



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 20 712 T2 2007.07.19

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 309 703 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 20 712.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA01/01141

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 966 837.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/014485

(86) PCT-Anmeldetag: 10.08.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 21.02.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.05.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 14.06.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 19.07.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

224853 P 11.08.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, CA

(72) Erfinder:

YOUSEF, George M., Toronto, Ontario M5T 1B3,
CA; DIAMANDIS, Eleftherios P., Toronto, Ontario
M5G 2K2, CA

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden

(54) Bezeichnung: KALLIKREIN GEN

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 eingeleitet, 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 Erfindung bezieht sich auf Nukleinsäuremoleküle, durch solche Nukleinsäuremoleküle codierte Proteine und die Verwendung der Proteine und Nukleinsäuremoleküle.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Kallikreine sind eine Gruppe von Serinproteasen, welche in verschiedenen Geweben und biologischen Flüssigkeiten gefunden werden. Der Begriff „Kallikrein“ wurde als erstes durch Werle und Kollegen eingeführt, die hohe Mengen ihrer ursprünglichen Isolate im Pankreas (auf griechisch der „Kallikreas“) fanden (1, 2). Kallikreine werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, das Plasmakallikrein, welches ein einzelnes Gen ist (3), und die Gewebekallikreine, welche in Nagern durch eine große Multigenfamilie codiert werden (4, 5). Bis vor kurzem dachte man, daß die humane Kallikrein-Genfamilie aus nur drei Mitgliedern besteht (6). Es wurden jedoch 11 neue Mitglieder der Kallikrein-Genfamilie identifiziert (7–18). Der Fortschritt in diesem Untersuchungsgebiet wurde kürzlich besprochen (7).

[0003] Prostataspezifisches Antigen (PSA), derzeit der geeignetste Tumormarker für die Diagnose und Überwachung von Prostatakrebs, ist ein Mitglied der humanen Kallikrein-Genfamilie von Serinproteasen (19, 20). Zusätzlich zu PSA wurde humanes glanduläres Kallikrein 2 (hK2, codiert durch das KLK2-Gen) als ein zusätzlicher diagnostischer Marker für Prostatakrebs vorgeschlagen (21, 22). Überdies sich ansammelnde Hinweise, daß andere Mitglieder der ausgedehnten Kallikrein-Genfamilie mit Malignität zusammenhängen können (7). Das normale epitheliale zellspezifische Gen 1 (NES1) (KLK10 gemäß der anerkannten Gen-Nomenklatur für Kallikrein in humanem Gewebe) wurde als neuer Tumorsuppressor erkannt, welcher während des Voranschreitens von Brustkrebs herunterreguliert ist (23). Es wurde entdeckt, daß andere Genfamilienmitglieder einschließlich Zyme (KLK6), Neuropsin (KLK8) und humanes Stratum corneum chymotryptisches Enzym (HSC-CE; KLK7) auch bei bestimmten Arten von Malignitäten differenziell exprimiert werden (24–26).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben ein Nukleinsäuremolekül identifiziert, das ein neues Kallikrein codiert. Das Nukleinsäuremolekül befindet sich auf Chromosom 19q13.3–q13.4 und ist zwischen den klk1- und klk3-Genen lokalisiert. Das neue „klk15“ genannte Nukleinsäuremolekül hat drei verschiedene Spleißformen und wird hauptsächlich in der Schilddrüse und in geringerem Ausmaß in der Prostata, Speicheldrüse und Nebenniere, Dickdarm, Hoden und Niere exprimiert. Die Expression der Nukleinsäure ist im Prostatakrebs heraufreguliert und ist in der LNCaP-Prostatakrebs-Zelllinie durch Steroidhormone reguliert. Eine höhere Expression von klk15 wird mit aggressiveren Prostatatumoren (höheres Stadium und höherer Grad) in Verbindung gebracht.

[0005] Das neue hierin beschriebene Kallikrein-Protein wird als „Kallikrein 15“, „KLK15“ oder „KLK15-Protein“ bezeichnet. Das Gen, welches das Protein codiert, wird als „klk15“ bezeichnet.

[0006] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein isoliertes Protein, das aus einer Aminosäuresequenz von SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 oder 9 besteht.

[0007] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, welches ein solches Protein codiert oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül mit wenigstens 80%, 85%, 90%, 95% oder 99% Identität dazu.

[0008] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein isoliertes Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleinsäuresequenz von SEQ. ID. NO. 1, 2, 3, 4 oder 5, wobei T auch U sein kann, oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül mit wenigstens 80%, 85%, 90%, 95% oder 99% Identität dazu.

