAGGAGGAAGTAAGCTAGAGACCCACATACGGGTTCCGGCTTC
 478 N F F G P K E E V K L E T H I R V P A S
 1621 AGCAGCCGGCCGTCATCGGCAAGCGCGCAAAACGGTGAATGAGCTGCAGAACTTGAC
 498 A A G R V I G K G G K T V N E L Q N L T
 1681 TGCAGCTGAGGTGGTAGTGCCAAAGAGAGACCCAGACCCCGGATGAGAACGACCAAGTCAATTGT
 518 A A E V V V P R D Q T P D E N D Q V I V
 1741 TAAGATCATCGGACATTTCTATGCCAGCCAGATGGCTCAGCGGAAGATCCGAGACATCCT
 538 K I I G H F Y A S Q M A Q R K I R D I L
 1801 GGCTCAAGTTAAGCAACAGCACCAAGGAGACAGAGCAACCTGGCCAGGCACGGAGGAA
 558 A Q V K Q Q H Q K G Q S N L A Q A R R K
 1861 GTGACCCCGCCCCCTCCTGTCCCCATTGGCTCCAAGATCAGCAGGAGGAACACAGAACTGG
 578 *
 1921 AGGGCGGGTGAGGGCCGGTGTGTTTTCCAGCAGGCCCTGAGAATGAGTGGGAATCAG
 1981 GGCATTTGGCCCTGGCTGGAGATCAGGTTTGCACACTGTATTGAGAACAATGTCCAGTG
 2041 AGGAATCCTGATCTCTCGCCCCCAATTGAGCCAGCTGGCCACAGCCACCCCTTGAATA
 2101 TCACCATTGCAATCATAGCTTGGGTTGCTTTTAAACGTGGATTGTCTTGAAGTTCTCCAG
 2161 CCTCCATGGAAGGATGGGTTCAGATCCCAGTGGGGAAGAGAAATAAAATTTCCTTCAGGTT
 2221 TTAT

