



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 676 T2** 2007.11.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 231 265 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 676.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 004 002.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **02.04.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **31.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/715** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**679666**            **02.04.1991**    **US**

**728913**            **28.06.1991**    **US**

**793065**            **15.11.1991**    **US**

**813593**            **24.12.1991**    **US**

(73) Patentinhaber:

**The Trustees of Princeton University, Princeton,  
N.J., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, FR, GB, IT**

(72) Erfinder:

**Lemischka, Ihor R., Princeton, New Jersey 08540,  
US**

(54) Bezeichnung: **Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase (FLK-1)**

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**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, auf Nukleinsäuren, die eine Kinase kodieren, und Vektoren umfassend diese Nukleinsäuren.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Das hematopoietische System von Säugetieren umfasst rote und weiße Blutkörperchen. Diese Zellen sind die gereiften Zellen, die aus primitiveren, durch ihre Abstammung beschränkten Zellen entstammen. Die Zellen des hematopoietischen Systems wurden von Dexter und Spooner in der Zeitschrift Annual Review of Cell Biology 3, 423–441 (1987) beschrieben.

**[0003]** Die roten Blutkörperchen oder Erythrozyten entstammen primitiveren Zellen, die in bezug auf Dexter und Spooner als „Erythroid burst-forming units“ (BFU-E) bezeichnet werden. Die unmittelbaren Nachkommen der Erythroid burst-forming units werden als „Erythroid colonyforming units“ (CFU-E) bezeichnet.

**[0004]** Die weißen Blutkörperchen enthalten die reifen Zellen des lymphoiden und myeloiden Systems. Die lymphoiden Zellen schließen B- und T-Lymphozyten mit ein. Die B- und T-Lymphozyten resultieren von früheren Vorläuferzellen, die gemäß Dexter und Spooner als PreT- und preB-Zellen bezeichnet werden.

**[0005]** Das myeloide System umfasst eine Anzahl von Zellen einschließlich Granulozyten, Blutplättchen, Monozyten, Macrophagen und Megakaryozyten. Die Granulozyten können weiter in neutrophile Zellen, eosinophile Zellen, basophile Zellen und Mastzellen eingeteilt werden.

**[0006]** Jede der reifen hematopoietischen Zellen ist auf eine bestimmte Funktion spezialisiert. Beispielsweise sind Erythrozyten für den Sauerstoff und Kohlendioxidtransport zuständig. T- und B-Lymphozyten sind für Zell- bzw. Antikörper-vermittelte Immunantworten verantwortlich. Blutplättchen sind in die Blutgerinnung involviert. Granulozyten und Macrophagen agieren grundsätzlich als Fänger und Hilfszellen in der Immunantwort gegen invasierende Organismen und ihre Nebenprodukte.

**[0007]** Im Zentrum des hematopoietischen Systems liegen eine oder mehrere totipotente hematopoietische Stammzellen, die eine Serie von Differenzierungsschritten durchlaufen, was zu Vorläuferzellen führt, die durch ihre Abstammung immer weiter eingeschränkt sind. Die reiferen Vorläuferzellen sind darauf beschränkt, eine oder zwei Abstammungslinien zu bilden. Einige Beispiele von abstammungsbeschränkten Vorläuferzellen werden durch Dexter und Spooner erwähnt und schließen Granulozyten/Macrophagen Kolonie-bildende Zellen (GM-CFC), Megakaryozyten Kolonie-bildende Zellen (Meg-CFC), eosinophile Kolonie-bildende Zellen (Eos-CFC) und basophile Kolonie-bildende Zellen (Bas-CFC) mit ein. Andere Beispiele von Vorläuferzellen werden oben diskutiert.

**[0008]** Das hematopoietische System funktioniert mit Hilfe einer genau kontrollierten Produktion der verschiedenen reifen Zelllinien. Die totipotenten Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich einerseits zu erneuern und andererseits sich in festgelegte Vorläuferzellen für alle hematopoietischen Zelllinien zu differenzieren. Diese primitivsten der hematopoietischen Zellen sind sowohl notwendig wie auch ausreichend für die vollständige und permanente hematopoietische Wiederherstellung eines durch Strahlung geschwächten hematopoietischen Systems in Säugetieren. Die Fähigkeit von Stammzellen, das gesamte hematopoietische System wieder aufzubauen, ist die Basis der Therapie durch Knochenmarktransplantation.

**[0009]** Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Wirkungsweise des hematopoietischen Systems von Säugetieren spielen. Die Rolle von Wachstumsfaktoren ist komplex, und gleichwohl zum jetzigen Zeitpunkt nicht gut verstanden. Ein Grund für diese Unsicherheit ist, dass vieles über hematopoietische Wachstumsfaktoren bekannt ist, aus in vitro Experimenten hervorgeht. Solche Experimente reflektieren nicht notwendigerweise die Realität in vivo.

**[0010]** Zusätzlich kann in vitro, unter der Voraussetzung, dass Knochenmarkszellen dem Medium zugesetzt werden, die Blutbildung in der Abwesenheit von zugefügten Wachstumsfaktoren etabliert werden. Die Beziehung zwischen stromalen und hematopoietischen Wachstumsfaktoren in vivo ist nicht verstanden. Nichts desto trotz zeigen hematopoietische Wachstumsfaktoren in vivo eine hohe Aktivität.

**[0011]** Von dem was über sie bekannt ist, scheinen hematopoietische Wachstumsfaktoren eine Vielzahl von Aktivitäten aufzuweisen. An einem Ende des Spektrums stehen Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, von dem angenommen wird, dass es ausschließlich die Proliferation von reifen erythroiden Vorläuferzellen fördert. In der Mitte des Spektrums sind Wachstumsfaktoren, wie IL-3, von denen angenommen wird, dass sie das Wachstum und die Entwicklung von frühen Stammzellen sowie eine Anzahl von Vorläuferzellen erleichtern. Einige Beispiele von Vorläuferzellen, die durch IL-3 induziert werden, schließen solche mit ein, die auf Granulozyten/Macrophagen, eosinophile Zelllinien, Megakaryozyten, erythroide Zelllinien und Mastzelllinien beschränkt sind.

**[0012]** An dem anderen Ende des Spektrums befindet sich der hematopoietische Wachstumsfaktor, der zusammen mit dem korrespondierenden Rezeptor, in einer Serie von Artikeln der Zeitschrift Cell der Ausgabe vom 5. Oktober 1990 diskutiert wurde. Der Rezeptor ist das Produkt des W Locus, c-kit, das ein Mitglied der Klasse von Rezeptor Protein Tyrosin Kinasen ist. Von dem Liganden für c-kit, auf den mit verschiedenen Namen, wie z. B. Stammzellefaktor (stem cell factor, SCF) und Mastzellwachstumsfaktor (mast cell growth factor, MGF) Bezug genommen wird, nimmt man an, dass er für die Entwicklung von frühen hematopoietischen Stammzellen essentiell ist sowie für Zellen wichtig ist, die auf erythroide Zelllinien und Mastzelllinien in Mäusen beschränkt sind; siehe z. B. Copeland et al., Cell 63, 175–183 (1990).

**[0013]** Es erscheint daher, dass es Wachstumsfaktoren gibt, die ausschließlich reife Zellen beeinflussen. Es scheint ebenfalls Wachstumsfaktoren zu geben, die beiderseits reife Zellen und Stammzellen beeinflussen. Die Wachstumsfaktoren, die beide Zelltypen beeinflussen, können möglicherweise eine kleine Anzahl oder eine große Anzahl an reifen Zellen beeinflussen.

**[0014]** Weiterhin scheint es eine inverse Beziehung zu geben zwischen der Fähigkeit eines Wachstumsfaktors, reife Zellen zu beeinflussen, und der Fähigkeit des Wachstumsfaktors, Stammzellen zu beeinflussen. Beispielsweise wird angenommen, dass der c-kit Ligand, der eine kleine Anzahl an reifen Zellen beeinflusst, wichtiger in der Erneuerung und Entwicklung von Stammzellen ist als IL-3, von dem berichtet wird, dass er die Proliferation von vielen reifen Zellen stimuliert (siehe oben).

**[0015]** Vor der vorliegenden Beschreibung gab es keine Berichte über Wachstumsfaktoren, die ausschließlich Stammzellen ohne einen Effekt auf reife Zellen beeinflussen. Die Entdeckung von solchen Wachstumsfaktoren wäre von besonderer Signifikanz.

**[0016]** Wie oben erwähnt, ist c-kit eine Protein Tyrosin Kinase (pTK). Es wird immer offensichtlicher, dass Protein Tyrosin Kinasen eine wichtige Rolle als zelluläre Rezeptoren für hematopoietische Wachstumsfaktoren spielen. Andere Rezeptor pTKs schließen die Rezeptoren des Kolonie stimulierenden Faktors 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1) und PDGF mit ein.

**[0017]** Die pTK-Familie kann durch die Anwesenheit verschiedener konservierter Aminosäureregionen in der katalytischen Domäne erkannt werden. Diese konservierten Regionen werden durch Hanks et al. in Science 241, 42–52 (1988) zusammengefasst, siehe **Fig. 1** beginnend auf Seite 46, und durch Wilks in Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86, 1603–1607 (1989), siehe **Fig. 2** auf Seite 1605.

**[0018]** Weitere Protein Tyrosin Kinasen, die Rezeptoren hematopoietischer Wachstumsfaktoren darstellen werden benötigt, um die Selbsterneuerung der totipotenten hematopoietischen Stammzellen in einer effektiveren Weise zu stimulieren und die Entwicklung aller Zellen des hematopoietischen Systems beiderseits in vitro und in vivo zu stimulieren. Neue Rezeptoren hematopoietischer Wachstumsfaktoren, die nur auf primitiven Stammzellen vorhanden sind, jedoch nicht auf reifen Vorläuferzellen vorkommen, werden insbesondere benötigt. Liganden für die neuen Rezeptoren sind auch wünschenswert, die als hematopoietischer Wachstumsfaktoren fungieren. Nukleinsäuresequenzen, die die Liganden kodieren, werden benötigt, um rekombinante Rezeptoren und Liganden herzustellen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0019]** Diese und andere Ziele, die einem Fachmann offensichtlich sind, werden durch die Bereitstellung von isolierten Säugetier-Nukleinsäuremolekülen, welche Rezeptor-Tyrosin-Kinase kodieren, exprimiert in primitiven hematopoietischen Zellen und nicht exprimiert in reifen hematopoietischen Zellen, erreicht. Auch eingeschlossen sind die Rezeptoren, kodiert durch solche Nukleinsäuremoleküle; die Nukleinsäuremoleküle, welche solche Rezeptor Protein Kinasen kodieren, welche die in **Fig. 2** (flk-1) gezeigten Sequenz aufweisen; und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit den Aminosäure-Sequenzen, gezeigt in **Fig. 2** (flk-1).

## BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0020] [Fig. 1a.1–Fig. 1a.3](#) zeigt die cDNA und Aminosäuresequenzen muriner flk-2. Die Aminosäurereste erscheinen direkt unter den Nukleotiden im offenen Leseraster. Die Aminosäuren 1–27 bilden die hydrophobe Leitsequenz. Die Aminosäuren 28–544 bilden die extrazelluläre Rezeptordomäne. Die Aminosäuren 545–564 bilden die Transmembranregion. Die verbleibenden Aminosäuren bilden die intrazelluläre katalytische Domäne. Die in der intrazellulären Domäne folgenden Aminosäurereste sind katalytische Sub-Domänen, die durch Hanks (siehe oben) identifiziert wurden: 545–564, 618–623, 811–819, 832–834, 857–862, 872–878. Die Sequenz bei den Resten 709–785 ist eine kennzeichnende Sequenz, die charakteristisch für flk-2 ist. Die Protein Tyrosin Kinasen haben grundsätzlich eine kennzeichnende Sequenz in dieser Region.

[0021] [Fig. 1b](#) zeigt die cDNA und Aminosäuresequenzen eines Teils der humanen flk-2 aus der extrazellulären Domäne. Die Aminosäuren 1–110 der humanen flk-2 korrespondieren zu den Aminosäuren 42–152 von muriner flk-2.

[0022] [Fig. 1c](#) zeigt die cDNA und Aminosäuresequenzen eines Teils humaner flk-2 aus der intrazellulären (Kinase) Domäne. Die Aminosäuren 1–94 der humanen flk-2 korrespondieren zu den Aminosäuren 751–849 von muriner flk-2.

[0023] [Fig. 2–Fig. 2.3](#) zeigt die cDNA und Aminosäuresequenzen von flk-1. Die Aminosäurereste 763–784 bilden die Transmembranregion von flk-1.

[0024] [Fig. 3](#) zeigt die zeitliche Antwort der Bindung zwischen einer murinen stromalen Zelllinie (2018) und APtag-flk-2 wie auch APtag-flk-1. APtag ohne Rezeptor (SEAP) wird als Kontrolle verwendet. Siehe Beispiel 8.

[0025] [Fig. 4](#) zeigt die Dosis-Antwort auf die Bindung zwischen stromalen Zellen (2018) und APtag-flk-2 sowie APtag-flk-1. APtag ohne Rezeptor (SEAP) wird als Kontrolle verwendet. Siehe Beispiel 8.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

## Rezeptoren

[0026] Die Erfindung betrifft in einer Ausführungsform ein isoliertes Säugetier-Nukleinsäuremolekül aus Säugetieren, das eine Rezeptor Protein Tyrosin Kinase kodiert, die in primitiven hematopoietischen Zellen aus Säugetieren exprimiert wird und nicht in reifen hematopoietischen Zellen exprimiert wird.

[0027] Das Nukleinsäuremolekül kann ein DNA-, cDNA- oder RNA-Molekül sein. Das Säugetier, in dem das Nukleinsäuremolekül existiert, kann jedes Säugetier sein, wie z. B. eine Maus, Ratte, Kaninchen oder Mensch.

[0028] Das Nukleinsäuremolekül kodiert eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (pTK). Mitglieder der pTK-Familie können an den konservierten Aminosäure-Regionen in der katalytischen Domäne erkannt werden. Beispiele von pTK-Konsensus-Sequenzen wurden von Hanks et al. in Science 241, 42–52 (1988) bereitgestellt; siehe beispielsweise [Fig. 1](#) beginnend auf Seite 46, und durch Wilks in Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86, 1603–1607 (1989); siehe insbesondere [Fig. 2](#) auf Seite 1605. Ein Methioninrest an Position 205 in der konservierten Sequenz WMAPES ist charakteristisch für pTKs, die Rezeptoren sind.

[0029] Der Artikel von Hanks et al. identifiziert elf katalytische Sub-Domänen, die pTK-Konsensus-Reste und -Sequenzen beinhalten. Die pTKs der vorliegenden Erfindung werden die meisten oder alle dieser Konsensus-Reste und -Sequenzen aufweisen.

[0030] Einige besonders stark konservierte Reste und Sequenzen werden in Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1

**Konservierte Reste und Sequenzen in pTKs<sup>1</sup>**

<u>Position<sup>2</sup></u>	<u>Rest oder Sequenz</u>	<u>katalytische Domäne</u>
50	G	I
52	G	I
57	V	I
70	A	II
72	K	II
91	E	III
166	D	VI
171	N	VI
174-186	DFG	VII
208	E	VIII
220	D	IX
225	G	IX
280	R	XI

1. Siehe Hanks et al., Science 241, 42-52 (1988)

2.

Angepasst in Über-

einstimmung mit Hanks et al., Id.

**[0031]** Eine pTK der Erfindung kann alle dreizehn dieser hochkonservierten Reste und Sequenzen beinhalten. Als ein Ergebnis natürlicher oder synthetischer Mutationen können pTKs der Erfindung weniger als alle dreizehn hochkonservierten Reste und Sequenzen beinhalten, sowie z. B. 11, 9 oder 7 solcher Sequenzen, solange die Bedingungen von Anspruch 1 erfüllt sind.

**[0032]** Die Rezeptoren der Erfindung gehören grundsätzlich zur gleichen Klasse der pTK-Sequenzen, zu denen c-kit gehört. Es wurde jedoch überraschend festgestellt, eine neue funktionelle Klasse von Rezeptor pTKs existiert. Die neue funktionelle Klasse von Rezeptor pTKs wird in primitiven hematopoietischen Zellen exprimiert, jedoch nicht in reifen hematopoietischen Zellen.

**[0033]** Zum Zweck dieser Patentanmeldung ist eine primitive hematopoietische Zelle totipotent, d. h. fähig, alle hematopoietischen Blutzellen in vivo wieder zu bilden. Eine reife hematopoietische Zelle ist nicht selbsterneuernd und besitzt begrenzte proliferative Fähigkeiten, z.B. eine begrenzte Fähigkeit zur Entwicklung multiplexer Zelllinien. Zum Zweck dieser Patentanmeldung sind reife hematopoietische Zellen grundsätzlich zur Entwicklung von nur einer oder zwei Zelllinien in vitro oder in vivo fähig.

**[0034]** Es sollte selbstverständlich sein, dass das hematopoietische System komplex ist und viele intermediäre Zellen zwischen primitiven totipotenten hematopoietischen Stammzellen und den oben definierten vollkommen entwickelten reifen hematopoietischen Zellen enthält. Sowie sich die Stammzelle in eine immer reifere, durch ihre Abstammung beschränkte Zelle entwickelt, verliert diese immer mehr ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung.

**[0035]** Die Rezeptoren der vorliegenden Erfindung, wie in diesem Patent beschrieben, können und können auch nicht in diesen intermediären Zellen exprimiert werden. Die notwendige und hinreichende Bedingung, welche Mitglieder der neuen Klasse von Rezeptoren definiert, ist, dass sie in den primitiven totipotenten Stammzellen oder in Zellen vorhanden sind und nicht in auf eine oder zumeist zwei Zelllinien beschränkten reifen Zellen.

**[0036]** Ein Beispiel der neuen Klasse an Rezeptor pTKs, wird fötale Leberkinase 2 (flk-2) genannt, nach dem Organ in dem es gefunden wurde. In der Mitte der Trächtigkeit (Tag 14) gibt es ungefähr eine totipotente Stammzelle pro  $10^4$  Zellen in der fötalen Leber von Mäusen. Zusätzlich zur fötalen Leber wird flk-2 ebenfalls in der fötalen Milz, fötalem Thymus, adultem Hirn und adultem Knochenmark exprimiert.

**[0037]** Beispielsweise wird flk-2 in individuellen multipotenten CFU-Blast-Kolonien exprimiert, die fähig sind, zahlreiche Kolonien vielfältiger Abstammung nach erneutem Ausplattieren zu erzeugen. Es ist daher wahrscheinlich, dass flk-2 im gesamten primitiven (d. h. selbsterneuernden) Anteil der hematopoietischen Hierarchie exprimiert werden. Diese Entdeckung stimmt damit überein, dass flk-2 in der Weiterleitung möglicher Signale zur Selbsterneuerung aus der Umgebung wichtig ist.

**[0038]** Es ist besonders wichtig, dass die Expression von flk-2 mRNA in der primitivsten thymozytischen Untereinheit stattfindet. Sogar in nahe miteinander verbundenen unreifen Untereinheiten, die sich in der Expression des IL-2-Rezeptors unterscheiden, segregiert die flk-2-Expression zu der primitiveren Untereinheit, der ein IL-2-Rezeptor fehlt. Man nimmt an, dass die früheste thymozytische Untereinheit nicht entwickelt ist. Daher kann die Thymozyte, die flk-2 exprimiert multipotent sein. Flk-2 ist die erste Rezeptor Tyrosin Kinase von der bekannt ist, dass sie in der T-lymphoiden Zelllinie exprimiert wird.

**[0039]** Die mRNA fötaler Leber wandert relativ zu den ribosomalen Banden 28S und 18S auf Formaldehyd-Agarose-Gel bei ungefähr 3,5 kb, während die Nachricht des Gehirns erheblich größer ist. In adulten Geweben wandert flk-2 mRNA sowohl vom Hirn wie auch vom Knochenmark bei etwa 3,5 kb.

**[0040]** Die vorliegende Erfindung betrifft einen zweiten Rezeptor, der fötale Leberkinase 1 (flk-1) genannt wird und kein Mitglied der gleichen Klasse an Rezeptoren wie flk-2 ist, da flk-1 in ein paar mehr reifen hematopoietischen Zellen gefunden werden kann. Die Aminosäuresequenz von flk-1 ist in [Fig. 2](#) gezeigt.

**[0041]** Die vorliegende Erfindung schließt den flk-1 Rezeptor ein, wie auch DANN, cDNA und RNA, kodierend flk-1. Die DNA-Sequenz von flk-1 ist ebenfalls in [Fig. 2](#) gezeigt. Flk-1 kann in den gleichen Organen wie flk-2 gefunden werden, sowie auch in fötalem Hirn, Magen, Niere, Lunge, Herz und Darm; und in adulter Niere, Herz, Milz, Lunge, Muskeln und Lymphknoten.

**[0042]** Es ist bekannt, dass die Rezeptor Protein Tyrosin Kinasen der Erfindung in einfach zu bestimmende Domänen aufgeteilt werden können. Die zur pTK korrespondierende DNA-Sequenz kodiert, beginnend mit ihrem 5'-Ende, eine hydrophobe Leitsequenz, der eine hydrophile extrazelluläre Domäne folgt, die an einen spezifischen Liganden bindet und durch diesen aktiviert wird. Unmittelbar stromabwärts der extrazellulären Rezeptor-Domäne ist eine hydrophobe Transmembranregion. Auf die Transmembranregion folgt unmittelbar eine basische katalytische Domäne, die in Bezug auf die oben diskutierten Artikel von Hanks et al. und Wilks identifiziert werden kann.

**[0043]** Die vorliegende Erfindung schließt die extrazelluläre Rezeptor-Domäne ein, der die Transmembranregion und die katalytische Domäne fehlt. Vorzugsweise ist die hydrophobe Leitsequenz ebenfalls aus der extrazellulären Domäne entfernt.

**[0044]** Diese Regionen und Domänen können von einem durchschnittlichen Fachmann einfach visuell dadurch identifiziert werden, dass die Aminosäuresequenz einer vermutlichen pTK kontrolliert und mit bekannten pTKs verglichen wird. In Bezug auf [Fig. 1a](#) wird beispielsweise die Transmembranregion von flk-2, die die extrazelluläre Rezeptor-Domäne von der katalytischen Domäne abtrennt, durch die Nukleotide 1663 (T) bis 1722 (C) kodiert. Diese Nukleotide korrespondieren zum Aminosäurerest 545 (Phe) bis 564 (Cys). Die Aminosäure-Sequenz zwischen der Transmembranregion und der katalytischen Sub-Domäne (Aminosäuren 618–623), die durch Hanks et al. als Sub-Domäne I (z. B. GXGXXG) identifiziert wurde, ist charakteristisch für Rezeptor Protein Tyrosin Kinasen.