[0009] Die Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung können in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt werden, d.h. ein Vektor, der die notwendigen Bestandteile für die Transkription und Translation der eingebrachten codierenden Sequenz verfügt. Dementsprechend können rekombinante Expressionsvektoren, die für die Transformation einer Wirtszelle angepaßt sind, konstruiert werden, welche ein Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung und ein oder mehrere mit dem Nukleinsäuremolekül verbundene Transkriptions- und Translati-

onselemente enthält.

[0010] Der rekombinante Expressionsvektor kann zur Herstellung transformierter Wirtszellen, die das KLK15-Protein exprimieren, verwendet werden. Daher stellt die Erfindung weiter Wirtszellen zur Verfügung, die ein rekombinantes Molekùl gemäß der Erfindung enthalten. Die Erfindung zieht auch transgene, nicht humane Säugetiere in Erwàgung, deren Keimzellen und Körperzellen ein rekombinantes Molekùl enthalten, das ein Nukleinsäuremolekùl nach der Erfindung, insbesondere ein solches, das ein Analoges des KLK15-Proteins oder eine verkürzte Form des KLK15-Proteins codiert, umfaßt.

[0011] Die Erfindung stellt weiter ein Verfahren zur Herstellung von KLK15-Proteinen zur Verfügung, wobei die gereinigten und isolierten Nukleinsäuremolekùle nach der Erfindung verwendet werden. In einer Ausführungsform wird ein Verfahren zur Herstellung eines KLK15-Proteins zur Verfügung gestellt, welches folgendes umfaßt: (a) Überführen eines rekombinanten Expressionsvektors nach der Erfindung in eine Wirtszelle, (b) Selektieren transformierter Wirtszellen gegenüber nicht transformierten Wirtszellen, (c) Kultivieren einer selektierten transformierten Wirtszellen unter Bedingungen, die eine Expression des KLK15-Proteins gestatten und (d) Isolieren des KLK15-Proteins.

[0012] Die KLK15-Proteine nach der Erfindung können zur Herstellung von Fusionsproteinen mit anderen Molekùlen, wie Proteinen, konjugiert werden. Dies kann z. B. durch die Synthese von N-terminalen oder C-terminalen Fusionsproteinen erreicht werden.

[0013] Weiter zieht die Erfindung spezifisch an ein KLK15-Protein nach der Erfindung bindende Antikörper in Erwàgung. Antikörper können mit detektierbaren Substanzen markiert werden und zum Detektieren von Proteinen nach der Erfindung in Geweben und Zellen verwendet werden. Antikörper können eine besondere Verwendung insbesondere bei therapeutischen Anwendungen haben, z. B. zur Reaktion mit Tumorzellen und in Konjugaten und Immunotoxinen als zielselektiver Träger von zahlreichen Mitteln mit Antitumoreffekten, einschließlich chemotherapeutischen Arzneimitteln, Toxinen, die Immunantwort modifizierenden Mitteln, Enzymen und Radioisotopen.

[0014] Die Erfindung gestattet auch die Konstruktion von Nukleotidsonden, die für die Nukleinsäuremolekùle nach der Erfindung und/oder Proteine nach der Erfindung einzigartig sind. Daher bezieht sich die Erfindung auch auf eine Sonde, die eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung umfaßt oder eine Nukleinsäuresequenz, die ein Protein nach der Erfindung oder einen Teil davon codiert. Die Sonde kann z. B. mit detektierbaren Substanzen markiert werden und zur Selektion eines Nukleinsäuremolekùls nach der Erfindung aus einer Mischung von Nukleotidsequenzen verwendet werden, einschließlich Nukleinsäuremolekùlen, die für ein Protein codieren, das ein oder mehrere Eigenschaften der Proteine nach der Erfindung aufweist. Eine Sonde kann zum Markieren von Tumoren verwendet werden.

[0015] Die Erfindung stellt auch ein Antisense-Nukleinsäuremolekùl zur Verfügung, z. B. durch Herstellung eines mRNA- oder DNA-Strangs in umgekehrter Orientierung zu einem Sense-Molekùl. Ein Antisense-Nukleinsäuremolekùl kann zur Unterdrückung des Wachstums von KLK15-exprimierenden (z. B. kanzerogenen) Zellen verwendet werden.

[0016] Die Erfindung stellt weiter noch ein Verfahren zum Identifizieren einer Substanz, die an ein Protein nach der Erfindung bindet, zur Verfügung, welches folgendes umfaßt: Umsetzen des Proteins mit wenigstens einer Substanz, die möglicherweise an das Protein bindet, unter Bedingungen, die die Bildung eines Komplexes zwischen der Substanz und dem Protein gestatten, und Detektieren der Bindung. Die Bindung kann durch Untersuchen auf Komplexe, freie Substanz oder nicht komplexiertes Protein detektiert werden. Die Erfindung zieht auch ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen in Erwàgung, die an andere intrazelluläre Proteine binden, die mit einem KLK15-Protein wechselwirken. Es können auch Verfahren verwendet werden, die Verbindungen identifizieren, die an regulatorische Sequenzen der KLK15-Gene binden (z. B. Promotorsequenzen).