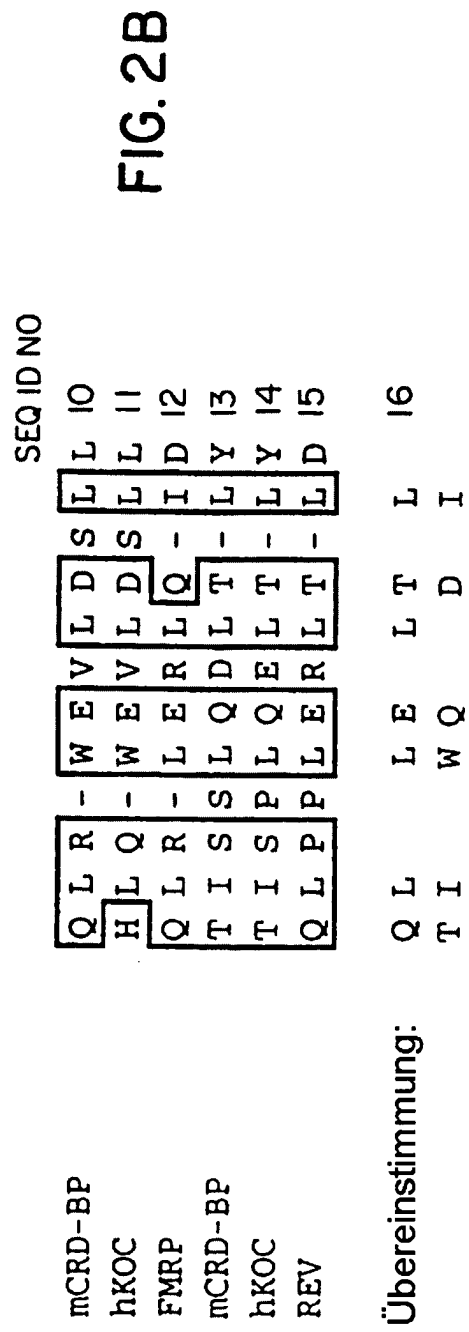
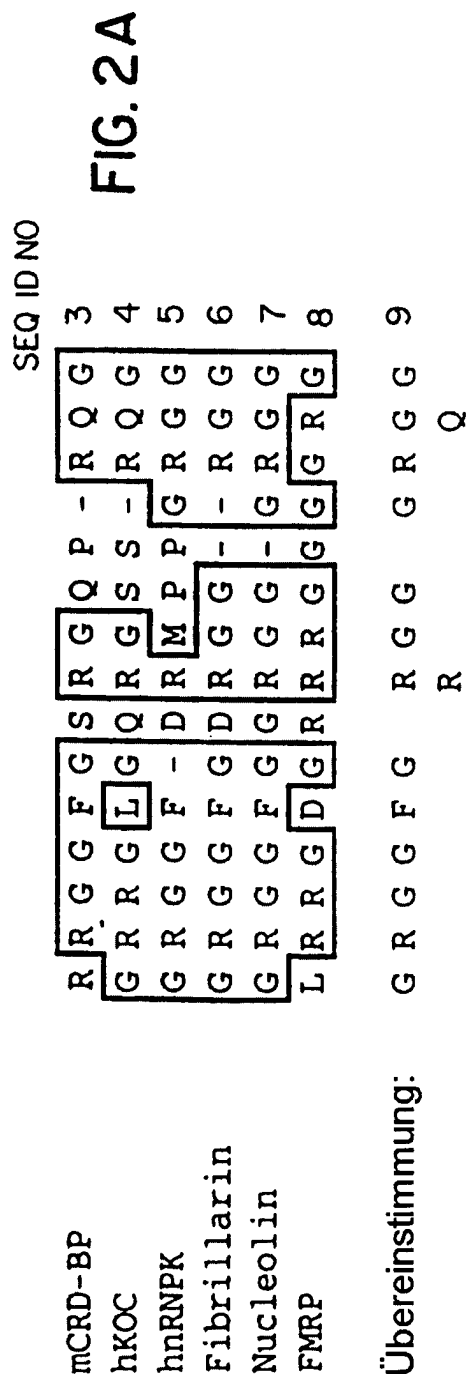


FIG. 2C-2

		SEQ ID NO	
VON FIG. 2C-1	Q	T	17
	D	T	18
	F	A	19
	L	T	20
	Q	T	21
	D	T	22
	F	A	23
	L	S	24
	D	Y	25
	N	T	26
	E	S	27
	V	P	28
	K	S	29
	G	V	30
	V	I	31
	V	I	32
	V	I	33
	V	I	34
	V	I	35
	V	I	36
	V	I	37
	V	I	38
	V	I	39
	V	I	40
	V	I	41
	V	I	42
	V	I	43
	V	I	44
	V	I	45
	V	I	46
	V	I	47
	V	I	48
	V	I	49
	V	I	50
	V	I	51
	V	I	52
	V	I	53
	V	I	54
	V	I	55
	V	I	56
	V	I	57
	V	I	58
	V	I	59
	V	I	60
	V	I	61
	V	I	62
	V	I	63
	V	I	64
	V	I	65
	V	I	66
	V	I	67
	V	I	68
	V	I	69
	V	I	70
	V	I	71
	V	I	72
	V	I	73
	V	I	74
	V	I	75
	V	I	76
	V	I	77
	V	I	78
	V	I	79
	V	I	80
	V	I	81
	V	I	82
	V	I	83
	V	I	84
	V	I	85
	V	I	86
	V	I	87
	V	I	88
	V	I	89
	V	I	90
	V	I	91
	V	I	92
	V	I	93
	V	I	94
	V	I	95
	V	I	96
	V	I	97
	V	I	98
	V	I	99
	V	I	100