**[0045]** Die extrazelluläre Domäne kann ebenfalls durch allgemein anerkannte Kriterien für extrazelluläre Aminosäure-Sequenzen identifiziert werden. Die Bestimmung von geeigneten Kriterien ist einem Fachmann bekannt und wurde z. B. von Hopp et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78, 3824–3828 (1981); Kyte et al., J. Mol. Biol. 157, 105–132 (1982); Emini, J. Virol. 55, 836–839 (1985); Jameson et al., CA BIOS 4, 181–186 (1988) und Karplus et al. Naturwissenschaften 72, 212–213 (1985) beschrieben. Die anhand dieser Kriterien vorhergesagten Aminosäure-Domänen liegen exponiert an der Oberfläche, was charakteristisch für extrazelluläre Domänen ist.

**[0046]** Wie weiter unten genauer diskutiert, können Nucleinsäure-Moleküle, die die Rezeptoren der Erfindung kodieren, in bekannte Vektoren zur Verwendung in Standardtechniken für rekombinante DNA verwendet werden. Standardtechniken für rekombinante DNA sind solche wie z. B. in Sambrook et al. beschrieben, "Molecular Cloning", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) und von Ausubel et al., Hrsg., "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1987). Die Vektoren können zirkulär (z. B. Plasmide) oder nicht zirkulär sein. Zur Klonierung und Expression in einem Wirt sind Standardvektoren verfügbar. Der Wirt kann prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Prokaryotische Wirte sind bevorzugt *E. coli*. Bevorzugte eukaryotische Wirte schließen Hefe-, Insekten- und Säugerzellen mit ein. Bevorzugte Säugerzellen schließen z. B. CHO-, COS- und humane Zellen mit ein.

#### Funktionelle Äquivalente

**[0047]** Die Erfindung schließt funktionelle Äquivalente der pTK Rezeptoren und Rezeptor-Domänen, wie oben beschrieben, ein, ebenso wie Nucleinsäuresequenzen, die diese kodieren. Ein Protein wird dann als funktionelles Äquivalent eines anderen Proteins für eine bestimmte Funktion betrachtet, wenn das äquivalente Protein immunologisch kreuzreaktiv mit den Rezeptoren der Erfindung ist und die gleiche Funktion wie diese besitzt. Das Äquivalent kann z. B. ein Fragment des Proteins oder eine Substitutions-, Additions- oder Deletionsmutante des Proteins sein. Die Äquivalente, eingeschlossen in der Erfindung sind diejenigen, die in Ansprüchen 1(ii) und 1(iii) definiert sind.

**[0048]** Beispielsweise ist es möglich, Aminosäuren in einer Sequenz durch äquivalente Aminosäuren zu ersetzen. Gruppen von Aminosäuren, von denen bekannt ist, dass sie gewöhnlicherweise zueinander äquivalent sind, sind:

- (a) Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G);
- (b) Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);
- (c) His(H) Arg(R) Lys(K);
- (d) Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V); und
- (e) Phe(F) Tyr(Y) Trp(W).

**[0049]** Substitutionen, Additionen und/oder Deletionen können solange in den Rezeptoren durchgeführt werden, wie die entstehenden äquivalenten Antikörper immunologisch mit den nativen Antikörpern kreuzreaktiv sind und die gleiche Funktion wie diese besitzen.

**[0050]** Die äquivalenten Rezeptoren werden gewöhnlicherweise im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz wie die nativen Rezeptoren besitzen. Eine Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen mit einer anderen Sequenz gleich ist, sich jedoch von der anderen Sequenz durch eine oder mehrere Substitutionen, Additionen und/oder Deletionen unterscheidet, wird als äquivalente Sequenz angesehen. Vorzugsweise sind weniger als 25%, noch bevorzugter weniger als 10% und am meisten bevorzugt weniger als 5% der Anzahl an Aminosäureresten in der Aminosäuresequenz der nativen Rezeptoren substituiert, addiert oder deletiert.

**[0051]** Äquivalente Nucleinsäuremoleküle schließen Nucleinsäuremoleküle mit ein, die die oben definierten äquivalenten Rezeptoren kodieren. Äquivalente Nucleinsäuremoleküle schließen ebenfalls Nucleinsäuresequenzen mit ein, die sich von nativen Nucleinsäuresequenzen in einer Art unterscheiden, die keinen Effekt auf die korrespondierenden Aminosäuresequenzen ausübt.

### ISOLATION VON NUKLEINSÄUREMOLEKÜLEN UND PROTEINEN

#### Isolation von Nucleinsäuremolekülen, die Rezeptoren kodieren

**[0052]** Um Nucleinsäuremoleküle herzustellen, die Stammzellenrezeptoren aus Säugtieren kodieren, wird eine Quelle an Stammzellen bereitgestellt. Geeignete Quellen schließen fötale Leber, Milz oder Thymuszellen oder adulte Knochenmarks- oder Hirnzellen mit ein.

**[0053]** Beispielsweise können geeignete fötale Leberzellen aus Mäusen am Tag 14 der Trächtigkeit erhalten werden. Fötale Thymuszellen aus Mäusen können am Tag 14–18 der Trächtigkeit, vorzugsweise am Tag 15, erhalten werden. Geeignete fötale Zellen anderer Säugtiere können zu den Zeiten erhalten werden, die mit der Trächtigkeit von Mäusen korrespondiert.

**[0054]** Die gesamte RNA wird mit Hilfe von Standardtechniken aus Gewebe präpariert, das Stammzellenrezeptoren beinhaltet. Die gesamte RNA wird zur direkten cDNA-Synthese verwendet. Standardverfahren zur Iso-



lierung von RNA und zu Synthese von cDNA werden in Standardhandbüchern der Molekularbiologie bereitgestellt, sowie in Sambrook et al., "Molecular Cloning," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) und in Ausubel et al., (Hrsg.), "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Associates/Wiley Interscience, New York (1990).

**[0055]** Die cDNA des Rezeptors wird durch bekannte Verfahren amplifiziert. Zum Beispiel kann die cDNA als ein Template für die Amplifikation mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet werden, siehe Saiki et al., *Science*, 239, 487 (1988) oder Mullis et al., US-Patent 4,683,195. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation werden aus der Sequenz bekannter Rezeptoren hergeleitet, wie z. B. aus den in **Fig. 1** und **Fig. 2** angegebenen Sequenzen für flk-2 bzw. flk-1, vorzugsweise flk-2. Die Oligonukleotide werden durch bekannte Standardverfahren hergestellt. Geeignete Verfahren schließen solche mit ein, die von Caruthers in der Zeitschrift *Science* 230, 281–285 (1985) beschrieben werden.

**[0056]** Um die gesamte, für die Rezeptoren der vorliegenden Erfindung proteinkodierenden Regionen zu isolieren, ist das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid komplementär zur Sequenz am 5'-Ende, vorzugsweise das ATG Startkodon umgebend und mindestens 5–10 Nukleotide stromaufwärts des Start Kodons. Das stromabwärts gelegene Oligonukleotid ist komplementär zur Sequenz am 3'-Ende, optional das Stopkodon umgebend. Eine Mischung von stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Oligonukleotiden wird in der PCR-Amplifikation verwendet. Die Bedingungen werden gemäß Standardverfahren für jedes einzelne Primer-Paar optimiert. Das PCR-Produkt wird mittels Elektrophorese auf die korrekte Größe der cDNA analysiert, die zu der Sequenz zwischen den Primern korrespondiert.

**[0057]** Alternativ kann die kodierende Region in zwei oder mehr überlappenden Fragmenten amplifiziert werden. Die überlappenden Fragmente werden so entworfen, dass sie eine Schnittstelle mit einschließen, die eine Zusammenstellung der intakten cDNA aus den Fragmenten erlauben.

**[0058]** Die die Rezeptoren der Erfindung kodierende amplifizierte DNA kann in einer großen Anzahl an Klonierungsvektoren in einer großen Anzahl an Wirtszellen repliziert werden. Die Wirtszelle kann prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Die DNA kann aus natürlichen Quellen erhalten werden und optional, modifiziert werden, oder zum Teil oder vollständig synthetisiert werden.

**[0059]** Der Vektor, in dem die DNA gesplacet wird, kann Segmente chromosomaler, nichtchromosomaler und synthetischer DNA-Sequenzen beinhalten. Einige geeignete prokaryotische Klonierungsvektoren schließen Plasmide von *E. coli* mit ein, wie z.B. colE1, pCR1, BpR322, pMB9, pUC, pKSM und RP4. Prokaryotische Vektoren schließen ebenfalls Derivate von Phagen-DNA mit ein, sowie M13 und andere filamentöse einzelsträngige DNA-Phagen.

#### Isolierung von Rezeptoren

**[0060]** Die DNA, die die Rezeptoren der Erfindung kodiert, wird in einen geeigneten Vektor eingeschleust und in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt exprimiert. Um Proteine in Bakterien zu exprimieren, speziell in *E. coli*, sind Vektoren bekannt. Solche Vektoren schließen die PATH-Vektoren mit ein, die durch Dieckmann und Tzagoloff in *J. Biol. Chem.* 260, 1513–1520 (1985) beschrieben werden. Diese Vektoren enthalten den DNA-Sequenzen, die Anthranilat Synthase (TrpE) kodieren, gefolgt von einem Polylinker am Carboxy-Terminus. Andere Systeme von Expressionsvektoren basieren auf beta-Galactosidase (pEX); lambda-P<sub>L</sub>; Maltose Bindungsprotein (mMAL); und Glutathion S-Transferase (pGST) – siehe *Gene* 67, 31 (1988) und *Peptide Research* 3, 167 (1990).

**[0061]** In Hefe verwendbare Vektoren sind erhältlich. Ein geeignetes Beispiel ist das 2μ Plasmid.

**[0062]** Geeignete Vektoren zur Verwendung in Säugetierzellen sind ebenfalls bekannt. Solche Vektoren schließen gut bekannte Derivate mit ein, die von SV-40, Adenovirus, von Retrovirus abgeleiteten DNA-Sequenzen und Vektoren abstammen, die aus einer Kombination von Plasmiden und Phagen DNA abgeleitet sind.

**[0063]** Weitere eukaryotische Expressionsvektoren sind im Stand der Technik bekannt (z. B. P. J. Southern und P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327–341 (1982); S. Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1, 854–864 (1981); R. J. Kaufmann und P. A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," *J. Mol. Biol.* 159, 601–621 (1982); R. J. Kaufmann und P. A. Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601–664 (1982); S. I. Scahill et al., "Expression And Characterization Of The



Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4654–4659 (1983); G. Urlaub und L. A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216–4220 (1980).

**[0064]** Verwendbare Expressionsvektoren, geeignet in der vorliegenden Erfindung, beinhalten mindestens eine Sequenzen zur Kontrolle der Expression, die operativ mit der zu exprimierenden DNA-Sequenz oder dem Fragment verbunden ist. Die Kontrollsequenz wird in den Vektor eingesetzt, um die Expression der klonierten DNA-Sequenz zu kontrollieren und zu regulieren. Beispiele verwendbarer Sequenzen zur Kontrolle der Expressions sind das lac-System, das trp-System, das tac-System, das trc-System, die großen Operator- und Promotor-Regionen des Lambda-Phagen, die Kontrollregion des fd-coat-Proteins, der glycolytische Promotor aus Hefe, z. B., der Promotor für 3-Phosphoglycerat-Kinase, die Promotoren von Säurephosphatase aus Hefe (yeast acid phosphatase), z. B., Pho5, die Promotoren des alpha-mating Faktors aus Hefe, und Promotoren, die aus Polyoma, Adenovirus, Retrovirus und Simianvirus abgeleitet sind, z. B., die frühen und späten Promotoren oder SV40, und andere Sequenzen, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen prokaryotischer oder eukaryotischer Zellen kontrollieren sowie deren Viren oder Kombinationen davon.

**[0065]** Vektoren, die die Rezeptor kodierende DNA und Kontrollsignale enthalten, werden in einer Wirtszelle zur Expression des Rezeptors inseriert. Einige zur Expression verwendbare Wirtszellen schließen gut bekannte prokaryotische und eukaryotische Zellen mit ein. Einige geeignete prokaryotische Wirtszellen schließen z. B. mit ein, E. coli, wie z.B. E. coli SG-936, E. coli HB 101, E. coli W3110, E. coli X1776, E. coli X2282, E. coli DHI und E. coli MRCI, Pseudomonas, Bacillus, wie z.B. Bacillus subtilis und Streptomyces. Geeignete eukaryotische Zellen schließen Hefe und andere Pilze, Insekten, tierische Zellen wie z.B. COS-Zellen und CHO-Zellen, humane Zellen und Pflanzenzellen in Gewebekulturen mit ein.

**[0066]** Die humanen Homologe der oben beschriebenen Mausrezeptoren werden mit Hilfe einer ähnlichen Strategie isoliert. RNA, die die Rezeptor kodiert, wird aus einer Quelle von humanen Zellen gewonnen, die mit primitiven Stammzellen angereichert ist. Geeignete humane Zellen schließen fötale Milz, Thymus- und Leberzellen, und Nadelschnurblut sowie auch adulte Hirn- und Knochenmarkszellen mit ein. Die humanen fötalen Zellen werden vorzugsweise an dem Tag der Schwangerschaft gewonnen, der vergleichbar ist zur Mitte der Trächtigkeit in Mäusen: Die Aminosäuresequenzen der humanen flk-Rezeptoren sowie deren kodierende Nukleinsäuresequenzen sind homolog zu den Aminosäure- und Nukleotidsequenzen der Mausrezeptoren.

**[0067]** In der vorliegenden Anmeldung wird die Sequenz eines ersten Proteins, wie z. B. eines Proteins oder eine Liganden, oder eines Nukleinsäuremoleküls, das das Protein kodiert, als homolog zu einem zweiten Protein oder einem Nukleinsäuremolekül angesehen, falls die Aminosäure oder die Nukleotidsequenz des ersten Proteins oder des Nukleinsäuremoleküls mindestens etwa 30% homolog, vorzugsweise mindestens 50% homolog, und am meisten bevorzugt mindestens etwa 65% homolog zu der entsprechenden Sequenz des zweiten Proteins oder des Nukleinsäuremoleküls ist. Im Falle von Proteinen, die eine hohe Homologie besitzen, ist die Aminosäure oder die Nukleotidsequenz des ersten Proteins oder des Nukleinsäuremoleküls mindestens etwa 75% homolog, vorzugsweise mindestens etwa 85% homolog und am meisten bevorzugt mindestens etwa 95% homolog zu der Aminosäure oder der Nukleotidsequenz des zweiten Proteins oder des Nukleinsäuremoleküls.

**[0068]** Kombinationen aus Oligonukleotid-Paaren aus Maus werden als PCR-Primer verwendet, um das humane Homolog aus den Zellen zu amplifizieren, um Sequenzunterschiede zu bestimmen. Der Rest der Prozedur zur Bestimmung der humanen flk-Homologe ist ähnlich zu den Prozeduren, die oben für die Gewinnung der Maus flk-Rezeptoren beschrieben wurden. Die nicht ganz perfekte Homologie zwischen den humanen flk-Homologen und den Oligonukleotiden aus Maus wird bei der Bestimmung der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen mit in Betracht gezogen.

#### Assay zur Expression von Rezeptoren auf Stammzellen

**[0069]** Um die Expression von flk-1-Rezeptoren auf der Oberfläche von primitiven hematopoietischen Stammzellen zu demonstrieren, werden Antikörper generiert, die den Rezeptor erkennen. Der Rezeptor kann dabei das vollständige Protein, so wie es in der Natur vorkommt, oder ein antigenes Fragment des vollständige Proteins sein. Vorzugsweise umfasst das Fragment den vorhergesagten extrazellulären Anteil des Moleküls.

**[0070]** Antigene Fragmente können durch Verfahren aus dem Stand der Technik identifiziert werden. Fragmente, die antigene Sequenzen beinhalten, können auf der Basis von allgemein anerkannten Kriterien für potentielle Antigenizität und/oder Exposition ausgewählt werden. Solche Kriterien schließen die Hydrophilizität und den relativen antigenen Index mit ein, wie er durch die Analyse der Oberflächenexposition von Proteinen be-

stimmt wurde. Die Bestimmung von geeigneten Kriterien sind einem Fachmann bekannt und wurden z. B. beschrieben durch Hopp et al., in Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78, 3824–3828 (1981); Kyte et al., J. Mol. Biol. 157, 105–132 (1982); Emini, J. Virol. 55, 836–839 (1985); Jameson et al., CA BIOS 4, 181–186 (1988); und Karplus et al., Naturwissenschaften 72, 212–213 (1985). Aminosäure-domänen, von denen anhand dieser Kriterien vorhergesagt wurde, dass sie an der Oberfläche liegen, werden vorzugsweise gegenüber Domänen ausgewählt, von denen vorhergesagt wird, dass sie mehr hydrophob oder versteckt sind.

**[0071]** Die Proteine und Fragmente der als Antigene zu verwendenden Rezeptoren können durch Verfahren aus dem Stand der Technik hergestellt werden. Solche Verfahren schließen die Isolierung oder Synthese von DNA mit ein, die die Proteine und Fragmente kodieren, sowie die Verwendung der NDA zur Herstellung der oben beschriebenen rekombinanten Proteine.

**[0072]** Fragmente von Proteinen und DNA, die diese Fragmente kodieren, können chemisch durch Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, aus individuellen Aminosäuren und Nukleotiden synthetisiert werden. Geeignete Verfahren für die Synthese von Proteinfragmenten werden durch Stuart und Young in "Solid Phase Peptide Synthesis," Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) beschrieben. Geeignete Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten werden von Caruthers in Science 230, 281–285 (1985) beschrieben.

**[0073]** Falls das Rezeptorfragment ein Epitop definiert, dieses aber zu kurz ist, um antigen zu sein, kann es für die Herstellung von Antikörpern mit einem Trägermolekül verbunden werden. Einige geeignete Trägermoleküle schließen keyhole limpet hemocyanin, Ig-Sequenzen, TrpE und humanes oder bovines Serumalbumin mit ein. Die Konjugation kann durch Verfahren ausgeführt werden, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Ein solches Verfahren ist die Kombination eines Cystein-Restes des Fragments mit einem Cystein-Rest des Trägermoleküls.

**[0074]** Die Antikörper sind vorzugsweise monoklonal. Monoklonale Antikörper können durch Verfahren hergestellt werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Diese Verfahren schließen die immunologischen Verfahren mit ein, die beschrieben wurden durch Kohler und Milstein in Nature 256, 495–497 (1975) und Campbell in "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" in Burdon et al., Hrsg., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Band 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); wie auch durch die rekombinanten DNA-Verfahren, die durch Huse et al. in Science 246, 1275–1281 (1989) beschrieben wurden.

**[0075]** Polyklonale oder monoklonale Antiseren, von denen gezeigt wurde, dass sie mit Rezeptor kodierten nativen Proteinen reaktiv sind, z. B. mit flk-1 kodierten Proteinen, und auf der Oberfläche von lebensfähigen Zellen exprimiert werden, werden verwendet, um Antikörper positive Zellen zu isolieren. Ein Verfahren zur Isolierung solcher Zellen ist Durchflusszytometrie, siehe z. B. Loken et al., Europäische Patentanmeldung 317, 156. Die erhaltenen Zellen werden durch Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, in mit Hilfe von Wirten eingepflanzt, die mit Hilfe von Strahlung geschwächt wurden, und auf Stammzellen geprüft; siehe z. B. Joran et al., Cell 61, 953–963 (1990).

Kriterien für eine neue Stammzell Rezeptor Tyrosin Kinase, die in Stammzellen exprimiert wird

**[0076]** Zusätzliche neue cDNAs von Rezeptor Tyrosin Kinasen werden durch die Amplifikation von cDNAs aus Stammzellpopulationen durch die Verwendung von Oligonukleotiden als PCR-Primer gewonnen; siehe oben. Beispiele geeigneter Oligonukleotide sind PTK1 und PTK2, die durch Wilks et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1603–1607 (1989) beschrieben werden. Eine neue cDNA wird auf der Basis eines Screenings mittels differenzieller Hybridisierung mit Proben ausgewählt, die bekannte Kinasen repräsentieren. Nur die bei geringer Stringenz hybridisierenden cDNA-Klone werden ausgewählt und sequenziert. Die Anwesenheit des Aminosäure-Triplets DFG bestätigt, dass die Sequenzen eine Kinase darstellen. Der Erkennungsrest Methionin im WMAPES-Motiv ist Anzeichen für eine wie oben beschriebene Rezeptor ähnliche Kinase. Erhaltene potentiell neue Sequenzen werden mit verfügbaren Sequenzen durch die Verwendung von Datenbanken, wie Genbank, verglichen, um deren Einzigartigkeit zu bestätigen. Gen-spezifische Oligonukleotide werden wie oben beschrieben auf der Basis der erhaltenen Sequenzen hergestellt. Die Oligonukleotide werden verwendet, um mit Stammzellen angereicherte oder reduzierte Populationen auf Expression zu analysieren. Solche Zellpopulationen sind in Mäusen beschrieben, z. B. durch Jordon et al., in Cell 61, 953–956 (1990); Ikuta et al., in Cell 62, 863–864 (1990); Spangrude et al. in Science 241, 58–62 (1988); und Szilvassy et al., in Blood 74, 930–939 (1989). Beispiele solcher humaner Zellpopulationen werden als CD33<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> von Andrews et al. im Journal of Experimental Medicine 169, 1721–1731 (1989) beschrieben. Andere humane Stammzellpopulationen werden z. B. in Civin et al., Europäische Patentanmeldung 395,355 und in Loken et al., Europäische Patentanmeldung

317,156 beschrieben.

## BEISPIELE

### Beispiel 1.

#### Zellen enthaltend Maus flk-1 und flk-2 Liganden Murine stromale Zelllinie 2018

**[0077]** Um stromale Zelllinien zu etablieren werden fötale Leberzellen mit Hilfe von Collagen vereinzelt und in einer Mischung von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen werden durch Standardverfahren immortalisiert. Ein geeignetes Verfahren schließt das Einschleusen von DNA, die eine wachstumsregulierende oder Oncogen-kodierende Sequenz kodiert, in eine Wirtszelle mit ein. Die DNA kann mit Hilfe der Transduktion in einen rekombinanten viralen Partikel oder durch Transfektion in ein Plasmid eingeschleust werden. Siehe z. B. Hammer-schmidt et al., Nature 340, 393–397 (1989) und Abcouwer et al., Biotechnology 7, 939–946 (1989). Retroviren sind die bevorzugten viralen Vektoren, obwohl SV40 und Epstein-Barr-Virus ebenfalls als Donor für die das Wachstum verstärkenden Sequenzen dienen kann. Ein geeigneter Retrovirus ist der ecotrope Retrovirus, der ein temperatursensitives SV40 T-Antigen (tsA58) und ein G418 Resistenzgen beinhaltet, das von McKay in Cell 66, 713–729 (1991) beschrieben wurde. Nach mehreren Tagen bei 37°C wird die Temperatur des Mediums auf 32°C gesenkt. Die Zellen werden mit G418 (0,5 mg/ml) ausgewählt. Die ausgewählten Zellen werden expandiert und aufbewahrt.