[0017] Die Erfindung stellt weiter noch ein Verfahren zur Bewertung einer Verbindung nach ihrer Fähigkeit, die biologische Aktivität eines KLK15-Proteins nach der Erfindung zu modulieren. Z. B. kann eine Substanz bewertet werden, die die Interaktion des Proteins und einer Substanz, die an das Protein bindet, hemmt oder verstärkt. In einer Ausführungsform umfaßt das Verfahren: Bereitstellen einer bekannten Konzentration eines KLK15-Proteins mit einer Substanz, welche an das Protein bindet, und einer Testverbindung, unter Bedingungen, die die Bildung von Komplexen zwischen der Substanz und dem Protein gestatten, und Entfernen und/oder Detektieren von Komplexen.

[0018] Verbindungen, die die biologische Aktivität eines Proteins nach der Erfindung modulieren, können auch unter Verwendung von Verfahren nach der Erfindung durch Vergleichen von Expressionsmustern und -niveaus des Proteins nach der Erfindung in Geweben und Zellen in der Gegenwart und der Abwesenheit der Verbindungen identifiziert werden.

[0019] Die Proteine nach der Erfindung, Antikörper, Antisense-Nukleinsäuremoleküle und Substanzen und Verbindungen, die unter Verwendung von Verfahren nach der Erfindung identifiziert werden, und Peptide nach der Erfindung können zum Modulieren der biologischen Aktivität eines KLK15-Proteins nach der Erfindung verwendet werden und sie können bei der Behandlung von Zuständen, wie Krebs (insbesondere Prostata-, Dickdarm-, Nieren- und Hodenkrebs) und Schilddrüsenerkrankungen, in einem Subjekt verwendet werden. Dementsprechend können die Substanzen und Verbindungen in Zusammensetzungen zur Verabreichung an Individuen, die an Krankheiten wie Krebs (insbesondere Prostata-, Dickdarm-, Nieren- und Hodenkrebs) und Schilddrüsenerkrankungen leiden, formuliert werden. Insbesondere können die Antikörper, Antisense-Nukleinsäuremoleküle, Substanzen und Verbindungen zum Behandeln von Patienten, die ein KLK15-Protein in oder auf ihren Krebszellen haben, verwendet werden.

[0020] Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf eine Zusammensetzung, die ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle oder ein Protein nach der Erfindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, Hilfsstoff oder Streckmittel umfaßt. Es wird auch die Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls oder Proteins nach der Erfindung in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Erkrankung, wie Krebs (insbesondere Prostata-, Schilddrüsen-, Dickdarm-, Nieren- und Hodenkrebs) und Schilddrüsenerkrankungen, in einem Subjekt zur Verfügung gestellt.

[0021] Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung ist die Verwendung eines KLK15-Proteins oder seines codierenden Nukleinsäuremoleküls bei der Herstellung von Impfstoffen zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebs, insbesondere zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebs in Patienten, auf deren Zellen ein KLK15-Protein detektiert wird. Diese Impfstoffpräparate können auch verwendet werden, um Patienten vor Tumoren vor deren Erscheinen zu bewahren.

[0022] Die Erfindung zieht allgemein Impfstoffe zur Stimulation und Verstärkung der Produktion von Antikörpern gegen ein KLK15-Protein in einem Subjekt, dem der Impfstoff verabreicht wird, in Erwägung.

[0023] Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines Proteins nach der Erfindung für die Herstellung eines Impfstoffs zum Stimulieren und Verstärken der Produktion von Antikörpern gegen ein KLK15-Protein in einem Subjekt zur Verfügung. Das Verfahren umfaßt: Verabreichen eines Impfstoffs nach der Erfindung an das Subjekt, in einer Menge, die zum Stimulieren und Verstärken der Produktion von Antikörpern wirksam ist.

[0024] Der Impfstoff kann in Verfahren zur Behandlung, Vorbeugung oder Verlangsamung des Wiederauftretens von Krebs verwendet werden. Das Verfahren umfaßt: Verabreichen eines Impfstoffs nach der Erfindung an das Subjekt, in einer Menge, die für die Behandlung, Vorbeugung oder Verlangsamung des Wiederauftretens von Krebs wirksam ist.