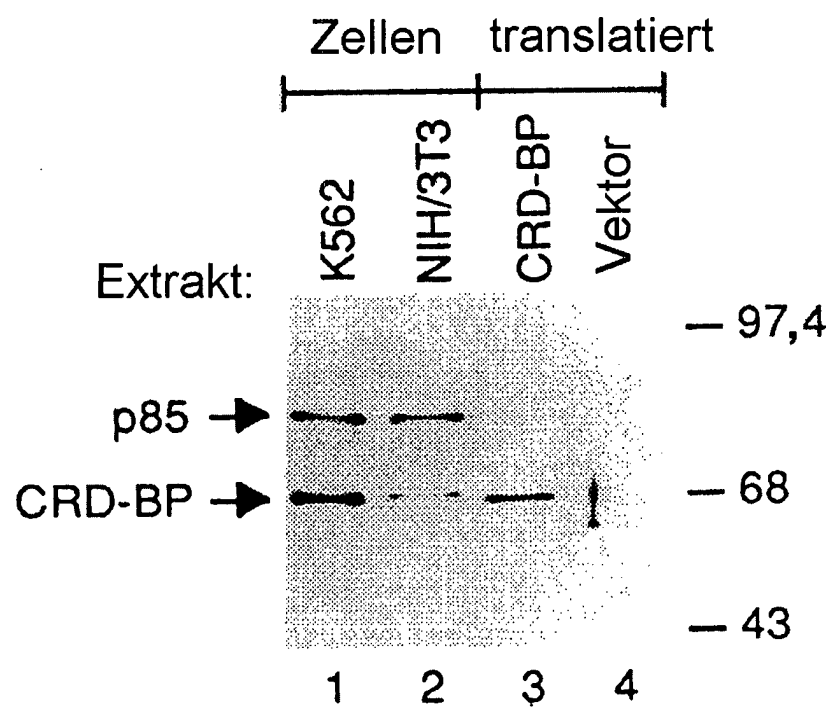
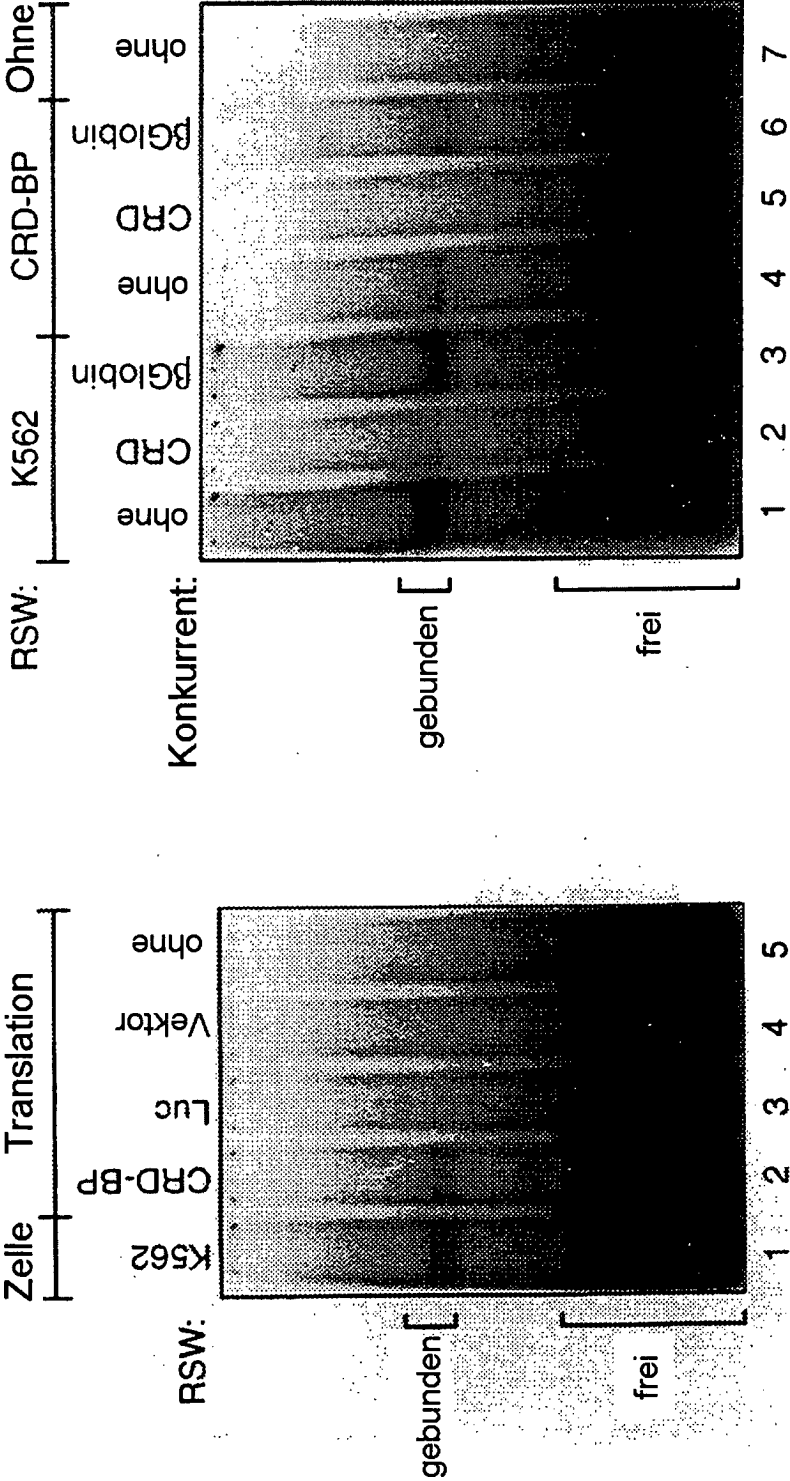