**[0078]** Eine stromale Zelllinie aus Maus, die durch dieses Verfahren hergestellt wurde, wird 2018 genannt und wurde am 30. Oktober 1991 bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC); Hinterlegungsnummer CRL 10907 hinterlegt.

### Beispiel 2.

#### Zellen die Liganden von humanem flk-1 und flk-2 enthalten

**[0079]** Humane fötale Leber (18, 20 und 33 Wochen nach Abbruch der Schwangerschaft), Milz (18 Wochen nach Abbruch der Schwangerschaft) oder Thymus (20 Wochen nach Abbruch der Schwangerschaft) wird zum Zeitpunkt des Abbruchs der Schwangerschaft entfernt und in einer ausgeglichenen Salzlösung aufbewahrt. Nach Zerkleinerung in 1 mm große Fragmente und Pressen durch ein Drahtnetz wird das Gewebe einmal in Hanks ausgeglichener Salzlösung (HBSS) gewaschen.

**[0080]** Das zerrissene Gewebe wird bei 200 xg 15 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in 10–20 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung in einer Reinheit für Gewebekulturen (Flow Laboratories) resuspendiert. Das resuspendierte Gewebe wird in einen sterilen Kolben überführt und mit einem Rührer bei Raumtemperatur 10 Minuten lang gerührt. Zu einer finalen Konzentration von 10% wird 1 ml hitzeinaktiviertes fötales bovines Kälberserum (Hyclone) zugegeben, um die Trypsin-Aktivität zu inhibieren. Aus einer Stammlösung (10 mg/ml in HBSS) wird Collagenase Typ IV (Sigma) bis zu einer finalen Konzentration von 100 µg/ml zugegeben, um die stromalen Zellen zu zerreißen. Das Gewebe wird bei Raumtemperatur für weitere 2,5 Stunden gerührt; durch Zentrifugation (400 xg, 15 Minuten) gesammelt; und in "stromalem Medium" resuspendiert, das Iscove's Modifikation von DMEM beinhaltet, dem 10% hitzeinaktiviertes fötales Kalbsserum zugesetzt wird sowie 5% hitzeinaktiviertes humanes Serum (Sigma), 4 mM L-Glutamin, 1x Natriumpyruvat (100fache Stammlösung, Sigma), 1x nicht-essentielle Aminosäuren (100fache Stammlösung, Flow) und eine Mischung der Antibiotika Kanomycin, Neomycin, Penicillin, Streptomycin. Vor dem Resuspendieren des Pellets im stromalen Medium wird das Pellet einmal mit HBSS gewaschen. Es ist angemessen, die Zellen in 60 ml Medium zu suspendieren. Die Anzahl von Kulturen hängt von der Menge des Gewebes ab.

### Beispiel 3.

#### Isolierung stromaler Zellen

**[0081]** Resuspendierte Zellen (Beispiel 2), die bei 37°C mit 5% Kohlendioxid inkubiert werden, beginnen innerhalb von 10–48 Stunden an der Plastikplatte zu haften. Konfluente Monolayer-Schichten können innerhalb von 7–10 Tagen beobachtet werden, abhängig von der Anzahl der im anfänglichen Impfmateriale ausplattierten Zellen. Nicht-haftende und hochrefraktile Zellen, die an der Schicht aus stromalen Zellen als Kolonien haften, werden getrennt durch Pipettieren entfernt und eingefroren. Nicht-haftende Zellen sind wahrscheinlich Quellen

für Populationen selbst erneuernder Stammzellen, die flk-2 enthalten. Die haftenden Schichten stromaler Zellen werden für zukünftige Studien in Aliquots eingefroren oder zum Wachstum in Kulturen expandiert.

**[0082]** Für die Bindung von APTag-flk-2 Fusionsprotein an fötalen Milzzellen wurde ein unerwartet hoher Wert beobachtet. Zwei fötale Milzzelllinien werden in "stromalem Medium" wachsen gelassen, welches in Beispiel 2 beschrieben wird.

**[0083]** Nicht-haftende fötale Stammzellen binden an die stromalen Zellen und bilden Kolonien (colony forming unit – CFU). Stromale Zellen und CFU werden durch die Verwendung von sterilen Glaszylindern isoliert und in Kultur expandiert. Ein Klon, Fsp 62891 genannt, enthält den flk-2 Liganden. Fsp 62891 wurde bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA am 21. November 1991 unter der Hinterlegungsnummer CRL 10935 hinterlegt.

**[0084]** Fötale Leber- und fötale Thymuszellen werden auf ähnliche Art präpariert. Jede dieser beiden Zelltypen produziert Liganden von flk-1 und, im Falle der Leber, etwas flk-2. Eine solche fötale Thymuszelllinie F.thy 62891 genannt, und eine solche Leberzelllinie, FL 62891 genannt, wurden bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA am 21. November 1991 bzw. am 2. April 1992 unter den Hinterlegungsnummern CRL 10936 bzw. CRL 11005 hinterlegt.

**[0085]** Stabile humane Zelllinien werden aus fötalen Zellen mit dem gleichen temperatursensitiven immortalisierenden Virus hergestellt, der verwendet wurde, um die in Beispiel 1 beschriebene murine Zelllinie herzustellen.

#### Beispiel 4.

##### Isolierung humaner stromaler Zellklone

**[0086]** Hoch refraktile Zellen überwachsen Flecken von stromalen Zellen, vermutlich, weil die stromale Zelle Faktoren produzieren, die die Bildung der CFUs erlauben. Um stromale Zellklone zu isolieren, werden sterile Glaszylinder, die mit Vakuumschmiermittel beschichtet wurden, über den CFUs positioniert. Eine Trypsin-ED-TA-Lösung (100 ml) wird zugegeben, um die Zellen abzulösen. Die Zellen werden zu 5 ml stromalen Mediums zugegeben und jeder (Klon) in einer einzelnen Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen ausplattiert.

#### Beispiel 5.

##### Plasmid (APTag) zur Expression sekretierbarer alkalischer Phosphatase (SEAP)

**[0087]** Plasmide, die sekretierbare alkalische Phosphatase exprimieren, werden von Flanagan und Leder in Cell 63, 185–194 (1990) beschrieben. Die Plasmide enthalten einen Promotor, z.B. den LTR-Promotor; einen Polylinker, enthaltend HindIII und BglII; DNA, die SEAP kodiert; ein Poly-A-Signal; und ein Ampicillin-Resistenzgen, und eine Replikationsstelle.

#### Beispiel 6.

##### Plasmid zur Expression von APTag-flk-2 und APTag-flk-1 Fusionsproteinen

**[0088]** Plasmide, die Fusionsproteine von SEAP und den extrazellulären Anteil von entweder flk-1 oder flk-2 exprimieren, werden in Übereinstimmung mit den Protokollen exprimiert, die von Flanagan und Leder in Cell 63, 185–194 (1990) und Berger et al., Gene 66, 1–10 (1988) beschrieben wurden. Kurz beschrieben wird ein HindIII-Bam HI-Fragment hergestellt, das den extrazellulären Anteil von flk-1 oder flk-2 enthält, und in die HindIII-BglII-Schnittstelle des in Beispiel 5 beschriebenen Plasmids inseriert.

#### Beispiel 7.

##### Produktion von APTag-flk-1 oder -flk-2 Fusionsprotein

**[0089]** Die Plasmide aus Beispiel 6 können in COS-7-Zellen mittels DEAE-Dextran transfiziert (wie in Current Protocols in Molecular Biology, Unit 16.13, "Transient Expression of Proteins Using Cos Cells," 1991 beschrieben); und werden mit einem selektierbaren Marker, wie z.B. pSV7neo, in NIH/3T3-Zellen durch Kalzium-Präzipitation cotransfiziert. Die NIH/3T3-Zellen werden mit 600 µg/ml G418 in 100 mm Platten selektiert. Über 300

Klone werden auf die Sekretion plazentaler alkalischer Phosphatase-Aktivität gescreent. Der Assay wird durch Erhitzen eines Teils des Überstandes auf 65°C für 10 Minuten durchgeführt, um Phosphatase-Aktivität im Hintergrund zu inaktivieren, und durch die Messung des OD<sub>405</sub> nach der Inkubation mit 1 M-Diethanolamin (pH 9,8), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM L-Homoarginin (ein Phosphatase-Inhibitor), 0,5 mg/ml BSA und 12 mM p-Nitrophenylphosphat. Humane plazentale alkaline Phosphatase wird verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen. Die APtag-flk-1-Klone (F-1AP21-4) produzieren bis zu 10 µg alkalischer Phosphatase-Aktivität/ml und die APtag-flk-2-Klone (F-2AP26-0) produzieren bis zu 0,5 µg alkalischer Phosphatase-Aktivität/ml.

#### Beispiel 8.

##### Assay zur Bildung von APtag-flk-1- oder APtag-flk-2-Zellen

**[0090]** Die Bindung von APtag-flk-1 oder APtag-flk-2-Zellen, die den geeigneten Liganden enthalten, wird mit Hilfe von Standardverfahren geprüft. Siehe beispielsweise Flanagan und Leder, Cell 63: 185–194 (1990). Zellen (z. B. stromale Zellen aus Maus, humane fötale Leber-, Milz- oder Thymus-, oder verschiedene Kontrollzellen) lässt man bis zum Gleichgewicht in Platten mit 6 Vertiefungen wachsen wäscht sie mit HBHA ("Hank's balanced salt solution" mit 0,5 mg/ml BSA, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, pH 7,0). Die Überstände von transfizierten COS- oder NIH/3T3-Zellen, die entweder Aptaq-flk-1-Fusionsprotein, APtag-flk-2 Fusionsprotein, oder APtag ohne einen Rezeptor (als Kontrolle) enthalten, werden zu den Zell-Monolayer-Schichten zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer rotierenden Plattform inkubiert. Die Konzentration des Aptaq-flk-1 Fusionsproteins, APtag-flk-2 Fusionsproteins, oder APtag ohne einen Rezeptor beträgt 60 ng/ml an alkalischer Phosphatase, was mittels der Standardkurve für alkalische Phosphatase bestimmt (siehe oben) wurde. Die Zellen werden dann siebenmal mit HBHA gewaschen und in 350 µl 1%iger Triton X-100™, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) lysiert. Die Lysate werden in ein Mikrofugen-Röhrchen überführt, zusammen mit weiteren 150 µl Waschlösung mit der gleichen Lösung. Nach kräftigen Vortexen werden die Proben 5 Minuten in einer Mikrofuge zentrifugiert, bei 65°C für 12 Minuten erhitzt, um zelluläre Phosphatase zu inaktivieren und auf Phosphatase-Aktivität wie vorher beschrieben geprüft. Die Ergebnisse der Experimente, die entworfen wurden, um die Zeit und Dosis-Antworten der Bindung zwischen stromalen Zellen zu zeigen, die die Liganden für flk-2 und flk-1 (2018) und APtag-flk-2, APtag-flk-1 und APtag ohne Rezeptor (als Kontrolle) enthalten, werden in den [Fig. 3](#) bzw. [Fig. 4](#) gezeigt.

#### Beispiel 8A.

##### Plasmide zur Expression von flk1/fms und flk2/fms Fusionsproteinen

**[0091]** Plasmide, die Fusionsproteine des extrazellulären Anteils von entweder flk-1 oder flk-2 und den extrazellulären Anteil von c-fms (ebenfalls bekannt als Kolonie stimulierender Faktor-1 Rezeptor) exprimieren, werden in einer ähnlichen Art hergestellt, wie unter Beispiel 6 beschrieben, (Plasmide zur Expression von APtag-flk-2 und APtag-flk-1 Fusionsproteinen). Kurz gesagt, wird ein Hind III – Bam HI Fragment hergestellt, das den extrazellulären Anteil von flk1 oder flk2 enthält, und in die Hind III – Bgl II Schnittstelle eines pLH Expressionsvektors inseriert, der den intrazellulären Anteil von c-fms enthält.

#### Beispiel 8B.

##### Expression von flk1/fms oder flk2/fms in 3T3-Zellen

**[0092]** Die Plasmide aus Beispiel 11 werden in NIH/3T3-Zellen mit Hilfe von Kalzium transfiziert. Der intrazelluläre Anteil von c-fms wird über Western Blot-Technik detektiert.

#### Beispiel 9.

Klonierung und Expression einer cDNA, die für den Liganden für flk-1 und flk-2 Rezeptoren aus Maus kodiert

**[0093]** cDNA, die den Mausliganden für flk-1 und flk-2 exprimiert, wird über bekannte Verfahren hergestellt. Siehe z. B. Seed, B., und Aruffo, A. PNAS 84: 3365–3369 (1987); Simmons, D. und Seed, B. J. Immunol. 141:2797–2800; und D'Andrea, A. D., Lodish, H. F. und Wong, G. G. Cell 57:277–285 (1989).

**[0094]** Die Protokolle werden unten in Reihen aufgeführt: (a) RNA Isolation; (b) poly-A RNA Herstellung; (c) cDNA-Synthese; (d) cDNA-Größenfraktionierung; (e) Vermehrung der Plasmide (Vektor); (f) Isolierung von Plasmid DNA; (g) Herstellung des Vektors pSV Sport™ (BRL Gibco) zur Klonierung; (h) Kompilierung von Puf-

fern für die oben genannten Schritte; (i) Transfektion von cDNA, die Liganden in COS 7-Zellen kodiert; (j) Panning-Prozedur; (k) Expressionsklonierung von flk-1 oder flk-2 Liganden durch Etablierung einer autokrinen Schleife.

#### 9a. Guanidinthiocyanat/LiCl-Protokoll zur RNA Isolation

**[0095]** Für jeden ml der gewünschten Mischung werden 0,5 g Guanidinthiocyanat (GuSCN) in 0,55 ml 25%igem LiCl gelöst (die Stammlösung wird durch einen 0,45 Mikron Filter filtriert). 20 µl Mercaptoethanol wird zugesetzt. (Die erhaltene Lösung hält sich nicht länger als eine Woche bei Raumtemperatur.)

**[0096]** Die 2018 stromalen Zellen werden zentrifugiert, und 1 ml der oben beschriebenen Lösung wird bis zu einer Menge von  $5 \times 10^7$  Zellen angereichert. Mit Hilfe eines Polytrons werden die Zellen aufgetrennt, bis die Mischung nicht mehr viskos ist. Für Präparationen in kleinem Maßstab ( $<10^8$  Zellen) wird die aufgetrennte Mischung auf 1,5 ml eine 5,7 M CsCl-Lösung geschichtet (RNase frei; 1,26 g CsCl wird zu jedem ml einer 10 mM EDTA-Lösung (pH 8) zugesetzt) und, falls notwendig, mit RNase-freiem Wasser überschichtet. Die Mischung wird in einem SW55-Rotor bei 50 krpm für 2 Stunden zentrifugiert. Bei Präparationen in großem Maßstab werden 25 ml der Mischung auf 12 ml CsCl in einem SW28-Röhrchen geschichtet, wie oben überschichtet und bei 24 krpm für 8 Stunden zentrifugiert. Der Inhalt des Röhrchens wird vorsichtig mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt, die mit einer Vakuumpflasche verbunden ist. Ist das CsCl-Interface passiert, wird mit der Pipettenspitze ein Band rund um das Röhrchen gekratzt, um einem Kriechen der Schicht an der Wand des Röhrchens hinunter vorzubeugen. Die verbleibende CsCl-Lösung wird abgesaugt. Das verbleibende Pellet wird in Wasser aufgenommen aber nicht wieder aufgelöst. 1/10 Volumen an Natriumazetat und drei Volumina an Ethanol werden zur Mischung zugesetzt und zentrifugiert. Das Pellet wird, falls notwendig, in Wasser bei 70°C resuspendiert. Die Konzentration der RNA wird auf 1 mg/ml eingestellt und eingefroren.

**[0097]** Es sollte festgehalten werden, dass kleine RNA-Moleküle (z. B. 5S) nicht ausfallen. Für kleinere Mengen an Zellen werden die Volumina verkleinert und die Mischung wird mit GuSCN in RNase-freiem Wasser auf einem Gradienten überschichtet (eine Präzipitierung ist nicht effizient, falls die RNA verdünnt vorliegt).

#### 9b. Poly-A RNA Herstellung

(Alle erwähnten Puffer werden unten getrennt aufgeführt)

**[0098]** Eine Einwegsäule aus Polypropylen wird durch Waschen mit 5M NaOH und anschließendem Spülen mit RNase-freiem Wasser präpariert. Für jedes Milligramm an gesamter RNA werden ungefähr 0,3 ml (endgültiges gepacktes Bett) an Oligo dT Zellulose zugesetzt. Die Oligo dT Zellulose wird durch Resuspendieren von ungefähr 0,5 ml trockenem Pulver in 1 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung hergestellt und in die Säule transferiert, oder durch Filtrieren einer 0,1 M NaOH-Lösung durch eine kürzlich verwendete Säule. Die Säule wird mit verschiedenen Säulenvolumina an RNase-freiem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert neutral ist, und mit 2–3 ml des Auftragspuffers gespült. Das Säulenbett wird in ein steriles 15 ml Röhrchen durch die Verwendung von 4–6 ml an Ladungspuffer überführt.

**[0099]** Die gesamte RNA der 2018 Zelllinie wird für 2–3 Minuten auf 70°C erhitzt. LiCl wird aus der RNase-freien Stammlösung bis zu einer endgültigen Konzentration von 0,5 M zur Mischung zugesetzt. Die Mischung wird im 15 ml-Röhrchen mit Oligo-dT-Zellulose kombiniert, die für 10 Minuten gevortexed oder geschüttelt wird. Die Mischung wird in die Säule gegossen und mit 3 ml Ladungspuffer gewaschen, und anschließend mit 3 ml mittlerem Waschpuffer. Die mRNA wird direkt in ein SW55-Röhrchen mit 1,5 ml einer Lösung von 2 mM EDTA und 0,1% SDS eluiert, wobei die ersten zwei oder drei Tropfen verworfen werden.

**[0100]** Die eluierte mRNA wird durch Zusetzen 1/10 Volumen einer 3M-Natriumazetatlösung und Auffüllen des Röhrchens mit Ethanol präzipitiert. Der Inhalt des Röhrchens wird gemischt, für 30 Minuten bei 20°C gekühlt und bei 50 krpm bei 5°C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantierung des Ethanols und Lufttrocknen des Röhrchens wird das mRNA-Pellet in 50–100 µl an RNase-freiem Wasser resuspendiert. 5 µl der resuspendierten mRNA wird auf 70°C in MOPS/EDTA/Formaldehyd erhitzt und auf einem RNase-freien 1 %igen Agarosegel untersucht.

#### 9c. cDNA-Synthese

**[0101]** Das verwendete Verfahren ist eine Variation des durch Gubler und Hoffman beschriebenen Verfahrens in Gene 25, 263–270 (1983)

## 1. Erster Strang

**[0102]** 4 µg an mRNA wird in ein Mikrofugen-Röhrchen gegeben, auf etwa 100°C für 30 Sekunden erhitzt, und auf Eis abschreckt. Das Volumen wird auf 70 µl mit RNase-freiem Wasser eingestellt. 20 µl an RT1-Puffer, 2 µl an RNase-Inhibitor (Boehringer 36 u/µl), 1 µl an 5 µg/µl Oligo dT (Collaborative Research), 2,5 µl an 20 mM dXTP's (ultrapure – US Biochemicals), 1 µl an 1 M DTT und µl an RT-XL (Life Sciences, 24 µ/µl) werden zugesetzt. Die Mischung wird bei 42°C für 40 Minuten inkubiert, und durch Erhitzen bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert.

## 2. Zweiter Strang

**[0103]** 320 µl an RNase-freiem Wasser, 80 µl an RT2-Puffer, 5 µl an DNA Polymerase I (Boehringer, 5 µ/µl), 2 µl RNase H (BRL 2 µ/µl) werden zur Lösung zugesetzt, die den ersten Strang enthält. Die Lösung wird bei 15°C für eine Stunde inkubiert und bei 22°C für eine weitere Stunde. Nach Zugabe von 20 µl einer Lösung von 0,5 M EDTA, pH 8,0, wird die Lösung mit Phenol extrahiert und durch die Zugabe von NaCl zu 0,5 M linearem Polyacrylamid (Träger) bis zu einem Wert von 20 µg/ml und Auffüllen des Röhrchens mit EtOH präzipitiert. Das Röhrchen wird für 2–3 Minuten in einer Mikrofuge zentrifugiert, gevortexed, um präzipitiertes Material von der Röhrchenwand zu entfernen, und für eine weitere Minute zentrifugiert.

## 3. Adaptoren

**[0104]** Adaptoren stellen spezifische Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, um die Klonierung zu erleichtern und sind von BRL Gibco, New England Biolabs, etc. erhältlich. Die rohen Adaptoren werden bei einer Konzentration von 1 µg/µl resuspendiert. MgSO<sub>4</sub> wird bis zu einer finalen Konzentration von 10 mM zugegeben, gefolgt von einer 5fachen Volumeneinheit an EtOH. Das resultierende Präzipitat wird mit 70° EtOH gespült und in TE bei einer Konzentration von 1 µg/µl resuspendiert. Zu der Kinase werden 25 µl an resuspendierten Adaptoren zu 3 µl 10X Kinase-Puffer und 20 Einheiten an Kinase zugegeben. Die Mischung wird bei 37°C über Nacht inkubiert. Die präzipitierte cDNA wird in 240 µl TE (10/1) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl eines 10X Nidrigsalz-Puffers, 30 ml eines 10X Ligations-Puffers mit 0,1 mM ATP, 3 µl (2,4 µg) an kinasierter 12-mer Adaptersequenz, 2 µl (1,6 µg) an kinasierter 8-mer Adaptersequenz, und 1 µl an T4 DNA Ligase (BioLabs, 400 µ/µl oder Boehringer, 1 Weiss'sche Einheit ml), die Mischung wird bei 15°C über Nacht inkubiert. Die cDNA wird mit Phenol extrahiert und wie oben beschrieben präzipitiert, mit der Ausnahme, dass der zusätzliche Träger ausgelassen wird, und in 100 µl an TE resuspendiert.