[0025] In anderen Ausführungsformen stellt die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren einer KLK15-Proteinwechselwirkung zur Verfügung, welches folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer Reaktionsgemisches, welches das KLK15-Protein und eine Substanz, die an das KLK15-Protein bindet, oder wenigstens ein Teil von beiden, die miteinander wechselwirken, enthält,
- (b) Inkontaktbringen des Reaktionsgemischs mit einer oder mehreren Testverbindungen,
- (c) Identifizieren von Verbindungen, welche die Wechselwirkung des KLK15-Proteins und der Substanz hemmen.

[0026] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen ist die Reaktionsmischung eine ganze Zelle. In anderen Ausführungsformen ist die Reaktionsmischung ein Zellysat oder eine Zusammenstellung von aufgereinigtem Protein. Das betreffende Verfahren kann unter Verwendung von Bibliotheken von Testverbindungen durchgeführt werden. Solche Mittel können Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, kleine organische Moleküle und Bibliotheken von Naturproduktextrakten, wie die aus Tieren, Pflanzen, Pilzen und/oder Mikroben isolierten, sein. Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zum Durchführen von Arzneimittelentdeckungen zur Verfügung, welches folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen von einem oder mehreren Versuchssystemen zum Identifizieren von Mitteln nach ihrer Fähigkeit, die Wechselwirkung eines KLK15-Proteins und einer Substanz, die an das Protein bindet, zu hemmen oder zu verstärken,

- (b) Durchführen von therapeutischem Profiling an Wirkstoffen, die in Stufe (a) identifiziert wurden, oder an weiteren Analogen davon, auf ihre Wirksamkeit und Toxizität in Tieren, und
- (c) Bestimmen einer Formulierung für eine pharmazeutische Präparation, die ein oder mehrere Mittel enthält, die in Stufe (b) mit einem annehmbaren therapeutischen Profil identifiziert wurden.

[0027] Weitere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung ersichtlich werden. Es sollte jedoch klar sein, daß die detaillierte Beschreibung und die spezifischen Beispiele, die bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angeben, lediglich zur Veranschaulichung aufgeführt werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0028] Die Erfindung wird nun in Bezug auf die Figuren beschrieben, in welchen:

[0029] [Fig. 1](#) die genomische Organisation und partielle genomische Sequenz des KLK15-Gens zeigt. Intronssequenzen sind mit Ausnahme der Spleißverbindungsgebiete nicht gezeigt. Introns sind in Kleinbuchstaben und Exons in Großbuchstaben gezeigt. Die codierenden Nukleotide sind in Fettdruck gezeigt und der 3' nicht translatierte Bereich folgt dem TGA-Stopcodon (eingekreist). Die translatierten Aminosäuren des codierenden Bereichs sind darunter in Einbuchstabenabkürzungen gezeigt. Die Start- und Stopcodons sind eingekreist und die Exon-Intron-Verbindungen sind unterstrichen. Die katalytischen Reste sind eingerahmt. Das putative Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Der genaue Start des ersten codierenden Exons wurde nicht bestimmt.

[0030] [Fig. 2](#) zeigt eine Angleichung der hergeleiteten Aminosäuresequenz von KLK15 mit Mitgliedern der Kallikrein-Multigenfamilie (SEQ. ID. NOs. 25–38). Striche stellen Lücken dar, um die Sequenzen besser miteinander anzugleichen. Die Reste der katalytischen Triade (H, D, S) sind in kursiv dargestellt. Identische Aminosäuren sind in schwarz und ähnliche Reste in grau hervorgehoben. Die 29 unveränderbaren Serinproteasereste sind durch einen (•) unten und die Cysteinreste durch (+) oben in jedem Block gekennzeichnet. Die vorhergesagten Spaltstellen der Signal- und Aktivierungspeptide sind durch Pfeile angezeigt. Der gepunktete Bereich stellt die Sequenz der Schleife des Kallikreins dar. Das Trypsin-ähnliche Spaltmuster, das durch die Anwesenheit des „D“-Restes vorhergesagt wird, ist durch (*) gekennzeichnet. KLK15 hat ein „E“ in dieser Position. Eine einzigartige Sequenz aus acht Aminosäuren, HNEPGTAG (SEQ. ID. NO. 10) befindet sich an den Positionen 148–155 des KLK15-Gens.

[0031] [Fig. 3](#) ist eine Hydrophobizitäts- und Hydrophilizitätsdarstellung des KLK15-Proteins im Vergleich zu dem prostataspezifischen Antigen (PSA). Beachten Sie den hydrophoben Bereich am Aminoende, der die Anwesenheit eines Signalpeptids nahelegt.