FIG. 3



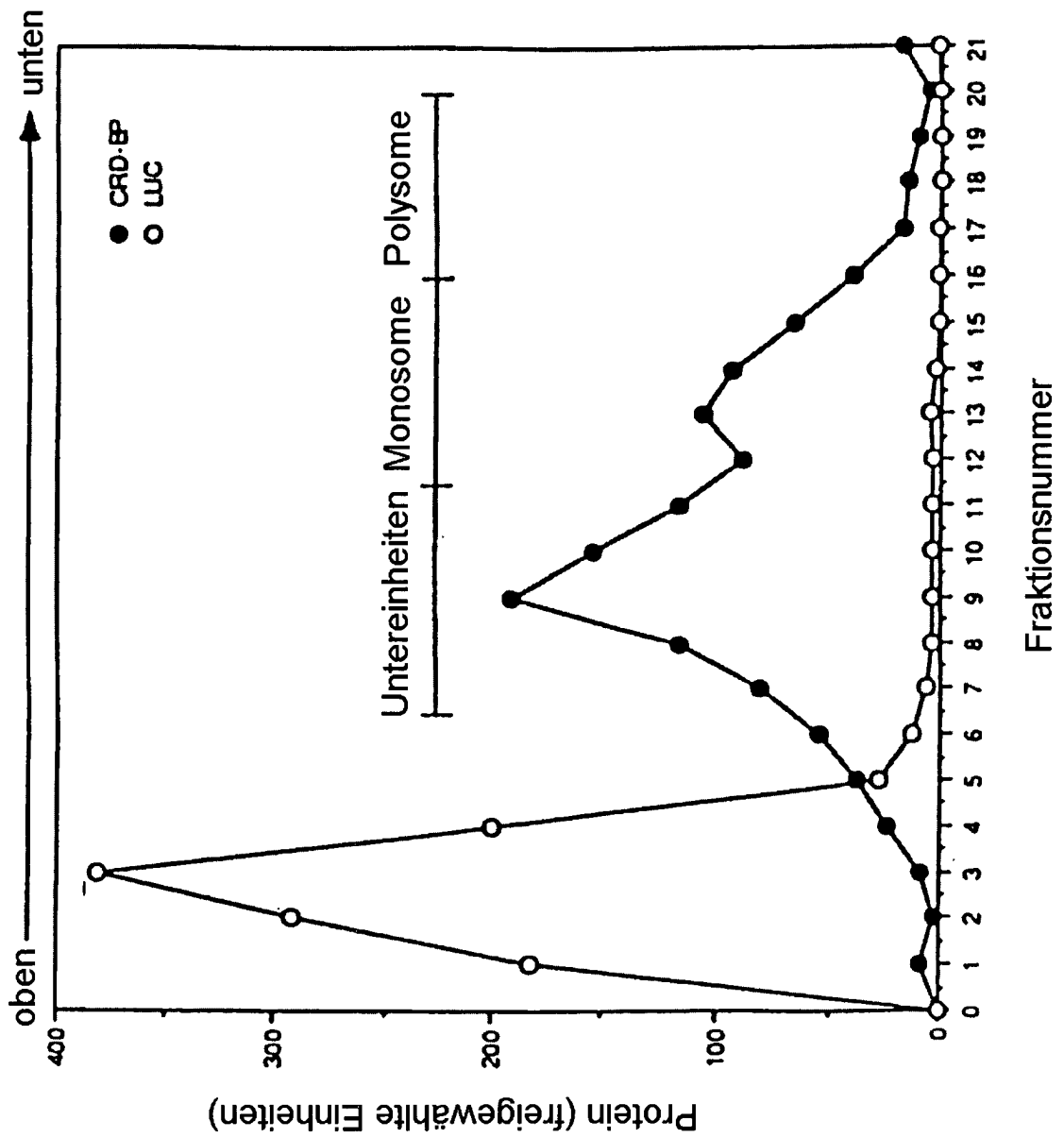


FIG. 5

FIG. 6A

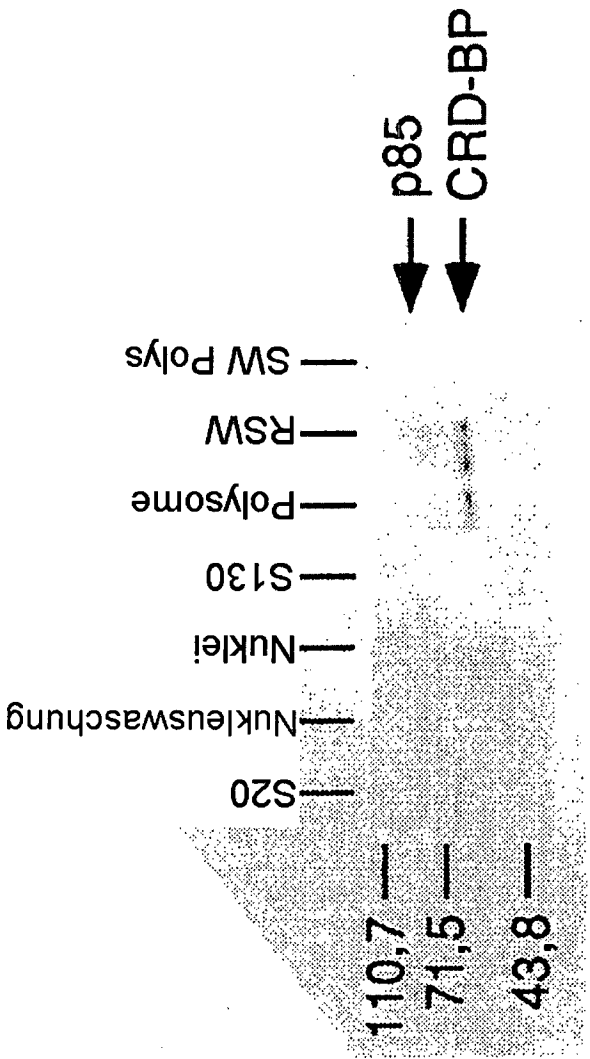