## 9d cDNA-Größenfraktionierung

**[0105]** Eine Lösung mit 20% KOAc, 2 mM EDTA, 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung und eine Lösung aus 5% KOAc, 2 mM EDTA, 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung werden hergestellt. 2,6 ml der 20%igen KOAc-Lösung werden zur hinteren Kammer eines kleinen Gradientenerzeugers zugegeben. Luftblasen werden dadurch vom Röhrchen entfernt, das die beiden Kammern miteinander verbindet, dass man die 20%ige Lösung in die vordere Kammer fließen lässt und die Lösung durch Kippen des Gradientenerzeugers zwingt, in die hintere Kammer zurückzufließen. Der Durchgang zwischen den Kammern wird geschlossen und 2,5 ml einer 5%igen Lösung wird in die vordere Kammer zugegeben. Jegliche Flüssigkeit im Röhrensystem von einem vorherigen Lauf wird dadurch entfernt, dass man die 5%ige Lösung zum Ende des Röhrensystems und dann in seine Kammer zurückkehren lässt. Der Apparat wird auf einen Rührer gestellt und, bei schnellem Rühren, werden der obere Hahn, der die beiden Kammern verbindet und der vordere Stopphahn geöffnet. Ein Polyallomer 5W55-Röhrchen wird von Grund an mit der KOAc-Lösung gefüllt. Der Gradient wird mit 100 µl einer cDNA-Lösung überschichtet und für 3 Stunden bei 50 k rpm bei 22°C zentrifugiert. Um Fraktionen des Gradienten zu sammeln, wird das SW55-Röhrchen nahe am Boden des Röhrchens mit einem Butterfly-Infusionsset durchbohrt (mit entferntem Luer-Rädchen). Drei 0,5 ml-Fraktionen und anschließend sechs 0,25 ml-Fraktionen werden in einem Mikrofugen-Röhrchen gesammelt (ungefähr 22, bzw. 11 Tropfen). Die Fraktionen werden durch Zugabe linearen Polyacrylamids auf 20 µg/ml und durch das Auffüllen des Röhrchens mit Ethanol bis zur Spitze präzipitiert. Die Röhrchen werden gekühlt, in einer Mikrofuge für 3 Minuten zentrifugiert, gevortexed und wiederum für 1 Minute zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets werden mit 70% Ethanol gespült und wiederum zentrifugiert, wobei darauf geachtet wird, die Pellets nicht bis zur Vollständigkeit austrocknen zu lassen. Jede 0,25 ml Fraktion wird in 10 µl TE resuspendiert und 1 µl wird auf einem 1 %igen Agarose-Minigel analysiert. Die ersten drei und die letzten sechs Fraktionen, die kein Material enthalten, das kleiner als 1 kb ist, werden gesammelt.



## 9e. Vermehrung der Plasmide

**[0106]** SupF-Plasmide werden in nicht-supprimierenden bakteriellen Wirtszellen selektiert, die ein zweites Plasmid enthalten, p3, das Amber-mutiertes Ampicillin und Resistentelemente des Wirkstoffs Tetracyclin enthält. Siehe Seed, *Nucleic Acids Res.*, 11, 2427–2445 (1983). Das p3-Plasmid ist von RP1 abgeleitet, ist 57 kb lang, und ist ein stabil erhaltenes, in einer einzelnen Kopie vorliegendes Episom. Die Ampicillin-Resistenz dieses Plasmids kehrt sich bei einer hohen Rate um, so dass Amp-Plasmide gewöhnlich nicht in p3-enthaltenden Stämmen eingesetzt werden können. Die Selektion auf Tetracyclin-Resistenz allein ist beinahe genau so gut wie die Selektion auf Ampicillin-Tetracyclin-Resistenz. Wie auch immer, spontanes Erscheinen von Mutationen chromosomaler Suppressor tRNA stellt einen unvermeidbaren Hintergrund in diesem System dar (Häufigkeit bei etwa  $10^{-9}$ ). Kolonien, die aus spontanen Suppressormutationen entstehen, sind gewöhnlich größer als Kolonien, die von Plasmidtransformationen ausgehend entstehen. Suppressorplasmide werden in Luria Broth (LB) Medium selektiert, das 12,5 µg/ml Ampicillin und 7,5 µg/ml Tetracyclin enthält. Für Plasmidpräparationen in vergrößertem Maßstab wird M9 Casamino-Aminosäure-Medium, welches Glycerol (0,8%) enthält, als Kohlenstoffquelle bereit gestellt. Die Bakterien wachsen bis zur Sättigung.

**[0107]** Alternativ wird pSV Sport™ (BRL, Gaithersberg, Maryland) verwendet, um von SV40 abgeleitete Sequenzen zur Replikation, Transkription, Initiierung und Terminierung in COS 7-Zellen bereit zu stellen, sowie solche Sequenzen, die zur Replikation und Ampicillin-Resistenz in *E. coli* notwendig sind.

## 9f. Isolation des Vektors DNA/Plasmid

**[0108]** Ein Liter an gesättigten bakteriellen Zellen wird in J6-Flaschen bei 4,2k rpm für 25 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden in 40 ml 10 mM EDTA, pH 8 resuspendiert. 80 ml 0,2M NaOH und 1 % SDS werden zugegeben und die Mischung wird verwirbelt bis sie klar und viskos ist. 40 ml 5M KOAc, pH 4,7 (2,5M KOAc, 2,5M HOAc) werden zugegeben, und die Mischung wird mäßig stark geschüttelt, bis die Größe der Klumpen ungefähr 2–3 mm beträgt. Die Flasche wird bei 4,2k rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein Käsetuch in eine 250 ml-Flaschen gegossen, welche dann mit Isopropylalkohol aufgefüllt und bei 4,2 k rpm für 5 Minuten zentrifugiert wird. Die Flasche wird sanft entwässert und mit 70%igem Ethanol gespült, wobei darauf geachtet wird, dass das Pellet nicht zerteilt wird. Nach Umdrehen der Flasche und Entfernung der Spuren an Ethanol wird die Mischung in 3,5 ml Tris-Base/EDTA (20 mM/10 mM) resuspendiert. 3,5 ml an resuspendiertem Pellet und 0,75 ml an 10 mg/ml Ethidiumbromid werden zu 4,5 g CsCl zugesetzt. VTI80-Röhrchen werden mit der Lösung gefüllt und für mindestens 2,5 Stunden bei 80k rpm zentrifugiert. Die Banden werden bei sichtbarem Licht mit einer 1 ml Spritze und einer Nadel mit 20er-Nadelgröße oder kleineren Nadeln extrahiert. Die Spitze des Röhrchens wird mit einer Schere abgeschnitten und die Nadel wird aufwärts in das Röhrchen mit einem Winkel von etwa 30 Grad in Bezug auf das Röhrchen bei einer Position von etwa 3 mm neben der Bande eingeführt, wobei die Nadel aufwärts gerichtet ist. Nachdem die Bande entfernt ist, wird der Inhalt des Röhrchens in Bleiche gegeben. Die extrahierte Bande wird in einem 13 ml-Sarstedt-Röhrchen gelagert, das danach bis zur Spitze mit n-Butanol aufgefüllt wird, das mit 1 M NaCl Extrakt gesättigt ist. Falls die Menge an DNA groß ist, kann die Extraktionsprozedur wiederholt werden. Nach Absaugen des Ethanols in eine Falle, die 5M NaOH enthält um Ethidium zu zerstören, wird ein etwa gleiches Volumen an 1 M-Ammoniumazetat und ungefähr zwei Volumina an 95%igem Ethanol zur DNA zugegeben, die dann bei 10k rpm für 5 Minuten zentrifugiert wird. Das Pellet wird vorsichtig mit 70% Ethanol gespült und mit einem Tupfer oder Gefriertrockner getrocknet.

## 9g. Herstellung eines Vektors zur Klonierung

**[0109]** 20 µg des Vektors werden in einer 200 µl Reaktion mit 100 Einheiten an BstXI (New York Biolabs) bei 50°C über Nacht in einem gut thermostatisierten, zirkulierenden Wasserbad geschnitten. Kaliumazetat-Lösungen (5 und 20%) werden im 5W55-Röhrchen wie oben beschrieben hergestellt. 100 µl des verdauten Vektors werden zu jedem Röhrchen zugegeben und für 3 Stunden bei 50k rpm und bei 22°C zentrifugiert. Unter 300 nm UV-Licht wird beobachtet, dass die gewünschte Bande bei 2/3 der Länge des Röhrchens wandert. Ein Ausschweifen der Bande nach vorne deutet eine Überladung des Gradienten an. Die Bande wird mit einer 1 ml-Spritze entfernt, an die Nadel mit 20-er Nadelgröße befestigt ist. Nach Zugabe linearem Polyacrylamids und Präzipitieren des Plasmids durch Zugabe von drei Volumeneinheiten an Ethanol wird das Plasmid in 50 µl TE resuspendiert. Probeligationen werden mit einer konstanten Menge an Vektor und steigenden Mengen an cDNA durchgeführt. Ligationen in großem Maßstab werden auf der Basis dieser Versuchslegationen durchgeführt. Gewöhnlich wird für die gesamte cDNA-Präparation 1–2 µg an geschnittenem Vektor benötigt.

## 9h. Puffer

Ladepuffer:	0.5M LiCl; 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 0.1% SDS.
Mittlerer Waschpuffer:	0.15M LiCl; 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 0.1% SDS.
RT1-Puffer:	0.25M Tris pH 8,8 (8,2 at 42); 0.25M KCl; 30 mM MgCl <sub>2</sub> .
RT2-Puffer:	0.1 M Tris pH 7,5; 25 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5M KCl; 0.25 mg/ml BSA; 50 mM Dithiothreitol (DTT).
10X Niedrigsalz:	60 mM Tris pH 7,5; 60 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM NaCl; 2,5 mg/ml BSA; 70 mM DME.
10X Ligationszusätze:	1 mM ATP; 20 mM DTT; 1 mg/ml BSA 10 mM Spermidin.
10X Kinasierungs-Puffer:	0.5M Tris pH 7,5; 10 mM ATP; 20 mM DTT; 10 mM Spermidin; 1 mg/ml BSA 100 mM MgCl <sub>2</sub> .

## 9i. Transfektion von cDNA, die Liganden in COS 7-Zellen kodiert

**[0110]** COS 7-Zellen werden 1:5 auf 100 mm-Platten in Dulbecco's modifizierten Eagles-Medium (DME)/10% fötalem Kälberserum (FCS) aufgeteilt und über Nacht wachsen gelassen. 3 ml Tris/DME (0,039M Tris, pH 7,4 in DME), die 400 µg/ml DEAE-Dextran enthalten (Sigma, D-9885) wird für jede 100 mm-Platte an zu transfizierenden COS 7-Zelle hergestellt. 10 µg der Plasmid-DNA-Präparation werden pro Platte dazugegeben. Das Medium wird von den COS 7-Zellen entfernt und die DNA/DEAE-Dextranmischung wird zugegeben. Die Zellen werden für 4,5 Stunden inkubiert. Das Medium wird von den Zellen entfernt und durch 3 ml DME ersetzt, das 2% fötales Kälberserum (FCS) und 0,1 mM Chloroquin enthält. Die Zellen werden für 1 Stunde inkubiert. Nach Entfernen des Chloroquins und Ersetzen mit 1,5 ml 20% Glycerol in PBS, werden die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Minute stehen gelassen. 3 ml Tris/DME werden zugegeben und die Mischung wird abgesaugt und zweimal mit Tris/DME gewaschen. 10 DME/10% FCS werden zugegeben und die Mischung wird über Nacht inkubiert. Die transfizierten COS 7-Zellen werden 1:2 auf frische 100 mm-Platten (DME)/10% FCS aufgeteilt und wachsen gelassen.

## 9i. Panning-Prozedur für COS 7-Zellen, die einen Liganden exprimieren

## 1) Antikörper beschichtete Platten:

**[0111]** Bakteriologische 100 mm-Platten werden für 1,5 Stunden mit anti-humaner plazentaler alkalischer Phosphatase aus Kaninchen (Dako, Kalifornien) beschichtet, die 1:500 in 10 ml 50 mM Tris.HCl, pH 9,5 verdünnt ist. Die Platten werden dreimal mit 0,15 M NaCl gewaschen und mit 3 mg BSA/ml PBS über Nacht inkubiert. Die Blockerlösung wird abgesaugt und die Platten werden sofort verwendet oder zur späteren Verwendung eingefroren.

## 2) Panning-Zellen

**[0112]** Das Medium der transfizierten COS 7-Zellen wird abgesaugt und 3 ml PBS/0,5 mM ED-TA/0,02% Natriumazid werden zugegeben. Die Platten werden bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um die Zellen abzulösen. Die Zellen werden kräftig mit einer Pasteur-Pipette zerrieben und in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Platte wird mit weiteren 2 ml PBS/EDTA/Azid-Lösung gewaschen, die dann zum Zentrifugenröhrchen hinzugegeben wird. Nach Zentrifugieren bei 200 xg für 5 Minuten werden die Zellen in 3 ml Aptaq-flk-1 (F-1AP21-4) oder flk-2 (F-2AP26-0) Überstand von transfizierten NIH/3T3-Zellen (siehe Beispiel 7.) resuspendiert, und für 1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen werden wiederum bei 200 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in 3 ml PBS/EDTA/Azid-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wird vorsichtig auf 3 ml PBS/EDTA/Azid/2% Ficoll geschichtet und bei 200 xg für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in 0,5 ml PB/EDTA/Azid-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden zu den mit Antikörper beschichteten Platten, die 4 ml PBS/EDTA/Azid/5% FBS enthalten, zugegeben und bei Raumtemperatur 1 bis 3 Stunden stehen gelassen. Nicht-haftende Zellen werden durch zweimaliges oder dreimaliges sanftes Waschen mit 3 ml PBS/5% FBS entfernt.

## 3) Hirt'scher Überstand

**[0113]** 0,4 ml 0,6%iges SDS und 10 mM EDTA werden zu den gepannten Platten gegeben, die 20 Minuten stehen gelassen werden. Die viskose Mischung wird mit Hilfe einer Pipette in ein Mikrofugenröhrchen gegeben. 0,1 ml 5M NaCl wird zum Röhrchen zugegeben, gemischt und auf Eis für mindestens 5 Stunden abgekühlt. Das Röhrchen wird für 4 Minuten zentrifugiert, und der Überstand vorsichtig entfernt. Der Inhalt des Röhrchens wird mit Phenol einmal extrahiert, oder zweimal, wenn das erste Interface nicht sauber ist. 10 mg linearen Polyacrylamids (oder ein anderer Träger) wird zugegeben und das Röhrchen wird bis zur Spitze mit Ethanol aufgefüllt. Das erhaltene Präzipitat wird in 0,1 ml Wasser oder TE resuspendiert. Nach Zugabe von 3 Volumina an EtOH/NaOAc, werden die Zellen wieder präzipitiert und in 0,1 ml Wasser oder TE resuspendiert. Die dadurch enthaltene cDNA wird in jeglichen geeigneten E. coli Wirt mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Geeignete Wirtszellen werden in verschiedenen Katalogen beschrieben und schließen MC1061/p3 oder Electromax DH10B-Zellen von BRL-Gibco mit ein. Die cDNA wird durch konventionelle Verfahren extrahiert.

**[0114]** Die oben aufgeführte Panning-Prozedur wird so lange wiederholt bis ein reiner E. coli Klon erhalten wird, der die cDNA als ein einziges rekombinantes Plasmid beinhaltet, und fähig ist, Säugetierzellen zu transfizieren und einen positiven Panning-Assay zu erzielen. Normal sind drei Wiederholungen ausreichend.

## 9k. Expressionsklonierung von flk-1 oder flk-2 Liganden durch Etablierung einer autokrinen Schleife

**[0115]** Zellen die flk1/fms oder flk2/fms exprimieren (Beispiel 10) werden mit 20–30 µg einer cDNA-Bibliothek von entweder flk1 Liganden oder flk2 Liganden exprimierenden stromalen Zellen transfiziert. Die cDNA-Bibliothek wird wie oben beschrieben hergestellt (a-h). Die Zellen werden mit 1 µg pLTR neo cDNA kotransfiziert. Anschließend an auf die Transfektion werden die Zellen 1:2 übergeimpft und in 800 µg/ml an G418 in Dulbecco's Medium (DME) kultiviert, das mit 10% CS ergänzt ist. Ungefähr 12 Tage später werden die Zellkolonien übergeimpft und auf Platten ausplattiert, die mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml) und humanem Fibronectin (15 µg/ml) beschichtet sind. Das Kulturmedium wird als Serum-freies Medium definiert, welches eine Mischung (3:1) aus DME und Ham's F12 Medium ist. Die Zusätze zum Medium sind 8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM HEPES pH 7,4, 3 mM Histidin, 4 µM MnCl<sub>2</sub>, 10 µM Ethanolamin, 0,1 µM Selensäure, 2 µM Hydrocortison, 5 µg/ml Transferrin, 500 µg/ml bovines Serum Albumin/Linolensäurekomplex, und 20 µg/ml Insulin (Ref. Zhan, X, et al. Oncogene 1: 369–376 (1987)). Die Kulturen werden am nächsten Tag wieder gefüttert und jeden dritten Tag, bis ausschließlich die Zellen verbleiben, die fähig sind, unter den definierten Kulturbedingungen zu wachsen. Die verbleibenden Zellkolonien werden expandiert und auf die Gegenwart des Liganden durch einen Assay zur Bindung von APTag-flk1 oder APTag-flk2 an die Zellen getestet (wie in Beispiel 8 beschrieben). Die DNA würde aus den Zellen gewonnen werden, die die Anwesenheit von flk1 oder flk2 und der Sequenz zeigen.

## Beispiel 10.

## Expression der Liganden cDNA

**[0116]** Die cDNA wird sequenziert und in einer geeigneten Wirtszelle, wie z. B. einer Säugetierzelle, vorzugsweise COS-, CHO- oder NIH/3T3-Zellen exprimiert. Die Anwesenheit des Liganden wird dadurch bestätigt, dass die Bindung des Liganden an APTag-flk2 Fusionsprotein (siehe oben) gezeigt wird.

## Beispiel 11.

## Chemisches Crosslinking von Rezeptor und Ligand

**[0117]** Crosslinking-Experimente werden an intakten Zellen unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens durchgeführt, das bei Blume-Jensen et al., EMBO J., 10, 4121–4128 (1991) beschrieben wurde. Die Zellen werden in 100 mm Gewebekulturplatten bis zur Subkonfluenz kultiviert und einmal mit PBS-0,1% BSA gewaschen.

**[0118]** Um chemisches Crosslinking des löslichen Rezeptors an den membrangebundenen Liganden zu untersuchen, werden stromale Zellen der 2018 stromalen Zelllinie mit konditioniertem Medium (CM) von transfizierten 3T3-Zellen inkubiert, die den löslichen Rezeptor Flk2-APtag exprimieren. Crosslinking-Studien von löslichen Liganden an den membrangebundenen Rezeptor werden durch Inkubieren von konditioniertem Medium aus 2018 Zellen mit transfizierten 3T3-Zellen durchgeführt, die ein Flk2-fms-Fusionskonstrukt exprimieren.

**[0119]** Die Bindung wird für 2 Stunden entweder bei Raumtemperatur mit CM, das 0,02% Natriumazid enthält,

um einer Rezeptorinternalisierung vorzubeugen, oder bei 4°C mit CM (und Puffern) ergänzt mit Natriumvanadat, um eine Rezeptordepshosphorylierung vorzubeugen. Die Zellen werden zweimal mit PBS-0,1% BSA und viermal mit PBS gestoppt.

**[0120]** Crosslinking wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur in PBS durchgeführt, das 250 mM Disuccinimidyl-Suberat (DSS; Pierce) enthält. Die Reaktion wird mit Tris-HCL, pH 7,4 auf eine finale Konzentration von 50 mM gequenscht.

**[0121]** Die Zellen werden in Puffern, die die Löslichkeit erhöhen gelöst: 0,5% Triton-X100™, 0,5% Deoxycholsäure, 20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMFS, 50 mg/ml Aprotinin, 2 mg/ml Bestatin, 2 mg/ml Pepstatin und 10 mg/ml Leupeptin. Die lysierten Zellen werden umgehend in 1,5 ml Nalgen-Röhrchen überführt und durch Rollen von Anfang bis Ende für 45 Minuten bei 4°C gelöst. Die Lysate werden dann in einer Mikrofuge bei 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die gelösten gecrosslinkten Rezeptorkomplexe werden dann aus den Lysaten durch Inkubieren der Überstände mit 10%iger (v/v) Lectin-Sepharose™ 6MB Beads aus Weizenkeimen (Pharmacia) bei 4°C für 2 Stunden oder über Nacht gewonnen.

**[0122]** Die Beads werden einmal mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und in 2X SDS-Polyacrylamid nicht-reduzierendem Probenpuffer resuspendiert. Die gebundenen Komplexe werden von den Beads durch 5-minütiges Erhitzen bei 95°C eluiert. Die Proben werden auf 4–12%igen Gradientengelen (NOVEX) unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen (0,35 M 2-Mercaptoethanol) analysiert und anschließend auf PVDF-Membrane für 2 Stunden durch die Verwendung einer Novex-Blotting-Apparatur überführt. Die Blotts werden in TBS-3% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, gefolgt von einer Inkubation mit einem geeigneten Antikörper.

**[0123]** Gecrosslinkte Fik2-APtag- und Fik2-fms-Rezeptoren werden durch die Verwendung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen detektiert, die gegen humane alkalische Phosphatase bzw. fms-Protein eingesetzt werden. Der Kern des Verfahrens wird gemäß den im ABC-Kit (Pierce) angegebenen Instruktionen ausgeführt. Der Kit basiert auf der Verwendung eines biotinylierten sekundären Antikörpers und eines Avidin-biotinylierten Meerrettich-Peroxidasekomplexes zur Detektion.

#### ZUSÄTZLICHE AUSFÜHRUNGSMÖGLICHKEITEN

**[0124]** Die Erfindung befindet sich, so wie beansprucht, in Übereinstimmung mit der oben aufgeführten Beschreibung und den leicht verfügbaren Referenzen und Startmaterialien. Nichts desto weniger haben die Anmelder die unten aufgeführten Zelllinien bei der American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC) hinterlegt:

2018, ATCC Hinterlegungsnummer CRL 10907, am 30. Oktober 1991 hinterlegt.

Fsp 62891, ATCC Hinterlegungsnummer CRL 10935, am 21. November 1991 hinterlegt.

F.thy 62891, ATCC Hinterlegungsnummer CRL 10936, am 21. November 1991 hinterlegt.

FL 62891, ATCC Hinterlegungsnummer CRL 11005, am 2. April 1992 hinterlegt.