[0032] [Fig. 4](#) ist ein Dendrogramm des vorhergesagten phylogenetischen Baums für 15 Kallikreine und einige andere Serinproteasen. Das Neighbor-Joining-Verfahren wurde verwendet, um KLK15 mit anderen Serinproteasen und Mitgliedern der Kallikrein-Genfamilie anzugleichen. Der Baum ordnete die klassischen Kallikreine (hK1, hK2 und PSA) zusammen an und ordnete KLK15 in einer Gruppe mit TLSP und KLK-L3-Genen an. Andere Serinproteasen wurden wie gezeigt in anderen Gruppen angeordnet. KLK stellt Kallikrein dar, KLK-L stellt Kallikrein-ähnlich dar, TLSP stellt Trypsin-ähnliche Serinprotease dar, NES1 stellt normales Epithelialzellen-spezifisches Gen dar, PSA stellt Prostata-spezifisches Antigen dar, hK1 und hK2 stellen jeweils humanes glanduläres Kallikrein 1 und 2 dar und HSCCE stellt humanes Stratum corneum chymotryptisches Enzym dar.

[0033] [Fig. 5](#) ist eine schematisch Darstellung der unterschiedlichen Spleißvarianten des KLK15-Gens. Exons sind durch Einrahmungen dargestellt und Introns durch Verbindungslien. Die Zahlenangaben innerhalb der Einrahmung stellen die Exonlängen in Basenpaaren dar. Die Pfeilspitze deutet auf das gemeinsame Startcodon und Sterne auf die Stopcodonpositionen. Die Länge des vorhergesagten Polypeptidprodukts ist neben jeder Variante in Aminosäuren (AA) angegeben. Das alternative Spleißen und/oder Auslassen von Exons erzeugt eine Rasterverschiebung, welche zu vorzeitigem Abbruch führt.

[0034] [Fig. 6](#) zeigt die relativen Anordnungen der KLK1-, KLK15- und KLK3-Gene auf Chromosom 19g13.3–g13.4. Die überlappenden BAC-Klone sind identifiziert und der überlappende Bereich ist schraffiert. Die Gene sind durch horizontale Pfeile angegeben, die die Richtung der codierenden Sequenz angeben. Die Abstände zwischen den Genen sind in Basenpaaren angegeben. Die Figur ist nicht maßstabsgetreu.

[0035] [Fig. 7](#) zeigt die durch RT-PCR bestimmte Gewebeexpression des KLK15-Gens. KLK15 wird hauptsächlich in der Schilddrüse exprimiert und zu einem geringeren Ausmaß in der Prostata, Speicheldrüse und

Nebenniere, Dickdarm, Hoden und Niere. M = molekularer Gewichtsmarker. Zur Erklärung der mehrfachen PCR-Banden (alternative Spleißformen) siehe das Beispiel. Die PCR wurde mit den Primern KLK15-F2 und KLK15-R1 durchgeführt.

[0036] [Fig. 8](#) zeigt die hormonelle Regulation des KLK15-Gens in der LNCaP-Prostatakrebszelllinie. DHT = Dihydrotestosteron. Steroide wurden mit einer Endkonzentration von 10^{-8} M zugegeben. (–ve) = Negativkontrolle. Aktin wurde als Kontrollgen verwendet.

[0037] [Fig. 9](#) ist ein schematisches Diagramm, das den Vergleich der codierenden Bereiche der 15 Kallikrein-Gene zeigt. Exons sind durch Balken und Introns durch Verbindungslien dargestellt. Die Buchstaben über den Boxen zeigen die relativen Positionen der katalytischen Triade an, von der herausgefunden wurde, daß sie in allen Genen konserviert ist; H bezeichnet Histidin, D Asparaginsäure und S Serin. Die römischen Zahlen geben Intronphasen an. Die Intronphase bezieht sich auf die Anordnung des Introns innerhalb des Codons; I kennzeichnet, daß das Intron nach dem ersten Nukleotid des Codons erscheint, II das Intron erscheint nach dem zweiten Nukleotid, 0 das Intron erscheint zwischen Codons. Die Intronphasen sind in allen Genen konserviert. Die Zahlen innerhalb der Einrahmungen geben Exonlängen in Basenpaaren an. Namen innerhalb der Klammern stellen die offizielle Nomenklatur dar, die vom Nomenklatur-Komitee für humane Gene anerkannt ist. Nicht translatierte 3'- und 5'-Bereiche und 5' nicht translatierte Exons sind nicht gezeigt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0038] Erfindungsgemäß können gewöhnliche molekularbiologische, mikrobiologische und rekombinante DNA-Techniken nach dem Stand der Technik angewendet werden. Solche Techniken sind ausführlich in der Literatur beschrieben. Siehe z. B. Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, zweite Ausgabe (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., DNA Cloning: A Practical Approach, Bände I und II (D. N. Glover Hrsg. 1985), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait Hrsg. 1984), Nucleic Acid Hybridization B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. (1985), Transcription and Translation B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. (1984), Animal Cell Culture R. I. Freshney Hrsg. (1986), Immobilized Cells and Enzymes IRL Press, (1986), und B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

1. Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung

[0039] Wie oben erwähnt, stellt die Erfindung ein isoliertes Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz, die ein KLK15-Protein codiert, zur Verfügung. Der Begriff „isoliert“ bezieht sich auf eine Nukleinsäure, die im wesentlichen frei von zellulärem Material oder Kulturmedium ist, wenn sie durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt ist, oder von chemischen Ausgangsverbindungen oder anderen Chemikalien, wenn sie chemisch synthetisiert ist. Eine „isolierte“ Nukleinsäure kann auch frei von Sequenzen sein, die die Nukleinsäure natürgemäß flankieren (d.h. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden des Nukleinsäuremoleküls befinden), von welcher die Nukleinsäure erhalten wurde. Der Begriff „Nukleinsäure“ soll DNA und RNA einschließen und kann entweder doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Die Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung codieren ein Protein, das aus einer Aminosäuresequenz von SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 oder 9 besteht. Bevorzugt umfassen die Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung eine Nukleinsäuresequenz einer oder mehrerer von SEQ. ID. NO. 1 bis 5.

[0040] Die Erfindung schließt Nukleinsäuresequenzen ein, die komplementär zu einer Nukleinsäure sind, die ein Protein codieren, welches aus einer Aminosäuresequenz von SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 oder 9 besteht, bevorzugt die Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zu einer gesamten Nukleinsäuresequenz einer oder mehrerer von SEQ. ID. NO. 1 bis 5 sind.

[0041] Die Erfindung schließt Nukleinsäuremoleküle ein, die wesentliche Sequenzidentität oder Homologie zu Nukleinsäuresequenzen nach der Erfindung haben oder Proteine codieren, die wesentliche Identität oder Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz von SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 oder 9 haben. Bevorzugt haben die Nukleinsäuren wesentliche Sequenzidentität, z. B. wenigstens 80% oder 85% Nukleinsäureidentität, mehr bevorzugt 90% Nukleinsäureidentität und am meisten bevorzugt wenigstens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% Sequenzidentität. „Identität“, wie im Fachgebiet bekannt und hierin benutzt, ist ein Verhältnis zwischen zwei oder mehreren Aminosäuresequenzen oder zwei oder mehreren Nukleinsäuresequenzen, das durch Vergleichen der Sequenzen bestimmt wird. Sie bezieht sich auch auf den Grad der Sequenzverwandtschaft zwischen Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen, je nachdem, der durch Übereinstimmen kurzer Folgen solcher Sequenzen bestimmt wird. Identität und Ähnlichkeit sind gut bekannte Begriffe für den Fachmann und können durch herkömmliche Verfahren berechnet werden (z. B. siehe Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. Hrsg., Oxford University

Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. Hrsg., Academic Press, New York, 1993, Computer Analysis of Sequence Data, Teil I, Griffin A. M. und Griffin, H. G. Hrsg., Humana Press, New Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 und Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. und Devereux, J. Hrsg. M. Stockton Press, New York, 1991, Carillo, H. und Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 48: 1073, 1988). Verfahren, die so entworfen wurden, daß sie die größte Übereinstimmung zwischen den Sequenzen angeben, sind allgemein bevorzugt. Verfahren zur Bestimmung von Identität und Ähnlichkeit, sind in öffentlich zugänglichen Computerprogrammen codifiziert, einschließlich des GCG-Programmpakets (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387, 1984), BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. F. et al. J. Molec. Biol. 215: 403–410, 1990). Das BLAST X-Programm ist öffentlich erhältlich vom NCBI und anderen Quellen (BLAST Manual, Altschul, S. et al. NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul S. et al. J. Mol. Biol. 215: 403–410, 1990).