FIG. 6B



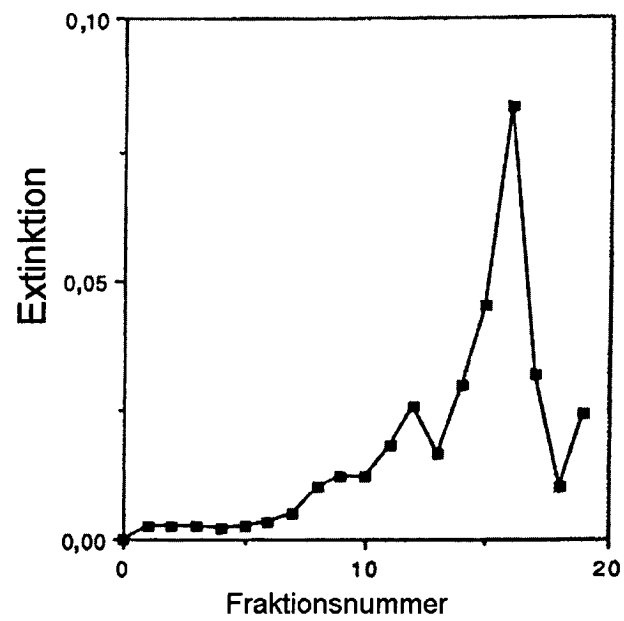


FIG. 7A

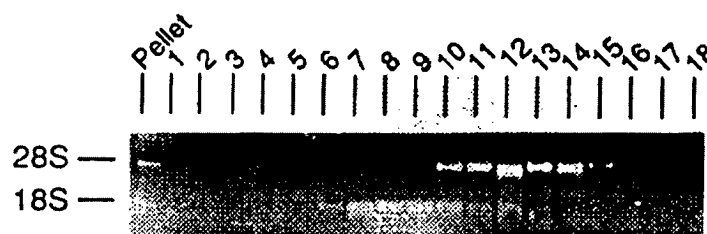


FIG. 7B