**[0125]** Diese Hinterlegungen wurden unter den Bestimmungen des Budapester Vertrages zur internationalen Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zweck von Patentverfahren und den darunter fallenden Regelungen gemacht (Budapester Vertrag). Diese sichern die Erhaltung einer lebenden Kultur für 30 Jahre zu, ausgehend vom Datum der Hinterlegung. Die Organismen werden von ATCC gemäß den Fristen des Budapester Vertrages verfügbar gemacht und unterliegen einer Übereinkunft zwischen den Anmeldern und der ATCC, welche die uneingeschränkte Verfügbarkeit nach Veröffentlichung des zugehörigen US-Patents gewährleistet. Die Verfügbarkeit der hinterlegten Stämme ist nicht als eine Lizenz gedacht, um die Erfindung in Zuwiderhandlung der unter der Autorität einer jeden Regierung im Zusammenhang mit diesen Patentrechten erteilten Rechten zu praktizieren.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Totipotente hematopoietische Stammzellrezeptoren und deren Liganden
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) ADRESSAT: IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED
  - (B) STRASSE: 180 VARICK STREET
  - (C) STADT: NEW YORK
  - (D) STAAT: NEW YORK
  - (E) LAND: US
  - (F) POSTLEITZAHL: 10014
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
  - (A) MEDIUM: DISKETTE
  - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
  - (C) SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:
  - (A) ANMELDENUMMER:
  - (B) ANMELDEDATUM: 02.APRIL 1992
  - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANWALT/AGENT INFORMATION:
  - (A) NAME: FEIT, IRVING N.
  - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 28,601
  - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: LEM-3-PPPPT
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:
  - (A) TELEFON: 212-645-1405
  - (B) TELEFAX: 212-645-2054

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:

- (i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:
  - (A) LÄNGE: 3453 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 31..3009

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide





## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

AGC TCC CAC AGG GAA AGC TGT AAA GAA GAA GGC CCT GCT GTT GTC AGA  
 Ser Ser His Arg Glu Ser Cys Lys Glu Glu Gly Pro Ala Val Val Arg  
 205 210 215

AAG GAG GAA AAG GTA CTT CAT GAG TTG TTC GGA ACA GAC ATC AGA TGC  
 Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu Phe Gly Thr Asp Ile Arg Cys  
 220 225 230

TGT GCT AGA AAT GCA CTG GGC CGC GAA TGC ACC AAG CTG TTC ACC ATA  
 Cys Ala Arg Asn Ala Leu Gly Arg Glu Cys Thr Lys Leu Phe Thr Ile  
 235 240 245

GAT CTA AAC CAG GCT CCT CAG AGC ACA CTG CCC CAG TTA TTC CTG AAA  
 Asp Leu Asn Gln Ala Pro Gln Ser Thr Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys  
 250 255 260

GTG GGG GAA CCC TTG TGG ATC AGG TGT AAG GCC ATC CAT GTG AAC CAT  
 Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg Cys Lys Ala Ile His Val Asn His  
 265 270 275 280

GGA TTC GGG CTC ACC TGG GAG CTG GAA GAC AAA GCC CTG GAG GAG GGC  
 Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu Glu Asp Lys Ala Leu Glu Glu Gly  
 285 290 295

AGC TAC TTT GAG ATG AGT ACC TAC TCC ACA AAC AGG ACC ATG ATT CGG  
 Ser Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg  
 300 305 310

ATT CTC TTG GCC TTT GTG TCT TCC GTG GGA AGG AAC GAC ACC GGA TAT  
 Ile Leu Leu Ala Phe Val Ser Ser Val Gly Arg Asn Asp Thr Gly Tyr  
 315 320 325

TAC ACC TGC TCT TCC TCA AAG CAC CCC AGC CAG TCA GCG TTG GTG ACC  
 Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His Pro Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr  
 330 335 340

ATC CTA GAA AAA GGG TTT ATA AAC GCT ACC AGC TCG CAA GAA GAG TAT  
 Ile Leu Glu Lys Gly Phe Ile Asn Ala Thr Ser Ser Gln Glu Glu Tyr  
 345 350 355 360

GAA ATT GAC CCG TAC GAA AAG TTC TGC TTC TCA GTC AGG TTT AAA GCG  
 Glu Ile Asp Pro Tyr Glu Lys Phe Cys Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala  
 365 370 375

TAC CCA CGA ATC CGA TGC ACG TGG ATC TTC TCT CAA GCC TCA TTT CCT  
 Tyr Pro Arg Ile Arg Cys Thr Trp Ile Phe Ser Gln Ala Ser Phe Pro  
 380 385 390

TGT GAA CAG AGA GGC CTG GAG GAT GGG TAC AGC ATA TCT AAA TTT TGC  
 Cys Glu Gln Arg Gly Leu Glu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys  
 395 400 405

GAT CAT AAG AAC AAG CCA GGA GAG TAC ATA TTC TAT GCA GAA AAT GAT  
 Asp His Lys Asn Lys Pro Gly Glu Tyr Ile Phe Tyr Ala Glu Asn Asp  
 410 415 420

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

GAC GCC CAG TTC ACC AAA ATG TTC ACG CTG AAT ATA AGA AAG AAA CCT  
 Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr Leu Asn Ile Arg Lys Lys Pro  
 425 430 435 440

CAA GTG CTA GCA AAT GCC TCA GCC AGC CAG GCG TCC TGT TCC TCT GAT  
 Gln Val Leu Ala Asn Ala Ser Ala Ser Gln Ala Ser Cys Ser Ser Asp  
 445 450 455

GGC TAC CCG CTA CCC TCT TGG ACC TGG AAG AAG TGT TCG GAC AAA TCT  
 Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser  
 460 465 470

CCC AAT TGC ACG GAG GAA ATC CCA GAA GGA GTT TGG AAT AAA AAG GCT  
 Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Pro Glu Gly Val Trp Asn Lys Lys Ala  
 475 480 485

AAC AGA AAA GTG TTT GGC CAG TGG GTG TCG AGC AGT ACT CTA AAT ATG  
 Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met  
 490 495 500

AGT GAG GCC GGG AAA GGG CTT CTG GTC AAA TGC TGT GCG TAC AAT TCT  
 Ser Glu Ala Gly Lys Gly Leu Leu Val Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser  
 505 510 515 520

ATG GGC ACG TCT TGC GAA ACC ATC TTT TTA AAC TCA CCA GGC CCC TTC  
 Met Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Phe Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe  
 525 530 535

CCT TTC ATC CAA GAC AAC ATC TCC TTC TAT GCG ACC ATT GGG CTC TGT  
 Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe Tyr Ala Thr Ile Gly Leu Cys  
 540 545 550

CTC CCC TTC ATT GTT GTT CTC ATT GTG TTG ATC TGC CAC AAA TAC AAA  
 Leu Pro Phe Ile Val Val Leu Ile Val Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys  
 555 560 565

AAG CAA TTT AGG TAC GAG AGT CAG CTG CAG ATG ATC CAG GTG ACT GGC  
 Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Ile Gln Val Thr Gly  
 570 575 580

CCC CTG GAT AAC GAG TAC TTC TAC GTT GAC TTC AGG GAC TAT GAA TAT  
 Pro Leu Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Asp Tyr Glu Tyr  
 585 590 595 600

GAC CTT AAG TGG GAG TTC CCG AGA GAG AAC TTA GAG TTT GGG AAG GTC  
 Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val  
 605 610 615

CTG GGG TCT GGC GCT TTC GGG AGG GTG ATG AAC GCC ACG GCC TAT GGC  
 Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Arg Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly  
 620 625 630

ATT AGT AAA ACG GGA GTC TCA ATT CAG GTG GCG GTG AAG ATG CTA AAA  
 Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys  
 635 640 645

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

GAG AAA GCT GAC AGC TGT GAA AAA GAA GCT CTC ATG TCG GAG CTC AAA  
 Glu Lys Ala Asp Ser Cys Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys  
 650 655 660

ATG ATG ACC CAC CTG GGA CAC CAT GAC AAC ATC GTG AAT CTG CTG GGG  
 Met Met Thr His Leu Gly His His Asp Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly  
 665 670 675 680

GCA TGC ACA CTG TCA GGG CCA GTG TAC TTG ATT TTT GAA TAT TGT TGC  
 Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Val Tyr Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys  
 685 690 695

TAT GGT GAC CTC CTC AAC TAC CTA AGA AGT AAA AGA GAG AAG TTT CAC  
 Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Ser Lys Arg Glu Lys Phe His  
 700 705 710

AGG ACA TGG ACA GAG ATT TTT AAG GAA CAT AAT TTC AGT TCT TAC CCT  
 Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu His Asn Phe Ser Ser Tyr Pro  
 715 720 725

ACT TTC CAG GCA CAT TCA AAT TCC AGC ATG CCT GGT TCA CGA GAA GTT  
 Thr Phe Gln Ala His Ser Asn Ser Ser Met Pro Gly Ser Arg Glu Val  
 730 735 740

CAG TTA CAC CCG CCC TTG GAT CAG CTC TCA GGG TTC AAT GGG AAT TCA  
 Gln Leu His Pro Pro Leu Asp Gln Leu Ser Gly Phe Asn Gly Asn Ser  
 745 750 755 760

ATT CAT TCT GAA GAT GAG ATT GAA TAT GAA AAC CAG AAG AGG CTG GCA  
 Ile His Ser Glu Asp Glu Ile Glu Tyr Glu Asn Gln Lys Arg Leu Ala  
 765 770 775

GAA GAA GAG GAG GAA GAT TTG AAC GTG CTG ACG TTT GAA GAC CTC CTT  
 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn Val Leu Thr Phe Glu Asp Leu Leu  
 780 785 790

TGC TTT GCG TAC CAA GTG GCC AAA GGC ATG GAA TTC CTG GAG TTC AAG  
 Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Glu Phe Lys  
 795 800 805

TCG TGT GTC CAC AGA GAC CTG GCA GCC AGG AAT GTG TTG GTC ACC CAC  
 Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr His  
 810 815 820

GGG AAG GTG GTG AAG ATC TGT GAC TTT GGA CTG GCC CGA GAC ATC CTG  
 Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Leu  
 825 830 835 840

AGC GAC TCC AGC TAC GTC GTC AGG GGC AAC GCA CGG CTG CCG GTG AAG  
 Ser Asp Ser Ser Tyr Val Val Arg Gly Asn Ala Arg Leu Pro Val Lys  
 845 850 855

TGG ATG GCA CCC GAG AGC TTA TTT GAA GGG ATC TAC ACA ATC AAG AGT  
 Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Phe Glu Gly Ile Tyr Thr Ile Lys Ser  
 860 865 870

DE 692 33 676 T2 2007.11.15

GAC GTC TGG TCC TAC GGC ATC CTT CTC TGG GAG ATA TTT TCA CTG GGT  
 Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly  
 875 880 885

GTG AAC CCT TAC CCT GGC ATT CCT GTC GAC GCT AAC TTC TAT AAA CTG  
 Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Asp Ala Asn Phe Tyr Lys Leu  
 890 895 900

ATT CAG AGT GGA TTT AAA ATG GAG CAG CCA TTC TAT GCC ACA GAA GGG  
 Ile Gln Ser Gly Phe Lys Met Glu Gln Pro Phe Tyr Ala Thr Glu Gly  
 905 910 915 920

ATA TAC TTT GTA ATG CAA TCC TGC TGG GCT TTT GAC TCA AGG AAG CGG  
 Ile Tyr Phe Val Met Gln Ser Cys Trp Ala Phe Asp Ser Arg Lys Arg  
 925 930 935

CCA TCC TTC CCC AAC CTG ACT TCA TTT TTA GGA TGT CAG CTG GCA GAG  
 Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser Phe Leu Gly Cys Gln Leu Ala Glu  
 940 945 950

GCA GAA GAA GCA TGT ATC AGA ACA TCC ATC CAT CTA CCA AAA CAG GCG  
 Ala Glu Glu Ala Cys Ile Arg Thr Ser Ile His Leu Pro Lys Gln Ala  
 955 960 965

GCC CCT CAG CAG AGA GGC GGG CTC AGA GCC CAG TCG CCA CAG CGC CAG  
 Ala Pro Gln Gln Arg Gly Gly Leu Arg Ala Gln Ser Pro Gln Arg Gln  
 970 975 980

GTG AAG ATT CAC AGA GAA AGA AGT TAGCGAGGAG GCCTTGGACC CCGCCACCCT  
 Val Lys Ile His Arg Glu Arg Ser  
 985 990

AGCAGGCTGT AGACCGCAGA GCCAAGATTA GCCTCGCCTC TGAGGAAGCG CCCTACAGCG  
 CGTTGCTTCG CTGGACTTTT CTCTAGATGC TGTCTGCCAT TACTCCAAAG TGA CTTCTAT  
 AAAATCAAAC CTCTCCTCGC ACAGGCGGGA GAGCCAATAA TGAGACTTGT TGGTGAGCCC  
 GCCTACCCTG GGGGCCTTTC CACGAGCTTG AGGGGAAAGC CATGTATCTG AAATATAGTA  
 TATTCTTGTA AATACGTGAA ACAAACCAA CCCGTTTTTTT GCTAAGGGAA AGCTAAATAT  
 GATTTTTAAA AATCTATGTT TTAAAATACT ATGTA ACTTT TTCATCTATT TAGTGATATA  
 TTTTATGGAT GGAAATAAAC TTTCTACTGT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 992 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:2:

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

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Glu Cys Thr Lys Leu Phe Thr Ile Asp Leu Asn Gln Ala Pro Gln Ser  
 245 250 255  
 Thr Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg  
 260 265 270  
 Cys Lys Ala Ile His Val Asn His Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu  
 275 280 285  
 Glu Asp Lys Ala Leu Glu Glu Gly Ser Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Ser Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg Ile Leu Leu Ala Phe Val Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Val Gly Arg Asn Asp Thr Gly Tyr Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His  
 325 330 335  
 Pro Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr Ile Leu Glu Lys Gly Phe Ile Asn  
 340 345 350  
 Ala Thr Ser Ser Gln Glu Glu Tyr Glu Ile Asp Pro Tyr Glu Lys Phe  
 355 360 365  
 Cys Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala Tyr Pro Arg Ile Arg Cys Thr Trp  
 370 375 380  
 Ile Phe Ser Gln Ala Ser Phe Pro Cys Glu Gln Arg Gly Leu Glu Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asp His Lys Asn Lys Pro Gly Glu  
 405 410 415  
 Tyr Ile Phe Tyr Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe  
 420 425 430  
 Thr Leu Asn Ile Arg Lys Lys Pro Gln Val Leu Ala Asn Ala Ser Ala  
 435 440 445  
 Ser Gln Ala Ser Cys Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr  
 450 455 460  
 Trp Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Pro  
 465 470 475 480  
 Glu Gly Val Trp Asn Lys Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp  
 485 490 495  
 Val Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Gly Lys Gly Leu Leu  
 500 505 510  
 Val Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Met Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile  
 515 520 525  
 Phe Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser  
 530 535 540

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Phe Tyr Ala Thr Ile Gly Leu Cys Leu Pro Phe Ile Val Val Leu Ile  
 545 550 555 560

Val Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln  
 565 570 575

Leu Gln Met Ile Gln Val Thr Gly Pro Leu Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr  
 580 585 590

Val Asp Phe Arg Asp Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg  
 595 600 605

Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Arg  
 610 615 620

Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile  
 625 630 635 640

Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Cys Glu Lys  
 645 650 655

Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr His Leu Gly His His  
 660 665 670

Asp Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Val  
 675 680 685

Tyr Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu  
 690 695 700

Arg Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys  
 705 710 715 720

Glu His Asn Phe Ser Ser Tyr Pro Thr Phe Gln Ala His Ser Asn Ser  
 725 730 735

Ser Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Leu His Pro Pro Leu Asp Gln  
 740 745 750

Leu Ser Gly Phe Asn Gly Asn Ser Ile His Ser Glu Asp Glu Ile Glu  
 755 760 765

Tyr Glu Asn Gln Lys Arg Leu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn  
 770 775 780

Val Leu Thr Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys  
 785 790 795 800

Gly Met Glu Phe Leu Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala  
 805 810 815

Ala Arg Asn Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp  
 820 825 830

Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Leu Ser Asp Ser Ser Tyr Val Val Arg  
 835 840 845



DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Gly	Asn	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Leu	Phe
850						855					860				
Glu	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Leu
865					870					875					880

DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro  
 885 890 895

Val Asp Ala Asn Phe Tyr Lys Leu Ile Gln Ser Gly Phe Lys Met Glu  
 900 905 910

Gln Pro Phe Tyr Ala Thr Glu Gly Ile Tyr Phe Val Met Gln Ser Cys  
 915 920 925

Trp Ala Phe Asp Ser Arg Lys Arg Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser  
 930 935 940

Phe Leu Gly Cys Gln Leu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Cys Ile Arg Thr  
 945 950 955 960

Ser Ile His Leu Pro Lys Gln Ala Ala Pro Gln Gln Arg Gly Gly Leu  
 965 970 975

Arg Ala Gln Ser Pro Gln Arg Gln Val Lys Ile His Arg Glu Arg Ser  
 980 985 990

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:

- (A) LÄNGE: 332 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..332

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:3:

AAC AAT GAT TCA TCA GTG GGG AAG TCA TCA TCA TAT CCC ATG GTA TCA  
 Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser  
 1 5 10 15

GAA TCC CCG GAA GAC CTC GGG TGT GCG TTG AGA CCC CAG AGC TCA GGG  
 Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly Cys Ala Leu Arg Pro Gln Ser Ser Gly  
 20 25 30

ACA GTG TAC GAA GCT GCC GCT GTG GAA GTG GAT GTA TCT GCT TCC ATC  
 Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile  
 35 40 45

ACA CTG CAA GTG CTG GTC GAT GCC CCA GGG AAC ATT TCC TGT CTC TGG  
 Thr Leu Gln Val Leu Val Asp Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp  
 50 55 60

DE 692 33 676 T2 2007.11.15

```

GTC TTT AAG CAC AGC TCC CTG AAT TGC CAG CCA CAT TTT GAT TTA CAA
Val Phe Lys His Ser Ser Leu Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln
 65                70                75                80

AAC AGA GGA GTT GTT TCC ATG GTC ATT TTG AAA ATG ACA GAA ACC CAA
Asn Arg Gly Val Val Ser Met Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln
                85                90                95

GCT GGA GAA TAC CTA CTT TTT ATT CAG AGT GAA GCT ACC AAT TA
Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn
                100                105                110

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:4:

- (i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:
  - (A) LÄNGE: 110 AMINOSÄUREN
  - (B) TYP: AMINOSÄURE
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:4:

```

Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser
 1                5                10                15

Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly Cys Ala Leu Arg Pro Gln Ser Ser Gly
                20                25                30

Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile
                35                40                45

Thr Leu Gln Val Leu Val Asp Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp
 50                55                60

Val Phe Lys His Ser Ser Leu Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln
 65                70                75                80

Asn Arg Gly Val Val Ser Met Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln
                85                90                95

Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn
                100                105                110

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:5:

- (i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:
  - (A) LÄNGE: 284 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..282

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:5:

GAT CAA ATC TCA GGC TTC ATG GAA TTC ATT CAC TCT GAA GAT GAA ATT  
 Asp Gln Ile Ser Gly Phe Met Glu Phe Ile His Ser Glu Asp Glu Ile  
 1 5 10 15

GAA TAT GAA AAC CAA AAA AAG AGG CTG GAA GAA GAG GAG GAC TTG AAT  
 Glu Tyr Glu Asn Gln Lys Lys Arg Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn  
 20 25 30

GTG CTT ACA TTT GAA GAT CTT CTT TGC TTT GCA TAT CAA GTT GCC AAA  
 Val Leu Thr Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys  
 35 40 45

GGA ATG GAA TTT AAG TCG TGT GTT CAC AGA GAC CTG GCC GCC AGG AAC  
 Gly Met Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn  
 50 55 60

GTG CTT GTC ACC CAC GGG AAA GTG GTG AAG ATA TGT GAC TTT GGA TTG  
 Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu  
 65 70 75 80

GCT CGA GAT ATC ATG AGT GAT TCC GGC TAT GTT GTC AGG CAA  
 Ala Arg Asp Ile Met Ser Asp Ser Gly Tyr Val Val Arg Gln  
 85 90

TC 284

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:6:

(i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 94 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:6:

Asp Gln Ile Ser Gly Phe Met Glu Phe Ile His Ser Glu Asp Glu Ile  
 1 5 10 15

Glu Tyr Glu Asn Gln Lys Lys Arg Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn  
 20 25 30

Val Leu Thr Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys  
 35 40 45

Gly Met Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn  
 50 55 60

Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu  
 65 70 75 80

Ala Arg Asp Ile Met Ser Asp Ser Gly Tyr Val Val Arg Gln  
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:7:

(i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:

- (A) LÄNGE: 5406 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRANGART: EINZELSTRANG
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 208..4311

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE: 208..4308

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:7:

```

CTGTGTCCCG CAGCCGGATA ACCTGGCTGA CCCGATTCCG CGGACACCCG TGCAGCCGCG
GCTGGAGCCA GGGCGCCGGT GCCCGCGCTC TCCCCGGTCT TGCCTGCGG GGGCCGATAC
CGCCTCTGTG ACTTCTTTGC GGGCCAGGGA CGGAGAAGGA GTCTGTGCCT GAGAACTGG
GCTCTGTGCC CAGGCGCGAG GTGCAGG ATG GAG AGC AAG GGC CTG CTA GCT
                               Met Glu Ser Lys Gly Leu Leu Ala
                               1                               5

GTC GCT CTG TGG TTC TGC GTG GAG ACC CGA GCC GCC TCT GTG GGT TTG
Val Ala Leu Trp Phe Cys Val Glu Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu
    10                               15                               20

CCT GGC GAT TTT CTC CAT CCC CCC AAG CTC AGC ACA CAG AAA GAC ATA
Pro Gly Asp Phe Leu His Pro Pro Lys Leu Ser Thr Gln Lys Asp Ile
    25                               30                               35                               40

CTG ACA ATT TTG GCA AAT ACA ACC CTT CAG ATT ACT TGC AGG GGA CAG
Leu Thr Ile Leu Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln
                               45                               50                               55

CGG GAC CTG GAC TGG CTT TGG CCC AAT GCT CAG CGT GAT TCT GAG GAA
Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Ala Gln Arg Asp Ser Glu Glu
                               60                               65                               70

AGG GTA TTG GTG ACT GAA TGC GGC GGT GGT GAC AGT ATC TTC TGC AAA
Arg Val Leu Val Thr Glu Cys Gly Gly Gly Asp Ser Ile Phe Cys Lys
    75                               80                               85
    
```

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

ACA CTC ACC ATT CCC AGG GTG GTT GGA AAT GAT ACT GGA GCC TAC AAG  
 Thr Leu Thr Ile Pro Arg Val Val Gly Asn Asp Thr Gly Ala Tyr Lys  
 90 95 100

TGC TCG TAC CGG GAC GTC GAC ATA GCC TCC ACT GTT TAT GTC TAT GTT  
 Cys Ser Tyr Arg Asp Val Asp Ile Ala Ser Thr Val Tyr Val Tyr Val  
 105 110 115 120

CGA GAT TAC AGA TCA CCA TTC ATC GCC TCT GTC AGT GAC CAG CAT GGC  
 Arg Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp Gln His Gly  
 125 130 135

ATC GTG TAC ATC ACC GAG AAC AAG AAC AAA ACT GTG GTG ATC CCC TGC  
 Ile Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val Ile Pro Cys  
 140 145 150

CGA GGG TCG ATT TCA AAC CTC AAT GTG TCT CTT TGC GCT AGG TAT CCA  
 Arg Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala Arg Tyr Pro  
 155 160 165

GAA AAG AGA TTT GTT CCG GAT GGA AAC AGA ATT TCC TGG GAC AGC GAG  
 Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp Asp Ser Glu  
 170 175 180