[0042] Isolierte Nukleinsäuremoleküle, die ein KLK15-Protein codieren und eine Sequenz aufweisen, welche von der Nukleinsäuresequenz nach der Erfindung aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes abweicht, sind auch im Rahmen der Erfindung. Solche Nukleinsäuren codieren funktionell gleichwertige Proteine (z. B. ein KLK15-Protein), aber weichen in der Sequenz aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes von der Sequenz eines KLK15-Proteins ab. Als ein Beispiel können DNA-Sequenzpolymorphismen innerhalb der Nukleotidsequenz eines KLK15-Proteins zu stillen Mutationen führen, welche die Aminosäuresequenz nicht beeinflussen. Abweichungen in einem oder mehreren Nukleotiden können unter Individuen innerhalb einer Population aufgrund natürlicher allelischer Abweichungen vorliegen. Jede und alle dieser Nukleinsäureabweichungen sind im Rahmen der Erfindung. Es können auch DNA-Sequenzpolymorphismen auftreten, die zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz eines KLK15-Proteins führen. Diese Aminosäurepolymorphismen sind auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0043] Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung, welches DNA umfaßt, kann durch Herstellen einer auf der gesamten oder Teilen einer Nukleinsäuresequenz nach der Erfindung basierenden markierten Nukleinsäuresonde, isoliert werden. Die markierte Nukleinsäuresonde wird zum Durchmustern einer geeigneten DNA-Bibliothek verwendet (z. B. eine cDNA oder eine genomische DNA-Bibliothek). Z. B. kann eine cDNA-Bibliothek verwendet werden, um durch Durchmustern der Bibliothek mit der markierten Sonde eine ein KLK15-Protein codierende cDNA unter Verwendung von Standardtechniken zu isolieren. Alternativ kann eine genomische DNA-Bibliothek in gleicher Weise zum Isolieren eines genetischen Klons, der ein ein KLK15-Protein codierendes Gen umfaßt, durchmustert werden. Nukleinsäuren, die durch Durchmustern einer cDNA oder genetischen DNA-Bibliothek isoliert werden, können durch Standardtechniken sequenziert werden.

[0044] Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung, welches DNA ist, kann auch durch selektives Vervielfältigen einer ein KLK15-Protein codierenden Nukleinsäure unter Verwendung des Polymerasekettenreaktionsverfahrens (PCR) und cDNA oder genetischer DNA isoliert werden. Es ist möglich, synthetische Oligonukleotidprimer aus der Nukleotidsequenz nach der Erfindung zur Verwendung in der PCR zu entwerfen. Eine Nukleinsäure kann aus cDNA oder genetischer DNA unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer und Standard-PCR-Vervielfältigungstechniken vervielfältigt werden. Die so vervielfältigte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. cDNA kann durch Isolieren der gesamten zellulären mRNA mit einer Vielzahl von Techniken, z. B. durch Verwendung des Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahrens von Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294–5299 (1979) aus mRNA hergestellt werden. cDNA wird dann aus der mRNA unter Verwendung von reverser Transkriptase synthetisiert (z. B. Moloney MLV reverse Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD oder AMV reverse Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

[0045] Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung, welches RNA ist, kann durch Klonieren einer ein KLK15-Protein codierenden cDNA in einen geeigneten Vektor, der die Transkription der cDNA zur Herstellung eines ein KLK15-Protein codierenden RNA-Moleküls ermöglicht, isoliert werden. Z. B. kann eine cDNA stromabwärts eines Bakteriophagenpromotors (z. B. ein T7-Promotor) in einen Vektor kloniert werden, cDNA in vitro mit T7-Polymerase transkribiert werden und die sich ergebende RNA durch herkömmliche Techniken isoliert werden.

[0046] Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung können unter Verwendung von Standardtechniken chemisch synthetisiert werden. Verfahren zum chemischen Synthetisieren von Polydeoxynukleotiden, einschließlich aber nicht begrenzt auf Festphasensynthese, welche wie die Peptidsynthese in handelsüblichen DNA-Synthesegeräten voll automatisiert wurde, sind bekannt (siehe z. B. Itakura et al. U.S. Patent Nr. 4,598,049, Caruthers et al. U.S. Patent Nr. 4,458,066 und Itakura U.S. Patent Nr. 4,401,796 und 4,373,071).

[0047] Feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül ein KLK15-Protein codiert, kann durch Expression der cDNA in einer geeigneten Wirtszelle mit Standardtechniken und Überprüfen des exprimierten Proteins mit den hierin beschriebenen Verfahren erreicht werden. Eine ein KLK15-Protein codierende cDNA kann durch Standardtechniken, wie Dideoxynukleotid-Kettenabbruch oder chemisches Sequenzieren nach Maxam-Gilbert, zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz und der vorhergesagten Aminosäuresequenz des codierten Proteins sequenziert werden.