FIG. 7C

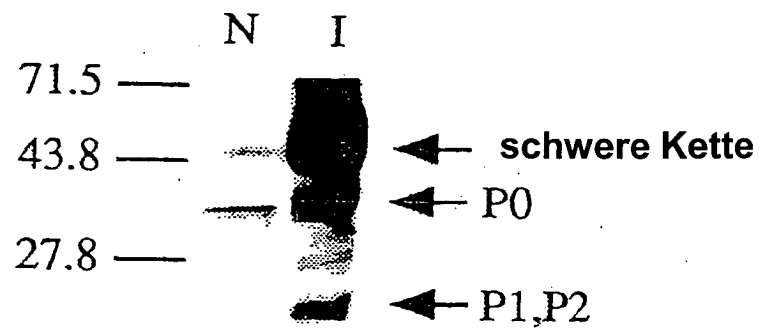


FIG. 8A

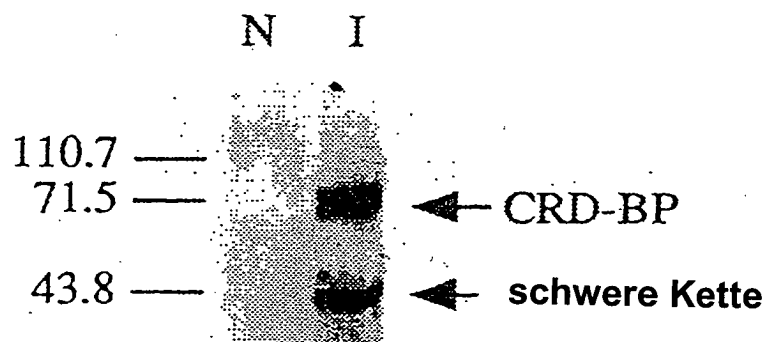


FIG. 8B