ATA GGC TTT ACT CTC CCC AGT TAC ATG ATC AGC TAT GCC GGC ATG GTC  
 Ile Gly Phe Thr Leu Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val  
 185 190 195 200

TTC TGT GAG GCA AAG ATC AAT GAT GAA ACC TAT CAG TCT ATC ATG TAC  
 Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Thr Tyr Gln Ser Ile Met Tyr  
 205 210 215

ATA GTT GTG GTT GTA GGA TAT AGG ATT TAT GAT GTG ATT CTG AGC CCC  
 Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Ile Leu Ser Pro  
 220 225 230

CCG CAT GAA ATT GAG CTA TCT GCC GGA GAA AAA CTT GTC TTA AAT TGT  
 Pro His Glu Ile Glu Leu Ser Ala Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys  
 235 240 245

ACA GCG AGA ACA GAG CTC AAT GTG GGG CTT GAT TTC ACC TGG CAC TCT  
 Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Leu Asp Phe Thr Trp His Ser  
 250 255 260

CCA CCT TCA AAG TCT CAT CAT AAG AAG ATT GTA AAC CGG GAT GTG AAA  
 Pro Pro Ser Lys Ser His His Lys Lys Ile Val Asn Arg Asp Val Lys  
 265 270 275 280

CCC TTT CCT GGG ACT GTG GCG AAG ATG TTT TTG AGC ACC TTG ACA ATA  
 Pro Phe Pro Gly Thr Val Ala Lys Met Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile  
 285 290 295

GAA AGT GTG ACC AAG AGT GAC CAA GGG GAA TAC ACC TGT GTA GCG TCC  
 Glu Ser Val Thr Lys Ser Asp Gln Gly Glu Tyr Thr Cys Val Ala Ser  
 300 305 310

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

AGT GGA CGG ATG ATC AAG AGA AAT AGA ACA TTT GTC CGA GTT CAC ACA  
 Ser Gly Arg Met Ile Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Arg Val His Thr  
 315 320 325

AAG CCT TTT ATT GCT TTC GGT AGT GGG ATG AAA TCT TTG GTG GAA GCC  
 Lys Pro Phe Ile Ala Phe Gly Ser Gly Met Lys Ser Leu Val Glu Ala  
 330 335 340

ACA GTG GGC AGT CAA GTC CGA ATC CCT GTG AAG TAT CTC AGT TAC CCA  
 Thr Val Gly Ser Gln Val Arg Ile Pro Val Lys Tyr Leu Ser Tyr Pro  
 345 350 355 360

GCT CCT GAT ATC AAA TGG TAC AGA AAT GGA AGG CCC ATT GAG TCC AAC  
 Ala Pro Asp Ile Lys Trp Tyr Arg Asn Gly Arg Pro Ile Glu Ser Asn  
 365 370 375

TAC ACA ATG ATT GTT GGC GAT GAA CTC ACC ATC ATG GAA GTG ACT GAA  
 Tyr Thr Met Ile Val Gly Asp Glu Leu Thr Ile Met Glu Val Thr Glu  
 380 385 390

AGA GAT GCA GGA AAC TAC ACG GTC ATC CTC ACC AAC CCC ATT TCA ATG  
 Arg Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Met  
 395 400 405

GAG AAA CAG AGC CAC ATG GTC TCT CTG GTT GTG AAT GTC CCA CCC CAG  
 Glu Lys Gln Ser His Met Val Ser Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln  
 410 415 420

ATC GGT GAG AAA GCC TTG ATC TCG CCT ATG GAT TCC TAC CAG TAT GGG  
 Ile Gly Glu Lys Ala Leu Ile Ser Pro Met Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly  
 425 430 435 440

ACC ATG CAG ACA TTG ACA TGC ACA GTC TAC GCC AAC CCT CCC CTG CAC  
 Thr Met Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Asn Pro Pro Leu His  
 445 450 455

CAC ATC CAG TGG TAC TGG CAG CTA GAA GAA GCC TGC TCC TAC AGA CCC  
 His Ile Gln Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Ala Cys Ser Tyr Arg Pro  
 460 465 470

GGC CAA ACA AGC CCG TAT GCT TGT AAA GAA TGG AGA CAC GTG GAG GAT  
 Gly Gln Thr Ser Pro Tyr Ala Cys Lys Glu Trp Arg His Val Glu Asp  
 475 480 485

TTC CAG GGG GGA AAC AAG ATC GAA GTC ACC AAA AAC CAA TAT GCC CTG  
 Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val Thr Lys Asn Gln Tyr Ala Leu  
 490 495 500

ATT GAA GGA AAA AAC AAA ACT GTA AGT ACG CTG GTC ATC CAA GCT GCC  
 Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala  
 505 510 515 520

AAC GTG TCA GCG TTG TAC AAA TGT GAA GCC ATC AAC AAA GCG GGA CGA  
 Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu Ala Ile Asn Lys Ala Gly Arg  
 525 530 535



## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

GGA GAG AGG GTC ATC TCC TTC CAT GTG ATC AGG GGT CCT GAA ATT ACT  
 Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val Ile Arg Gly Pro Glu Ile Thr  
 540 545 550

GTG CAA CCT GCT GCC CAG CCA ACT GAG CAG GAG AGT GTG TCC CTG TTG  
 Val Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Leu  
 555 560 565

TGC ACT GCA GAC AGA AAT ACG TTT GAG AAC CTC ACG TGG TAC AAG CTT  
 Cys Thr Ala Asp Arg Asn Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu  
 570 575 580

GGC TCA CAG GCA ACA TCG GTC CAC ATG GGC GAA TCA CTC ACA CCA GTT  
 Gly Ser Gln Ala Thr Ser Val His Met Gly Glu Ser Leu Thr Pro Val  
 585 590 595 600

TGC AAG AAC TTG GAT GCT CTT TGG AAA CTG AAT GGC ACC ATG TTT TCT  
 Cys Lys Asn Leu Asp Ala Leu Trp Lys Leu Asn Gly Thr Met Phe Ser  
 605 610 615

AAC AGC ACA AAT GAC ATC TTG ATT GTG GCA TTT CAG AAT GCC TCT CTG  
 Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Val Ala Phe Gln Asn Ala Ser Leu  
 620 625 630

CAG GAC CAA GGC GAC TAT GTT TGC TCT GCT CAA GAT AAG AAG ACC AAG  
 Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Ser Ala Gln Asp Lys Lys Thr Lys  
 635 640 645

AAA AGA CAT TGC CTG GTC AAA CAG CTC ATC ATC CTA GAG CGC ATG GCA  
 Lys Arg His Cys Leu Val Lys Gln Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Ala  
 650 655 660

CCC ATG ATC ACC GGA AAT CTG GAG AAT CAG ACA ACA ACC ATT GGC GAG  
 Pro Met Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn Gln Thr Thr Thr Ile Gly Glu  
 665 670 675 680

ACC ATT GAA GTG ACT TGC CCA GCA TCT GGA AAT CCT ACC CCA CAC ATT  
 Thr Ile Glu Val Thr Cys Pro Ala Ser Gly Asn Pro Thr Pro His Ile  
 685 690 695

ACA TGG TTC AAA GAC AAC GAG ACC CTG GTA GAA GAT TCA GGC ATT GTA  
 Thr Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val  
 700 705 710

CTG AGA GAT GGG AAC CGG AAC CTG ACT ATC CGC AGG GTG AGG AAG GAG  
 Leu Arg Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu  
 715 720 725

GAT GGA GGC CTC TAC ACC TGC CAG GCC TGC AAT GTC CTT GGC TGT GCA  
 Asp Gly Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Asn Val Leu Gly Cys Ala  
 730 735 740

AGA GCG GAG ACG CTC TTC ATA ATA GAA GGT GCC CAG GAA AAG ACC AAC  
 Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn  
 745 750 755 760

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

TTG GAA GTC ATT ATC CTC GTC GGC ACT GCA GTG ATT GCC ATG TTC TTC  
 Leu Glu Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe  
 765 770 775

TGG CTC CTT CTT GTC ATT CTC GTA CGG ACC GTT AAG CGG GCC AAT GAA  
 Trp Leu Leu Leu Val Ile Leu Val Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Glu  
 780 785 790

GGG GAA CTG AAG ACA GGC TAC TTG TCT ATT GTC ATG GAT CCA GAT GAA  
 Gly Glu Leu Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu  
 795 800 805

TTG CCC TTG GAT GAG CGC TGT GAA CGC TTG CCT TAT GAT GCC AGC AAG  
 Leu Pro Leu Asp Glu Arg Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys  
 810 815 820

TGG GAA TTC CCC AGG GAC CGG CTG AAA CTA GGA AAA CCT CTT GGC CGC  
 Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg  
 825 830 835 840

GGT GCC TTC GGC CAA GTG ATT GAG GCA GAC GCT TTT GGA ATT GAC AAG  
 Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys  
 845 850 855

ACA GCG ACT TGC AAA ACA GTA GCC GTC AAG ATG TTG AAA GAA GGA GCA  
 Thr Ala Thr Cys Lys Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala  
 860 865 870

ACA CAC AGC GAG CAT CGA GCC CTC ATG TCT GAA CTC AAG ATC CTC ATC  
 Thr His Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile  
 875 880 885

CAC ATT GGT CAC CAT CTC AAT GTG GTG AAC CTC CTA GGC GCC TGC ACC  
 His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr  
 890 895 900

AAG CCG GGA GGG CCT CTC ATG GTG ATT GTG GAA TTC TCG AAG TTT GGA  
 Lys Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Phe Ser Lys Phe Gly  
 905 910 915 920

AAC CTA TCA ACT TAC TTA CGG GGC AAG AGA AAT GAA TTT GTT CCC TAT  
 Asn Leu Ser Thr Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr  
 925 930 935

AAG AGC AAA GGG GCA CGC TTC CGC CAG GGC AAG GAC TAC GTT GGG GAG  
 Lys Ser Lys Gly Ala Arg Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Glu  
 940 945 950

CTC TCC GTG GAT CTG AAA AGA CGC TTG GAC AGC ATC ACC AGC AGC CAG  
 Leu Ser Val Asp Leu Lys Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln  
 955 960 965

AGC TCT GCC AGC TCA GGC TTT GTT GAG GAG AAA TCG CTC AGT GAT GTA  
 Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val  
 970 975 980

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

GAG GAA GAA GAA GCT TCT GAA GAA CTG TAC AAG GAC TTC CTG ACC TTG  
 Glu Glu Glu Glu Ala Ser Glu Glu Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu  
 985 990 995 1000

GAG CAT CTC ATC TGT TAC AGC TTC CAA GTG GCT AAG GGC ATG GAG TTC  
 Glu His Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe  
 1005 1010 1015

TTG GCA TCA AGG AAG TGT ATC CAC AGG GAC CTG GCA GCA CGA AAC ATT  
 Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile  
 1020 1025 1030

CTC CTA TCG GAG AAG AAT GTG GTT AAG ATC TGT GAC TTC GGC TTG GCC  
 Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala  
 1035 1040 1045

CGG GAC ATT TAT AAA GAC CCG GAT TAT GTC AGA AAA GGA GAT GCC CGA  
 Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg  
 1050 1055 1060

CTC CCT TTG AAG TGG ATG GCC CCG GAA ACC ATT TTT GAC AGA GTA TAC  
 Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr  
 1065 1070 1075 1080

ACA ATT CAG AGC GAT GTG TGG TCT TTC GGT GTG TTG CTC TGG GAA ATA  
 Thr Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
 1085 1090 1095

TTT TCC TTA GGT GCC TCC CCA TAC CCT GGG GTC AAG ATT GAT GAA GAA  
 Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu  
 1100 1105 1110

TTT TGT AGG AGA TTG AAA GAA GGA ACT AGA ATG CGG GCT CCT GAC TAC  
 Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr  
 1115 1120 1125

ACT ACC CCA GAA ATG TAC CAG ACC ATG CTG GAC TGC TGG CAT GAG GAC  
 Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Glu Asp  
 1130 1135 1140

CCC AAC CAG AGA CCC TCG TTT TCA GAG TTG GTG GAG CAT TTG GGA AAC  
 Pro Asn Gln Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn  
 1145 1150 1155 1160

CTC CTG CAA GCA AAT GCG CAG CAG GAT GGC AAA GAC TAT ATT GTT CTT  
 Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu  
 1165 1170 1175

CCA ATG TCA GAG ACA CTG AGC ATG GAA GAG GAT TCT GGA CTC TCC CTG  
 Pro Met Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu  
 1180 1185 1190

CCT ACC TCA CCT GTT TCC TGT ATG GAG GAA GAG GAA GTG TGC GAC CCC  
 Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro  
 1195 1200 1205

DE 692 33 676 T2 2007.11.15

AAA TTC CAT TAT GAC AAC ACA GCA GGA ATC AGT CAT TAT CTC CAG AAC  
 Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala Gly Ile Ser His Tyr Leu Gln Asn  
 1210 1215 1220

AGT AAG CGA AAG AGC CGG CCA GTG AGT GTA AAA ACA TTT GAA GAT ATC  
 Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile  
 1225 1230 1235 1240

CCA TTG GAG GAA CCA GAA GTA AAA GTG ATC CCA GAT GAC AGC CAG ACA  
 Pro Leu Glu Glu Pro Glu Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Ser Gln Thr  
 1245 1250 1255

GAC AGT GGG ATG GTC CTT GCA TCA GAA GAG CTG AAA ACT CTG GAA GAC  
 Asp Ser Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp  
 1260 1265 1270

AGG AAC AAA TTA TCT CCA TCT TTT GGT GGA ATG ATG CCC AGT AAA AGC  
 Arg Asn Lys Leu Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Met Pro Ser Lys Ser  
 1275 1280 1285

AGG GAG TCT GTG GCC TCG GAA GGC TCC AAC CAG ACC AGT GGC TAC CAG  
 Arg Glu Ser Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln  
 1290 1295 1300

TCT GGG TAT CAC TCA GAT GAC ACA GAC ACC ACC GTG TAC TCC AGC GAC  
 Ser Gly Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Asp  
 1305 1310 1315 1320

GAG GCA GGA CTT TTA AAG ATG GTG GAT GCT GCA GTT CAC GCT GAC TCA  
 Glu Ala Gly Leu Leu Lys Met Val Asp Ala Ala Val His Ala Asp Ser  
 1325 1330 1335

GGG ACC ACA CTG CAG CTC ACC TCC TGT TTA AAT GGA AGT GGT CCT GTC  
 Gly Thr Thr Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gly Ser Gly Pro Val  
 1340 1345 1350

CCG GCT CCG CCC CCA ACT CCT GGA AAT CAC GAG AGA GGT GCT GCT  
 Pro Ala Pro Pro Pro Thr Pro Gly Asn His Glu Arg Gly Ala Ala  
 1355 1360 1365

TAGATTTTCA AGTGTTGTTT TTTCCACCAC CCGGAAGTAG CCACATTTGA TTTTCATTTT  
 TGGAGGAGGG ACCTCAGACT GCAAGGAGCT TGTCTCAGG GCATTTCCAG AGAAGATGCC  
 CATGACCCAA GAATGTGTTG ACTCTACTCT CTTTTCCATT CATTTAAAAG TCCTATATAA  
 TGTGGTCTCA CTACCAGTTA AAGCAAAGA CTTTCAAACA CGTGGACTCT GTCCTCCAAG  
 TGTGCCCTGC AAGTGGCAAC GGCACCTCTG TGAACTGGA TCGAATGGGC AATGCTTTGT  
 GTGTTGAGGA TGGGTGAGAT GTCCCAGGGC CGAGTCTGTC TACCTTGAG GCTTTGTGGA  
 GGATGCGGCT ATGAGCCAAG TGTAAAGTGT GGGATGTGGA CTGGGAGGAA GGAAGGCGCA  
 AGAGCGGTTG GAGCCTGCAG ATGCATTGTG CTGGCTCTGG TGGAGGTGGG CTTGTGGCCT

GTCAGGAAAC GCAAAGGCGG CCGGCAGGGT TTGGTTTTGG AAGGTTTGCG TGCTCTTCAC  
 AGTCGGGTTA CAGGCGAGTT CCCTGTGGCG TTCCTACTC CTAATGAGAG TTCCTTCCGG  
 ACTCTTACGT GTCTCCTGGC CTGGCCCCAG GAAGGAAATG ATGCAGCTTG CTCCTTCCTC  
 ATCTCTCAGG CTGTGCCTTA ATTCAGAACA CCAAAAGAGA GGAACGTCGG CAGAGGCTCC  
 TGACGGGGCC GAAGAATTGT GAGAACAGAA CAGAAACTCA GGGTTTCTGC TGGGTGGAGA  
 CCCACGTGGC GCCCTGGTGG CAGGTCTGAG GGTTCTCTGT CAAGTGGCGG TAAAGGCTCA  
 GGCTGGTGT CTTCCTCTAT CTCCACTCCT GTCAGGCCCC CAAGTCCTCA GTATTTTAGC  
 TTTGTGGCTT CCTGATGGCA GAAAAATCTT AATTGGTTGG TTTGCTCTCC AGATAATCAC  
 TAGCCAGATT TCGAAATTAC TTTTATAGCCG AGGTTATGAT AACATCTACT GTATCCTTTA  
 GAATTTTAAC CTATAAACT ATGTCTACTG GTTTCTGCCT GTGTGCTTAT GTTAAAAAAA  
 AGCCGTCCGG AAAAAAAA 5406

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:8:

- (i) CHARAKTERISTIKA DER SEQUENZ:
  - (A) LÄNGE: 1367 AMINOSÄUREN
  - (B) TYP: AMINOSÄURE
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:8:

Met	Glu	Ser	Lys	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Val	Glu
1				5					10					15	
Thr	Arg	Ala	Ala	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Asp	Phe	Leu	His	Pro	Pro
			20					25					30		
Lys	Leu	Ser	Thr	Gln	Lys	Asp	Ile	Leu	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn	Thr	Thr
		35					40					45			
Leu	Gln	Ile	Thr	Cys	Arg	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Asp	Trp	Leu	Trp	Pro
	50					55					60				
Asn	Ala	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Cys	Gly
65					70					75					80
Gly	Gly	Asp	Ser	Ile	Phe	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Pro	Arg	Val	Val

DE 692 33 676 T2 2007.11.15

85

90

95

Gly	Asn	Asp	Thr	Gly	Ala	Tyr	Lys	Cys	Ser	Tyr	Arg	Asp	Val	Asp	Ile
			100					105					110		
Ala	Ser	Thr	Val	Tyr	Val	Tyr	Val	Arg	Asp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Ile
		115					120					125			

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Ala Ser Val Ser Asp Gln His Gly Ile Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys  
130 135 140

Asn Lys Thr Val Val Ile Pro Cys Arg Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn  
145 150 155 160

Val Ser Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly  
165 170 175

Asn Arg Ile Ser Trp Asp Ser Glu Ile Gly Phe Thr Leu Pro Ser Tyr  
180 185 190

Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp  
195 200 205

Glu Thr Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg  
210 215 220

Ile Tyr Asp Val Ile Leu Ser Pro Pro His Glu Ile Glu Leu Ser Ala  
225 230 235 240

Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val  
245 250 255

Gly Leu Asp Phe Thr Trp His Ser Pro Pro Ser Lys Ser His His Lys  
260 265 270

Lys Ile Val Asn Arg Asp Val Lys Pro Phe Pro Gly Thr Val Ala Lys  
275 280 285

Met Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Glu Ser Val Thr Lys Ser Asp Gln  
290 295 300

Gly Glu Tyr Thr Cys Val Ala Ser Ser Gly Arg Met Ile Lys Arg Asn  
305 310 315 320

Arg Thr Phe Val Arg Val His Thr Lys Pro Phe Ile Ala Phe Gly Ser  
325 330 335

Gly Met Lys Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Ser Gln Val Arg Ile  
340 345 350

Pro Val Lys Tyr Leu Ser Tyr Pro Ala Pro Asp Ile Lys Trp Tyr Arg  
355 360 365

Asn Gly Arg Pro Ile Glu Ser Asn Tyr Thr Met Ile Val Gly Asp Glu  
370 375 380

Leu Thr Ile Met Glu Val Thr Glu Arg Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Val  
385 390 395 400

Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Met Glu Lys Gln Ser His Met Val Ser  
405 410 415

Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ala Leu Ile Ser  
420 425 430

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Pro Met Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Met Gln Thr Leu Thr Cys Thr  
 435 440 445  
 Val Tyr Ala Asn Pro Pro Leu His His Ile Gln Trp Tyr Trp Gln Leu  
 450 455 460  
 Glu Glu Ala Cys Ser Tyr Arg Pro Gly Gln Thr Ser Pro Tyr Ala Cys  
 465 470 475 480  
 Lys Glu Trp Arg His Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu  
 485 490 495  
 Val Thr Lys Asn Gln Tyr Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val  
 500 505 510  
 Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys  
 515 520 525  
 Glu Ala Ile Asn Lys Ala Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His  
 530 535 540  
 Val Ile Arg Gly Pro Glu Ile Thr Val Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr  
 545 550 555 560  
 Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Leu Cys Thr Ala Asp Arg Asn Thr Phe  
 565 570 575  
 Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Ser Gln Ala Thr Ser Val His  
 580 585 590  
 Met Gly Glu Ser Leu Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Ala Leu Trp  
 595 600 605  
 Lys Leu Asn Gly Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile  
 610 615 620  
 Val Ala Phe Gln Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys  
 625 630 635 640  
 Ser Ala Gln Asp Lys Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Leu Val Lys Gln  
 645 650 655  
 Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Ala Pro Met Ile Thr Gly Asn Leu Glu  
 660 665 670  
 Asn Gln Thr Thr Thr Ile Gly Glu Thr Ile Glu Val Thr Cys Pro Ala  
 675 680 685  
 Ser Gly Asn Pro Thr Pro His Ile Thr Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr  
 690 695 700  
 Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Arg Asp Gly Asn Arg Asn Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Gly Gly Leu Tyr Thr Cys Gln  
 725 730 735



## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Ala Cys Asn Val Leu Gly Cys Ala Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ile Ile  
740 745 750

Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Val Ile Ile Leu Val Gly  
755 760 765

Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile Leu Val  
770 775 780

Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Glu Gly Glu Leu Lys Thr Gly Tyr Leu  
785 790 795 800

Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu Arg Cys Glu  
805 810 815

Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu  
820 825 830

Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile Glu  
835 840 845

Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Lys Thr Val Ala  
850 855 860

Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg Ala Leu  
865 870 875 880

Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu Asn Val  
885 890 895

Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu Met Val  
900 905 910

Ile Val Glu Phe Ser Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu Arg Gly  
915 920 925

Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Arg Phe Arg  
930 935 940

Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Glu Leu Ser Val Asp Leu Lys Arg Arg  
945 950 955 960

Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val  
965 970 975

Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Ser Glu Glu  
980 985 990

Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr Ser Phe  
995 1000 1005

Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His  
1010 1015 1020

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val  
1025 1030 1035 1040

## DE 692 33 676 T2 2007.11.15

Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp  
 1045 1050 1055  
 Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro  
 1060 1065 1070  
 Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser  
 1075 1080 1085  
 Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr  
 1090 1095 1100  
 Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly  
 1105 1110 1115 1120  
 Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr  
 1125 1130 1135  
 Met Leu Asp Cys Trp His Glu Asp Pro Asn Gln Arg Pro Ser Phe Ser  
 1140 1145 1150  
 Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln  
 1155 1160 1165  
 Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Met Ser Glu Thr Leu Ser Met  
 1170 1175 1180  
 Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met  
 1185 1190 1195 1200  
 Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala  
 1205 1210 1215  
 Gly Ile Ser His Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro Val  
 1220 1225 1230  
 Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu Val Lys  
 1235 1240 1245  
 Val Ile Pro Asp Asp Ser Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala Ser  
 1250 1255 1260  
 Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Asn Lys Leu Ser Pro Ser Phe  
 1265 1270 1275 1280  
 Gly Gly Met Met Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser Glu Gly  
 1285 1290 1295  
 Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp Asp Thr  
 1300 1305 1310  
 Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Asp Glu Ala Gly Leu Leu Lys Met Val  
 1315 1320 1325  
 Asp Ala Ala Val His Ala Asp Ser Gly Thr Thr Leu Gln Leu Thr Ser  
 1330 1335 1340

Cys Leu Asn Gly Ser Gly Pro Val Pro Ala Pro Pro Pro Thr Pro Gly  
1345 1350 1355 1360

Asn His Glu Arg Gly Ala Ala  
1365

### Patentansprüche

1. Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus  
(i) der Sequenz, gezeigt in [Fig. 2](#),  
(ii) funktionalen Äquivalenten der Sequenz, dargestellt in [Fig. 2](#), wobei weniger als 25% der Anzahl von Aminosäureresten in der Aminosäuresequenz von [Fig. 2](#) substituiert, addiert oder deletiert sind, und  
(iii) Fragmenten von irgendwelchen der oben genannten Sequenzen, welche Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase-Aktivität beibehalten.
  2. Die Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase gemäß Anspruch 1, welche menschliche flk-1 ist.
  3. Die Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase gemäß Anspruch 1, welche Maus flk-1 ist.
  4. Ein Nukleinsäuremolekül, welches eine Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase kodiert, entsprechend irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.
    5. Das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 4, wobei das Nukleinsäuremolekül DNA ist.
    6. Das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5, wobei das Nukleinsäuremolekül cDNA ist.
    7. Das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 4, wobei das Nukleinsäuremolekül RNA ist.
  8. Ein Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül kodierend eine Rezeptor Protein Tyrosin-Kinase entsprechend irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.
    9. Der Vektor gemäß Anspruch 8, wobei der Vektor in der Lage ist, in einem Wirt kloniert zu werden.
    10. Der Vektor gemäß Anspruch 9, wobei der Wirt ein prokaryontischer Wirt ist.
    11. Der Vektor gemäß Anspruch 9, wobei der Wirt ein eukaryontischer Wirt ist.
  12. Der Vektor gemäß irgendeinem der Ansprüche 8 bis 11, der in der Lage ist, das Nukleinsäuremolekül in einem Wirt zu exprimieren.
  13. Der Vektor gemäß Anspruch 12, der in der Lage ist, flk-1 in einem Wirt zu exprimieren.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIG. 1a.1

GCGGCCTGGC TACCGCGCGC TCCGGAGGCC ATG CGG GCG TTG GCG CAG CGC AGC  
 Met Arg Ala Leu Ala Gln Arg Ser  
 1 5

GAC CGG CGG CTG CTG CTG CTT GTT GTT TTG TCA GTA ATG ATT CTT GAG  
 Asp Arg Arg Leu Leu Leu Leu Val Val Leu Ser Val Met Ile Leu Glu  
 10 15 20

ACC GTT ACA AAC CAA GAC CTG CCT GTG ATC AAG TGT GTT TTA ATC AGT  
 Thr Val Thr Asn Gln Asp Leu Pro Val Ile Lys Cys Val Leu Ile Ser  
 25 30 35 40

CAT GAG AAC AAT GGC TCA TCA GCG GGA AAG CCA TCA TCG TAC CGA ATG  
 His Glu Asn Asn Gly Ser Ser Ala Gly Lys Pro Ser Ser Tyr Arg Met  
 45 50 55

GTG CGA GGA TCC CCA GAA GAC CTC CAG TGT ACC CCG AGG CGC CAG AGT  
 Val Arg Gly Ser Pro Glu Asp Leu Gln Cys Thr Pro Arg Arg Gln Ser  
 60 65 70

GAA GGG ACG GTA TAT GAA GCG GCC ACC GTG GAG GTG GCC GAG TCT GGG  
 Glu Gly Thr Val Tyr Glu Ala Ala Thr Val Glu Val Ala Glu Ser Gly  
 75 80 85

TCC ATC ACC CTG CAA GTG CAG CTC GCC ACC CCA GGG GAC CTT TCC TGC  
 Ser Ile Thr Leu Gln Val Gln Leu Ala Thr Pro Gly Asp Leu Ser Cys  
 90 95 100

CTC TGG GTC TTT AAG CAC AGC TCC CTG GGC TGC CAG CCG CAC TTT GAT  
 Leu Trp Val Phe Lys His Ser Ser Leu Gly Cys Gln Pro His Phe Asp  
 105 110 115 120

TTA CAA AAC AGA GGA ATC GTT TCC ATG GCC ATC TTG AAC GTG ACA GAG  
 Leu Gln Asn Arg Gly Ile Val Ser Met Ala Ile Leu Asn Val Thr Glu  
 125 130 135

ACC CAG GCA GGA GAA TAC CTA CTC CAT ATT CAG AGC GAA CGC GCC AAC  
 Thr Gln Ala Gly Glu Tyr Leu Leu His Ile Gln Ser Glu Arg Ala Asn  
 140 145 150

TAC ACA GTA CTG TTC ACA GTG AAT GTA AGA GAT ACA CAG CTG TAT GTG  
 Tyr Thr Val Leu Phe Thr Val Asn Val Arg Asp Thr Gln Leu Tyr Val  
 155 160 165

CTA AGG AGA CCT TAC TTT AGG AAG ATG GAA AAC CAG GAT GCA CTG CTC  
 Leu Arg Arg Pro Tyr Phe Arg Lys Met Glu Asn Gln Asp Ala Leu Leu  
 170 175 180

TGC ATC TCC GAG GGT GTT CCG GAG CCC ACT GTG GAG TGG GTG CTC TGC  
 Cys Ile Ser Glu Gly Val Pro Glu Pro Thr Val Glu Trp Val Leu Cys  
 185 190 195 200

AGC TCC CAC AGG GAA AGC TGT AAA GAA GAA GGC CCT GCT GTT GTC AGA  
 Ser Ser His Arg Glu Ser Cys Lys Glu Glu Gly Pro Ala Val Val Arg  
 205 210 215

FIG. 1a.1

AAG GAG GAA AAG GTA CTT CAT GAG TTG TTC GGA ACA GAC ATC AGA TGC  
 Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu Phe Gly Thr Asp Ile Arg Cys  
 220 225 230

TGT GCT AGA AAT GCA CTG GGC CGC GAA TGC ACC AAG CTG TTC ACC ATA  
 Cys Ala Arg Asn Ala Leu Gly Arg Glu Cys Thr Lys Leu Phe Thr Ile  
 235 240 245

GAT CTA AAC CAG GCT CCT CAG AGC ACA CTG CCC CAG TTA TTC CTG AAA  
 Asp Leu Asn Gln Ala Pro Gln Ser Thr Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys  
 250 255 260

GTG GGG GAA CCC TTG TGG ATC AGG TGT AAG GCC ATC CAT GTG AAC CAT  
 Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg Cys Lys Ala Ile His Val Asn His  
 265 270 275 280

GGA TTC GGG CTC ACC TGG GAG CTG GAA GAC AAA GCC CTG GAG GAG GGC  
 Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu Glu Asp Lys Ala Leu Glu Glu Gly  
 285 290 295

AGC TAC TTT GAG ATG AGT ACC TAC TCC ACA AAC AGG ACC ATG ATT CGG  
 Ser Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg  
 300 305 310

ATT CTC TTG GCC TTT GTG TCT TCC GTG GGA AGG AAC GAC ACC GGA TAT  
 Ile Leu Leu Ala Phe Val Ser Ser Val Gly Arg Asn Asp Thr Gly Tyr  
 315 320 325

TAC ACC TGC TCT TCC TCA AAG CAC CCC AGC CAG TCA GCG TTG GTG ACC  
 Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His Pro Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr  
 330 335 340

ATC CTA GAA AAA GGG TTT ATA AAC GCT ACC AGC TCG CAA GAA GAG TAT  
 Ile Leu Glu Lys Gly Phe Ile Asn Ala Thr Ser Ser Gln Glu Glu Tyr  
 345 350 355 360

GAA ATT GAC CCG TAC GAA AAG TTC TGC TTC TCA GTC AGG TTT AAA GCG  
 Glu Ile Asp Pro Tyr Glu Lys Phe Cys Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala  
 365 370 375

TAC CCA CGA ATC CGA TGC ACG TGG ATC TTC TCT CAA GCC TCA TTT CCT  
 Tyr Pro Arg Ile Arg Cys Thr Trp Ile Phe Ser Gln Ala Ser Phe Pro  
 380 385 390

TGT GAA CAG AGA GGC CTG GAG GAT GGG TAC AGC ATA TCT AAA TTT TGC  
 Cys Glu Gln Arg Gly Leu Glu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys  
 395 400 405

GAT CAT AAG AAC AAG CCA GGA GAG TAC ATA TTC TAT GCA GAA AAT GAT  
 Asp His Lys Asn Lys Pro Gly Glu Tyr Ile Phe Tyr Ala Glu Asn Asp  
 410 415 420

GAC GCC CAG TTC ACC AAA ATG TTC ACG CTG AAT ATA AGA AAG AAA CCT  
 Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr Leu Asn Ile Arg Lys Lys Pro  
 425 430 435 440

FIG. 1a.2

CAA Gln	GTG Val	CTA Leu	GCA Ala	AAT Asn 445	GCC Ala	TCA Ser	GCC Ala	AGC Ser	CAG Gln 450	GCG Ala	TCC Ser	TGT Cys	TCC Ser	TCT Ser	GAT Asp 455
GGC Gly	TAC Tyr	CCG Pro	CTA Leu 460	CCC Pro	TCT Ser	TGG Trp	ACC Thr	TGG Trp 465	AAG Lys	AAG Lys	TGT Cys	TCG Ser	GAC Asp 470	AAA Lys	TCT Ser
CCC Pro	AAT Asn	TGC Cys 475	ACG Thr	GAG Glu	GAA Glu	ATC Ile	CCA Pro 480	GAA Glu	GGA Gly	GTT Val	TGG Trp	AAT Asn 485	AAA Lys	AAG Lys	GCT Ala
AAC Asn 490	AGA Arg	AAA Lys	GTG Val	TTT Phe	GGC Gly 495	CAG Gln	TGG Trp	GTG Val	TCG Ser	AGC Ser	AGT Ser 500	ACT Thr	CTA Leu	AAT Asn	ATG Met
AGT Ser 505	GAG Glu	GCC Ala	GGG Gly	AAA Lys	GGG Gly 510	CTT Leu	CTG Leu	GTC Val	AAA Lys	TGC Cys 515	TGT Cys	GCG Ala	TAC Tyr	AAT Asn	TCT Ser 520
ATG Met	GGC Gly	ACG Thr	TCT Ser	TGC Cys 525	GAA Glu	ACC Thr	ATC Ile	TTT Phe	TTA Leu 530	AAC Asn	TCA Ser	CCA Pro	GGC Gly 535	CCC Pro	TTC Phe
CCT Pro	TTC Phe	ATC Ile	CAA Gln 540	GAC Asp	AAC Asn	ATC Ile	TCC Ser	TTC Phe 545	TAT Tyr	GCG Ala	ACC Thr	ATT Ile	GGG Gly 550	CTC Leu	TGT Cys
CTC Leu	CCC Pro	TTC Phe 555	ATT Ile	GTT Val	GTT Val	CTC Leu	ATT Ile 560	GTG Val	TTG Leu	ATC Ile	TGC Cys	CAC His 565	AAA Lys	TAC Tyr	AAA Lys
AAG Lys 570	CAA Gln	TTT Phe	AGG Arg	TAC Tyr	GAG Glu	AGT Ser 575	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	ATG Met	ATC Ile 580	CAG Gln	GTG Val	ACT Thr	GGC Gly
CCC Pro 585	CTG Leu	GAT Asp	AAC Asn	GAG Glu	TAC Tyr 590	TTC Phe	TAC Tyr	GTT Val	GAC Asp	TTC Phe 595	AGG Arg	GAC Asp	TAT Tyr	GAA Glu	TAT Tyr 600
GAC Asp	CTT Leu	AAG Lys	TGG Trp	GAG Glu 605	TTC Phe	CCG Pro	AGA Arg	GAG Glu	AAC Asn 610	TTA Leu	GAG Glu	TTT Phe	GGG Gly	AAG Lys	GTC Val 615
CTG Leu	GGG Gly	TCT Ser	GGC Gly 620	GCT Ala	TTC Phe	GGG Gly	AGG Arg	GTG Val 625	ATG Met	AAC Asn	GCC Ala	ACG Thr	GCC Ala 630	TAT Tyr	GGC Gly
ATT Ile	AGT Ser	AAA Lys 635	ACG Thr	GGA Gly	GTC Val	TCA Ser	ATT Ile 640	CAG Gln	GTG Val	GCG Ala	GTG Val	AAG Lys 645	ATG Met	CTA Leu	AAA Lys
GAG Glu 650	AAA Lys	GCT Ala	GAC Asp	AGC Ser	TGT Cys	GAA Glu 655	AAA Lys	GAA Glu	GCT Ala	CTC Leu	ATG Met 660	TCG Ser	GAG Glu	CTC Leu	AAA Lys

FIG. 1a.2

ATG Met 665	ATG Met	ACC Thr	CAC His	CTG Leu	GGA Gly 670	CAC His	CAT His	GAC Asp	AAC Asn	ATC Ile 675	GTG Val	AAT Asn	CTG Leu	CTG Leu	GGC Gly 680
GCA Ala	TGC Cys	ACA Thr	CTG Leu	TCA Ser 685	GGG Gly	CCA Pro	GTG Val	TAC Tyr	TTG Leu 690	ATT Ile	TTT Phe	GAA Glu	TAT Tyr	TGT Cys 695	TGC Cys
TAT Tyr	GGT Gly	GAC Asp	CTC Leu 700	CTC Leu	AAC Asn	TAC Tyr	CTA Leu	AGA Arg 705	AGT Ser	AAA Lys	AGA Arg	GAG Glu	AAG Lys 710	TTT Phe	CAC His
AGG Arg	ACA Thr 715	TGG Trp	ACA Thr	GAG Glu	ATT Ile	TTT Phe 720	AAG Lys	GAA Glu	CAT His	AAT Asn	TTC Phe 725	AGT Ser	TCT Ser	TAC Tyr	CCT Pro
ACT Thr	TTC Phe 730	CAG Gln	GCA Ala	CAT His	TCA Ser	AAT Asn 735	TCC Ser	AGC Ser	ATG Met	CCT Pro	GGT Gly 740	TCA Ser	CGA Arg	GAA Glu	GTT Val
CAG Gln 745	TTA Leu	CAC His	CCG Pro	CCC Pro	TTG Leu 750	GAT Asp	CAG Gln	CTC Leu	TCA Ser	GGG Gly 755	TTC Phe	AAT Asn	GGG Gly	AAT Asn	TCA Ser 760
ATT Ile	CAT His	TCT Ser	GAA Glu	GAT Asp 765	GAG Glu	ATT Ile	GAA Glu	TAT Tyr	GAA Glu 770	AAC Asn	CAG Gln	AAG Lys	AGG Arg	CTG Leu 775	GCA Ala
GAA Glu	GAA Glu	GAG Glu	GAG Glu 780	GAA Glu	GAT Asp	TTG Leu	AAC Asn	GTG Val 785	CTG Leu	ACG Thr	TTT Phe	GAA Glu	GAC Asp 790	CTC Leu	CTT Leu
TGC Cys	TTT Phe	GCG Ala 795	TAC Tyr	CAA Gln	GTG Val	GCC Ala	AAA Lys 800	GGC Gly	ATG Met	GAA Glu	TTC Phe	CTG Leu 805	GAG Glu	TTC Phe	AAG Lys
TCG Ser	TGT Cys 810	GTC Val	CAC His	AGA Arg	GAC Asp	CTG Leu 815	GCA Ala	GCC Ala	AGG Arg	AAT Asn	GTG Val 820	TTG Leu	GTC Val	ACC Thr	CAC His
GGG Gly 825	AAG Lys	GTG Val	GTG Val	AAG Lys	ATC Ile 830	TGT Cys	GAC Asp	TTT Phe	GGA Gly 835	CTG Leu	GCC Ala	CGA Arg	GAC Asp	ATC Ile	CTG Leu 840
AGC Ser	GAC Asp	TCC Ser	AGC Ser	TAC Tyr 845	GTC Val	GTC Val	AGG Arg	GGC Gly	AAC Asn 850	GCA Ala	CGG Arg	CTG Leu	CCG Pro	GTG Val 855	AAG Lys
TGG Trp	ATG Met	GCA Ala	CCC Pro 860	GAG Glu	AGC Ser	TTA Leu	TTT Phe	GAA Glu 865	GGG Gly	ATC Ile	TAC Tyr	ACA Thr	ATC Ile	AAG Lys 870	AGT Ser
GAC Asp	GTC Val	TGG Trp 875	TCC Ser	TAC Tyr	GGC Gly	ATC Ile	CTT Leu 880	CTC Leu	TGG Trp	GAG Glu	ATA Ile	TTT Phe 885	TCA Ser	CTG Leu	GGT Gly

FIG. 1a.3

GTG AAC CCT TAC CCT GGC ATT CCT GTC GAC GCT AAC TTC TAT AAA CTC  
 Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Asp Ala Asn Phe Tyr Lys Leu  
 890 895 900

ATT CAG AGT GGA TTT AAA ATG GAG CAG CCA TTC TAT GCC ACA GAA GGG  
 Ile Gln Ser Gly Phe Lys Met Glu Gln Pro Phe Tyr Ala Thr Glu Gly  
 905 910 915 920

ATA TAC TTT GTA ATG CAA TCC TGC TGG GCT TTT GAC TCA AGG AAG CCG  
 Ile Tyr Phe Val Met Gln Ser Cys Trp Ala Phe Asp Ser Arg Lys Arg  
 925 930 935

CCA TCC TTC CCC AAC CTG ACT TCA TTT TTA GGA TGT CAG CTG GCA GAG  
 Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser Phe Leu Gly Cys Gln Leu Ala Glu  
 940 945 950

GCA GAA GAA GCA TGT ATC AGA ACA TCC ATC CAT CTA CCA AAA CAG GCG  
 Ala Glu Glu Ala Cys Ile Arg Thr Ser Ile His Leu Pro Lys Gln Ala  
 955 960 965

GCC CCT CAG CAG AGA GGC GGG CTC AGA GCC CAG TCG CCA CAG CGC CAG  
 Ala Pro Gln Gln Arg Gly Gly Leu Arg Ala Gln Ser Pro Gln Arg Gln  
 970 975 980

GTG AAG ATT CAC AGA GAA AGA AGT TAGCGAGGAG GCCTTGGACC CCGCCACCCT  
 Val Lys Ile His Arg Glu Arg Ser  
 985 990

AGCAGGCTGT AGACCGCAGA GCCAAGATTA GCCTCGCCTC TGAGGAAGCG CCCTACAGC  
 CGTTGCTTCG CTGGACTTTT CTCTAGATGC TGTCTGCCAT TACTCCAAAG TGA CTCTA  
 AAAATCAAAC CTCTCCTCGC ACAGGCGGGA GAGCCAATAA TGAGACTTGT TGGTGAGCC  
 GCCTACCCTG GGGGCCTTTC CACGAGCTTG AGGGGAAAGC CATGTATCTG AAATATAGT  
 TATTCTTGTA AATACGTGAA ACAAACCAA CCCGTTTTTT GCTAAGGGAA AGCTAAATA  
 GATTTTAAA AATCTATGTT TTAAAATACT ATGTAAC TTTTTCATCTATT TAGTGATAT  
 TTTTATGGAT GGAAATAAAC TTTCTACTGT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA



FIG. 1b.

AAC	AAT	GAT	TCA	TCA	GTG	GGG	AAG	TCA	TCA	TCA	TAT	CCC	ATG	GTA	TCA
Asn	Asn	Asp	Ser	Ser	Val	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Val	Ser
1				5					10					15	
GAA	TCC	CCG	GAA	GAC	CTC	GGG	TGT	GCG	TTG	AGA	CCC	CAG	AGC	TCA	GGG
Glu	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu	Gly	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly
			20					25					30		
ACA	GTG	TAC	GAA	GCT	GCC	GCT	GTG	GAA	GTG	GAT	GTA	TCT	GCT	TCC	ATC
Thr	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Ser	Ile
			35				40					45			
ACA	CTG	CAA	GTG	CTG	GTC	GAT	GCC	CCA	GGG	AAC	ATT	TCC	TGT	CTC	TGG
Thr	Leu	Gln	Val	Leu	Val	Asp	Ala	Pro	Gly	Asn	Ile	Ser	Cys	Leu	Trp
	50					55					60				
GTC	TTT	AAG	CAC	AGC	TCC	CTG	AAT	TGC	CAG	CCA	CAT	TTT	GAT	TTA	CAA
Val	Phe	Lys	His	Ser	Ser	Leu	Asn	Cys	Gln	Pro	His	Phe	Asp	Leu	Gln
65					70					75					80
AAC	AGA	GGA	GTT	GTT	TCC	ATG	GTC	ATT	TTG	AAA	ATG	ACA	GAA	ACC	CAA
Asn	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Met	Val	Ile	Leu	Lys	Met	Thr	Glu	Thr	Gln
				85					90					95	
GCT	GGA	GAA	TAC	CTA	CTT	TTT	ATT	CAG	AGT	GAA	GCT	ACC	AAT	TA	
Ala	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Phe	Ile	Gln	Ser	Glu	Ala	Thr	Asn		
			100					105					110		

FIG. 1c.

GAT	CAA	ATC	TCA	GGC	TTC	ATG	GAA	TTC	ATT	CAC	TCT	GAA	GAT	GAA	ATC
Asp	Gln	Ile	Ser	Gly	Phe	Met	Glu	Phe	Ile	His	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile
1				5					10					15	
GAA	TAT	GAA	AAC	CAA	AAA	AAG	AGG	CTG	GAA	GAA	GAG	GAG	GAC	TTG	AAI
Glu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Lys	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn
			20					25					30		
GTG	CTT	ACA	TTT	GAA	GAT	CTT	CTT	TGC	TTT	GCA	TAT	CAA	GTT	GCC	AAA
Val	Leu	Thr	Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Cys	Phe	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Lys
		35						40				45			
GGA	ATG	GAA	TTT	AAG	TCG	TGT	GTT	CAC	AGA	GAC	CTG	GCC	GCC	AGG	AAC
Gly	Met	Glu	Phe	Lys	Ser	Cys	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn
	50					55					60				
GTG	CTT	GTC	ACC	CAC	GGG	AAA	GTG	GTG	AAG	ATA	TGT	GAC	TTT	GGA	TTG
Val	Leu	Val	Thr	His	Gly	Lys	Val	Val	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu
	65				70					75					80
GCT	CGA	GAT	ATC	ATG	AGT	GAT	TCC	GGC	TAT	GTT	GTC	AGG	CAA		
Ala	Arg	Asp	Ile	Met	Ser	Asp	Ser	Gly	Tyr	Val	Val	Arg	Gln		
				85					90						

TC



FIG. 2.

ATA Ile 185	GCC Gly	TTT Phe	ACT Thr	CTC Leu	CCC Pro 190	AGT Ser	TAC Tyr	ATG Met	ATC Ile	AGC Ser 195	TAT Tyr	GCC Ala	GGC Gly	ATG Met	GTC Val 200
TTC Phe	TGT Cys	GAG Glu	GCA Ala	AAG Lys 205	ATC Ile	AAT Asn	GAT Asp	GAA Glu	ACC Thr 210	TAT Tyr	CAG Gln	TCT Ser	ATC Ile	ATG Met 215	TAC Tyr
ATA Ile	GTT Val	GTG Val	GTT Val 220	GTA Val	GGA Gly	TAT Tyr	AGG Arg	ATT Ile 225	TAT Tyr	GAT Asp	GTG Val	ATT Ile	CTG Leu 230	AGC Ser	CCC Pro
CCG Pro	CAT His	GAA Glu 235	ATT Ile	GAG Glu	CTA Leu	TCT Ser	GCC Ala 240	GGA Gly	GAA Glu	AAA Lys	CTT Leu	GTC Val 245	TTA Leu	AAT Asn	TGT Cys
ACA Thr 250	GCG Ala	AGA Arg	ACA Thr	GAG Glu	CTC Leu	AAT Asn 255	GTG Val	GGG Gly	CTT Leu	GAT Asp	TTC Phe 260	ACC Thr	TGG Trp	CAC His	TCT Ser
CCA Pro 265	CCT Pro	TCA Ser	AAG Lys	TCT Ser	CAT His 270	CAT His	AAG Lys	AAG Lys	ATT Ile	GTA Val 275	AAC Asn	CGG Arg	GAT Asp	GTG Val	AAA Lys 280
CCC Pro	TTT Phe	CCT Pro	GGG Gly 285	ACT Thr	GTG Val	GCG Ala	AAG Lys	ATG Met	TTT Phe 290	TTG Leu	AGC Ser	ACC Thr	TTG Leu	ACA Thr 295	ATA Ile
GAA Glu	AGT Ser	GTG Val	ACC Thr 300	AAG Lys	AGT Ser	GAC Asp	CAA Gln	GGG Gly 305	GAA Glu	TAC Tyr	ACC Thr	TGT Cys	GTA Val 310	GCG Ala	TCC Ser
AGT Ser	GGA Gly	CGG Arg 315	ATG Met	ATC Ile	AAG Lys	AGA Arg	AAT Asn 320	AGA Arg	ACA Thr	TTT Phe	GTC Val	CGA Arg 325	GTT Val	CAC His	ACA Thr
AAG Lys 330	CCT Pro	TTT Phe	ATT Ile	GCT Ala	TTC Phe 335	GGT Gly	AGT Ser	GGG Gly	ATG Met	AAA Lys	TCT Ser 340	TTG Leu	GTG Val	GAA Glu	GCC Ala
ACA Thr 345	GTG Val	GGC Gly	AGT Ser	CAA Gln 350	GTC Val	CGA Arg	ATC Ile	CCT Pro	GTG Val	AAG Lys 355	TAT Tyr	CTC Leu	AGT Ser	TAC Tyr	CCA Pro 360
GCT Ala	CCT Pro	GAT Asp	ATC Ile	AAA Lys 365	TGG Trp	TAC Tyr	AGA Arg	AAT Asn	GGA Gly 370	AGG Arg	CCC Pro	ATT Ile	GAG Glu	TCC Ser 375	AAC Asn
TAC Tyr	ACA Thr	ATG Met	ATT Ile	GTT Val	GGC Gly	GAT Asp	GAA Glu	CTC Leu 385	ACC Thr	ATC Ile	ATG Met	GAA Glu	GTG Val	ACT Thr 390	GAA Glu
AGA Arg	GAT Asp 395	GCA Ala	GGA Gly	AAC Asn	TAC Tyr	ACG Thr	GTC Val 400	ATC Ile	CTC Leu	ACC Thr	AAC Asn	CCC Pro 405	ATT Ile	TCA Ser	ATG Met

FIG. 2.1

GAG AAA CAG AGC CAC ATG GTC TCT CTG GTT GTG AAT GTC CCA CCC CAG  
 Glu Lys Gln Ser His Met Val Ser Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln  
 410 415 420

ATC GGT GAG AAA GCC TTG ATC TCG CCT ATG GAT TCC TAC CAG TAT GGC  
 Ile Gly Glu Lys Ala Leu Ile Ser Pro Met Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly  
 425 430 435 440

ACC ATG CAG ACA TTG ACA TGC ACA GTC TAC GCC AAC CCT CCC CTG CAC  
 Thr Met Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Asn Pro Pro Leu His  
 445 450 455

CAC ATC CAG TGG TAC TGG CAG CTA GAA GAA GCC TGC TCC TAC AGA CCC  
 His Ile Gln Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Ala Cys Ser Tyr Arg Pro  
 460 465 470

GGC CAA ACA AGC CCG TAT GCT TGT AAA GAA TGG AGA CAC GTG GAG GAT  
 Gly Gln Thr Ser Pro Tyr Ala Cys Lys Glu Trp Arg His Val Glu Asp  
 475 480 485

TTC CAG GGG GGA AAC AAG ATC GAA GTC ACC AAA AAC CAA TAT GCC CTG  
 Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val Thr Lys Asn Gln Tyr Ala Leu  
 490 495 500

ATT GAA GGA AAA AAC AAA ACT GTA AGT ACG CTG GTC ATC CAA GCT GCC  
 Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala  
 505 510 515 520

AAC GTG TCA GCG TTG TAC AAA TGT GAA GCC ATC AAC AAA GCG GGA CGA  
 Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu Ala Ile Asn Lys Ala Gly Arg  
 525 530 535

GGA GAG AGG GTC ATC TCC TTC CAT GTG ATC AGG GGT CCT GAA ATT ACT  
 Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val Ile Arg Gly Pro Glu Ile Thr  
 540 545 550

GTG CAA CCT GCT GCC CAG CCA ACT GAG CAG GAG AGT GTG TCC CTG TTG  
 Val Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Leu  
 555 560 565

TGC ACT GCA GAC AGA AAT ACG TTT GAG AAC CTC ACG TGG TAC AAG CTT  
 Cys Thr Ala Asp Arg Asn Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu  
 570 575 580

GGC TCA CAG GCA ACA TCG GTC CAC ATG GGC GAA TCA CTC ACA CCA GTT  
 Gly Ser Gln Ala Thr Ser Val His Met Gly Glu Ser Leu Thr Pro Val  
 585 590 595 600

TGC AAG AAC TTG GAT GCT CTT TGG AAA CTG AAT GGC ACC ATG TTT TCT  
 Cys Lys Asn Leu Asp Ala Leu Trp Lys Leu Asn Gly Thr Met Phe Ser  
 605 610 615

AAC AGC ACA AAT GAC ATC TTG ATT GTG GCA TTT CAG AAT GCC TCT CTG  
 Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Val Ala Phe Gln Asn Ala Ser Leu  
 620 625 630

FIG. 2.1

CAG GAC CAA GGC GAC TAT GTT TGC TCT GCT CAA GAT AAG AAG ACC AA  
 Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Ser Ala Gln Asp Lys Lys Thr Ly  
 635 640 645

AAA AGA CAT TGC CTG GTC AAA CAG CTC ATC ATC CTA GAG CGC ATG GC  
 Lys Arg His Cys Leu Val Lys Gln Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Ala  
 650 655 660

CCC ATG ATC ACC GGA AAT CTG GAG AAT CAG ACA ACA ACC ATT GGC GAG  
 Pro Met Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn Gln Thr Thr Thr Ile Gly Glu  
 665 670 675 680

ACC ATT GAA GTG ACT TGC CCA GCA TCT GGA AAT CCT ACC CCA CAC ATT  
 Thr Ile Glu Val Thr Cys Pro Ala Ser Gly Asn Pro Thr Pro His Ile  
 685 690 695

ACA TGG TTC AAA GAC AAC GAG ACC CTG GTA GAA GAT TCA GGC ATT GTA  
 Thr Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val  
 700 705 710

CTG AGA GAT GGG AAC CGG AAC CTG ACT ATC CGC AGG GTG AGG AAG GAG  
 Leu Arg Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu  
 715 720 725

GAT GGA GGC CTC TAC ACC TGC CAG GCC TGC AAT GTC CTT GGC TGT GCA  
 Asp Gly Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Asn Val Leu Gly Cys Ala  
 730 735 740

AGA GCG GAG ACG CTC TTC ATA ATA GAA GGT GCC CAG GAA AAG ACC AAC  
 Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn  
 745 750 755 760

TTG GAA GTC ATT ATC CTC GTC GGC ACT GCA GTG ATT GCC ATG TTC TTC  
 Leu Glu Val Ile Ile Leu Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe  
 765 770 775

TGG CTC CTT CTT GTC ATT CTC GTA CGG ACC GTT AAG CGG GCC AAT GAA  
 Trp Leu Leu Leu Val Ile Leu Val Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Glu  
 780 785 790

GGG GAA CTG AAG ACA GGC TAC TTG TCT ATT GTC ATG GAT CCA GAT GAA  
 Gly Glu Leu Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu  
 795 800 805

TTG CCC TTG GAT GAG CGC TGT GAA CGC TTG CCT TAT GAT GCC AGC AAG  
 Leu Pro Leu Asp Glu Arg Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys  
 810 815 820

TGG GAA TTC CCC AGG GAC CGG CTG AAA CTA GGA AAA CCT CTT GGC CGC  
 Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg  
 825 830 835 840

GGT GCC TTC GGC CAA GTG ATT GAG GCA GAC GCT TTT GGA ATT GAC AAG  
 Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys  
 845 850 855

FIG. 2.2

ACA GCG ACT TGC AAA ACA GTA GCC GTC AAG ATG TTG AAA GAA GGA GCA  
 Thr Ala Thr Cys Lys Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala  
 860 865 870

ACA CAC AGC GAG CAT CGA GCC CTC ATG TCT GAA CTC AAG ATC CTC ATC  
 Thr His Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile  
 875 880 885

CAC ATT GGT CAC CAT CTC AAT GTG GTG AAC CTC CTA GGC GCC TGC ACC  
 His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr  
 890 895 900

AAG CCG GGA GGG CCT CTC ATG GTG ATT GTG GAA TTC TCG AAG TTT GGA  
 Lys Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Phe Ser Lys Phe Gly  
 905 910 915 920

AAC CTA TCA ACT TAC TTA CGG GGC AAG AGA AAT GAA TTT GTT CCC TAT  
 Asn Leu Ser Thr Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr  
 925 930 935

AAG AGC AAA GGG GCA CGC TTC CGC CAG GGC AAG GAC TAC GTT GGG GAG  
 Lys Ser Lys Gly Ala Arg Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Glu  
 940 945 950

CTC TCC GTG GAT CTG AAA AGA CGC TTG GAC AGC ATC ACC AGC AGC CAG  
 Leu Ser Val Asp Leu Lys Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln  
 955 960 965

AGC TCT GCC AGC TCA GGC TTT GTT GAG GAG AAA TCG CTC AGT GAT GTA  
 Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val  
 970 975 980

GAG GAA GAA GAA GCT TCT GAA GAA CTG TAC AAG GAC TTC CTG ACC TTG  
 Glu Glu Glu Glu Ala Ser Glu Glu Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu  
 985 990 995 1000

GAG CAT CTC ATC TGT TAC AGC TTC CAA GTG GCT AAG GGC ATG GAG TTC  
 Glu His Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe  
 1005 1010 1015

TTG GCA TCA AGG AAG TGT ATC CAC AGG GAC CTG GCA GCA CGA AAC ATT  
 Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile  
 1020 1025 1030

CTC CTA TCG GAG AAG AAT GTG GTT AAG ATC TGT GAC TTC GGC TTG GCC  
 Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala  
 1035 1040 1045

CGG GAC ATT TAT AAA GAC CCG GAT TAT GTC AGA AAA GGA GAT GCC CGA  
 Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg  
 1050 1055 1060

CTC CCT TTG AAG TGG ATG GCC CCG GAA ACC ATT TTT GAC AGA GTA TAC  
 Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr  
 1065 1070 1075 1080

FIG. 2.2

ACA ATT CAG AGC GAT GTG TGG TCT TTC GGT GTG TTC CTC TGG GAA ATA  
 Thr Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
 1085 1090 1095

TTT TCC TTA GGT GCC TCC CCA TAC CCT GGG GTC AAG ATT GAT GAA GAA  
 Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu  
 1100 1105 1110

TTT TGT AGG AGA TTG AAA GAA GGA ACT AGA ATG CGG GCT CCT GAC TAC  
 Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr  
 1115 1120 1125

ACT ACC CCA GAA ATG TAC CAG ACC ATG CTG GAC TGC TGG CAT GAG GAC  
 Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Glu Asp  
 1130 1135 1140

CCC AAC CAG AGA CCC TCG TTT TCA GAG TTG GTG GAG CAT TTG GGA AAC  
 Pro Asn Gln Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn  
 1145 1150 1155 1160

CTC CTG CAA GCA AAT GCG CAG CAG GAT GGC AAA GAC TAT ATT GTT CTT  
 Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu  
 1165 1170 1175

CCA ATG TCA GAG ACA CTG AGC ATG GAA GAG GAT TCT GGA CTC TCC CTG  
 Pro Met Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu  
 1180 1185 1190

CCT ACC TCA CCT GTT TCC TGT ATG GAG GAA GAG GAA GTG TGC GAC CCC  
 Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro  
 1195 1200 1205

AAA TTC CAT TAT GAC AAC ACA GCA GGA ATC AGT CAT TAT CTC CAG AAC  
 Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala Gly Ile Ser His Tyr Leu Gln Asn  
 1210 1215 1220

AGT AAG CGA AAG AGC CGG CCA GTG AGT GTA AAA ACA TTT GAA GAT ATC  
 Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile  
 1225 1230 1235 1240

CCA TTG GAG GAA CCA GAA GTA AAA GTG ATC CCA GAT GAC AGC CAG ACA  
 Pro Leu Glu Glu Pro Glu Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Ser Gln Thr  
 1245 1250 1255

GAC AGT GGG ATG GTC CTT GCA TCA GAA GAG CTG AAA ACT CTG GAA GAC  
 Asp Ser Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp  
 1260 1265 1270

AGG AAC AAA TTA TCT CCA TCT TTT GGT GGA ATG ATG CCC AGT AAA AGC  
 Arg Asn Lys Leu Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Met Pro Ser Lys Ser  
 1275 1280 1285

AGG GAG TCT GTG GCC TCG GAA GGC TCC AAC CAG ACC AGT GGC TAC CAG  
 Arg Glu Ser Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln  
 1290 1295 1300



FIG. 2.3

TCT GGG TAT CAC TCA GAT GAC ACA GAC ACC ACC GTG TAC TCC AGC GAC  
 Ser Gly Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Asp  
 1305 1310 1315 1320

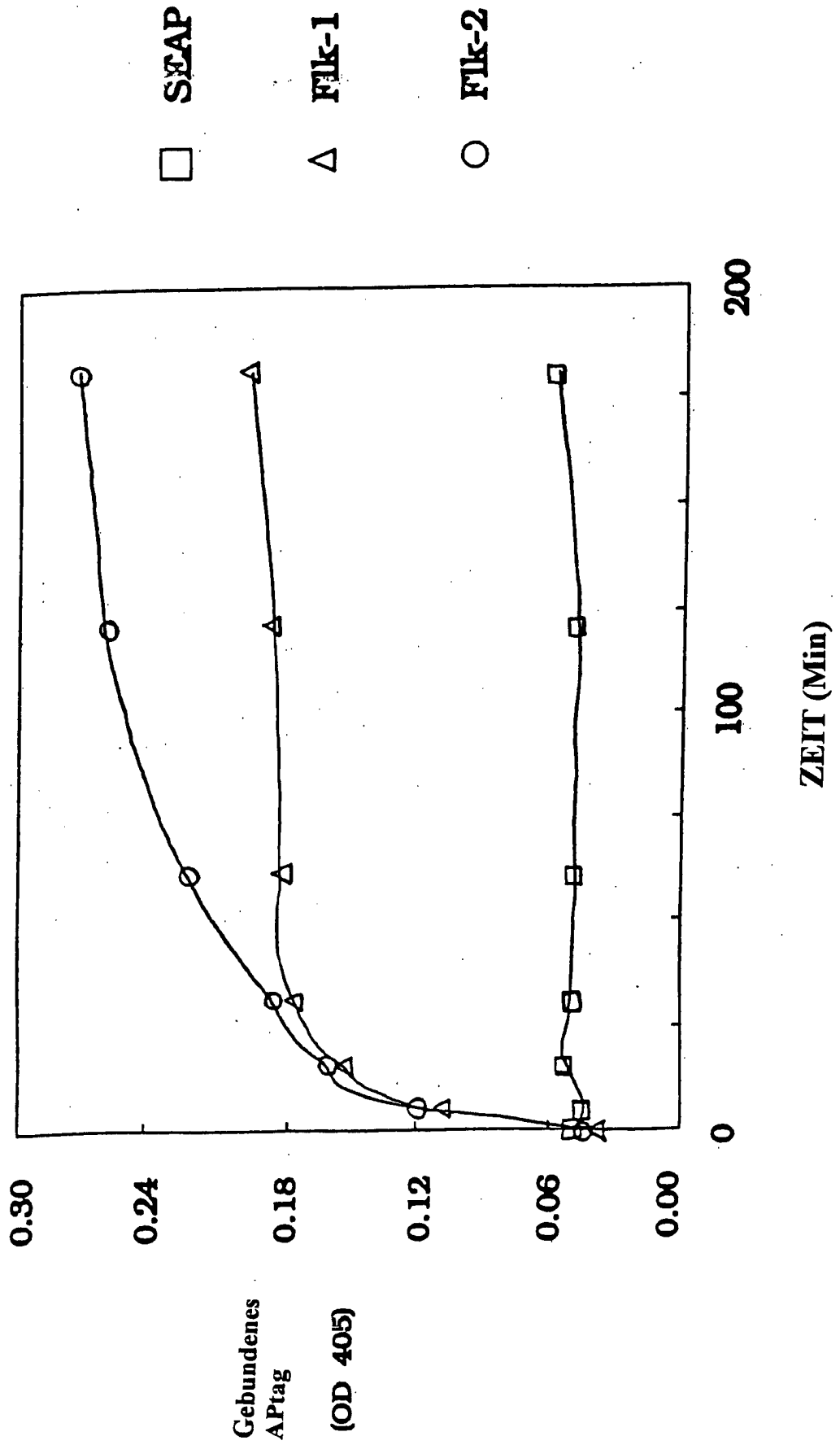
GAG GCA GGA CTT TTA AAG ATG GTG GAT GCT GCA GTT CAC GCT GAC TCA  
 Glu Ala Gly Leu Leu Lys Met Val Asp Ala Ala Val His Ala Asp Ser  
 1325 1330 1335

GGG ACC ACA CTG CAG CTC ACC TCC TGT TTA AAT GGA AGT GGT CCT GTC  
 Gly Thr Thr Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gly Ser Gly Pro Val  
 1340 1345 1350

CCG GCT CCG CCC CCA ACT CCT GGA AAT CAC GAG AGA GGT GCT GCT TAG  
 Pro Ala Pro Pro Pro Thr Pro Gly Asn His Glu Arg Gly Ala Ala  
 1355 1360 1365

ATTTTCAAGT GTTGTCTTT CCACCACCCG GAAGTAGCCA CATTGATTT TCATTTTGTG  
 AGGAGGGACC TCAGACTGCA AGGAGCTTGT CCTCAGGGCA TTTCCAGAGA AGATGCCCA  
 GACCCAAGAA TGTGTTGACT CTA CTCTCTT TTCCATTCAT TTAAAAGTCC TATATAATG  
 GCCCTGCTGT GGTCTCACTA CCAGTTAAAG CAAAAGACTT TCAAACACGT GGACTCTGT  
 CTCCAAGAAG TGGCAACGGC ACCTCTGTGA AACTGGATCG AATGGGCAAT GCTTTGTGT  
 TTGAGGATGG GTGAGATGTC CCAGGGCCGA GTCTGTCTAC CTTGGAGGCT TTGTGGAGGA  
 TGCGGCTATG AGCCAAGTGT TAAGTGTGGG ATGTGGACTG GGAGGAAGGA AGGCGCAAGC  
 CGTCCGGAGA GCGGTTGGAG CCTGCAGATG CATTGTGCTG GCTCTGGTGG AGGTGGGCTT  
 GTGGCCTGTC AGGAAACGCA AAGGCGGCCG GCAGGGTTTG GTTTTGGAAG GTTTGCCTGC  
 TCTTCACAGT CGGGTTACAG GCGAGTTCCC TGTGGCGTTT CCTACTCCTA ATGAGAGTTC  
 CTTCCGGACT CTTACGTGTC TCCTGGCCTG GCCCCAGGAA GGAAATGATG CAGCTTGCTC  
 CTTCTCATC TCTCAGGCTG TGCCTTAATT CAGAACACCA AAAGAGAGGA ACGTCGGCAG  
 AGGCTCCTGA CGGGGCCGAA GAATTGTGAG AACAGAACAG AAATCAGGG TTTCTGCTGG  
 GTGGAGACCC ACGTGGCGCC CTGGTGGCAG GTCTGAGGGT TCTCTGTCAA GTGGCGGTAA  
 AGGCTCAGGC TGGTGTCTT CCTCTATCTC CACTCCTGTC AGGCCCCCAA GTCCTCAGTA  
 TTTTAGCTTT GTGGCTTCCT GATGGCAGAA AAATCTTAAT TGGTTGGTTT GCTCTCCAGA  
 TAATCACTAG CCAGATTTTCG AAATTAATTT TTAGCCGAGG TTATGATAAC ATCTACTGTA  
 TCCTTTAGAA TTTTAACCTA TAAACTATG TCTACTGGTT TCTGCCTGTG TGCTTATGTT  
 AAAAAAAAAA AAAAA

FIGUR 3



FIGUR 4