[0048] Das Initiationscodon und nicht translatierte Sequenzen eines KLK15-Proteins können durch Verwenden von Computerprogrammen, die für diesen Zweck entwickelt wurden, wie PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Calif.), bestimmt werden. Die Intron-Exon-Struktur und die Transkriptionsregulationssequenzen eines ein KLK15-Protein codierenden Gens können durch die Verwendung eines ein KLK15-Protein codierenden Nukleinsäuremoleküls nach der Erfindung zum Sondieren einer genomischen DNA-Klon-Bibliothek bestätigt werden. Regulatorische Elemente können durch die Verwendung von Standardtechniken identifiziert werden. Die Funktion der Elemente kann durch die Verwendung dieser Elemente zur Expression eines Reportergens, wie das lacZ-Gen, das funktionsfähig mit den Elementen verbunden wird, bestätigt werden. Diese Konstrukte können unter Verwendung herkömmlicher Verfahren in Kulturzellen oder in nicht humane, transgene Tiermodelle eingebracht werden. Zusätzlich zur Identifizierung regulatorischer Elemente in DNA können solche Konstrukte auch zum Identifizieren von Kernproteinen, die mit den Elementen wechselwirken, unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken verwendet werden.

[0049] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren isolierten Nukleinsäuremoleküle mutante KLK15-Genallele. Die mutanten Allele können aus Individuen isoliert werden, von denen bekannt ist oder vermutet wird, daß sie einen Genotyp haben, der zu den Symptomen einer Erkrankung beiträgt, an der ein KLK15-Protein beteiligt ist. Mutante Allele und Produkte aus mutanten Allelen können in den hierin beschriebenen therapeutischen und diagnostischen Verfahren angewendet werden. Z. B. kann eine cDNA eines mutanten KLK15-Gens unter Verwendung von PCR, wie hierin beschrieben, isoliert werden und die DNA-Sequenz des mutanten Allels mit dem normalen Allel zur Bestätigung der für den Verlust oder die Veränderung der Funktion des mutanten Genprodukts verantwortlichen Mutationen verglichen werden. Eine genomische Bibliothek kann auch unter Verwendung von DNA eines Individuums, von dem angenommen wird oder bekannt ist, daß es ein mutantes Allel trägt, hergestellt werden oder eine cDNA-Bibliothek kann aus RNA aus Gewebe, von dem bekannt ist oder angenommen wird, ein mutantes Allel zu exprimieren, hergestellt werden. Eine ein normales KLK15-Gen codierende Nukleinsäure oder irgendein geeignetes Fragment davon kann dann markiert und als Sonde zum Identifizieren der korrespondierenden mutanten Allele in solchen Bibliotheken verwendet werden. Klone, die mutante Sequenzen enthalten, können aufgereinigt und einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Zusätzlich kann eine Expressionsbibliothek unter Verwendung von cDNA aus RNA, die aus einem Gewebe eines Individuums isoliert wurde, von dem die Expression eines mutanten KLK15-Allels bekannt ist oder angenommen wird, hergestellt werden. Durch das mutmaßlich mutante Gewebe hergestellte Genprodukte, können, z. B. unter Verwendung von KLK15-proteinspezifischen Antikörpern wie hierin beschrieben, exprimiert und durchmustert werden. Unter Verwendung der Antikörper identifizierte Klone der Bibliothek können aufgereinigt und einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

[0050] Die Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach der Erfindung oder eines Fragments des Moleküls kann relativ zu ihrer normalen Anordnung bei der Transkription zur Herstellung von Antisense-Nukleinsäuremolekülen umgedreht werden. Ein Antisense-Nukleinsäuremolekül kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen unter Verwendung von im Fachgebiet bekannter Vorgehensweisen erstellt werden.

2. Proteine nach der Erfindung

[0051] Eine Aminosäuresequenz eines KLK15-Proteins besteht aus einer Sequenz wie in SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 oder 9 gezeigt. Das Protein wird hauptsächlich in der Schilddrüse exprimiert und geringerem Ausmaß in der Prostata, Speicheldrüse und Nebenniere, Dickdarm, Hoden und Niere.

[0052] Die Erfindung zieht auch Isoformen der Proteine nach der Erfindung in Erwägung. Eine Isoform enthält die gleiche Anzahl und Arten an Aminosäuren wie ein Protein nach der Erfindung, aber die Isoform hat eine andere molekulare Struktur. Isoformen, die von der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen werden, haben bevorzugt die gleichen Eigenschaften wie ein Protein nach der Erfindung, wie hierin beschrieben.

[0053] Die vorliegende Erfindung schließt auch KLK15-Proteine ein, die mit einem ausgewählten Protein oder

Markerprotein (siehe unten) zur Herstellung von Fusionsproteinen konjugiert sind.

[0054] Ein KLK15-Protein nach der Erfindung kann durch Verwendung rekombinanter DNA-Verfahren hergestellt werden. Dementsprechend können die Nukleinsäuremoleküle nach der vorliegenden Erfindung mit einer ein KLK15-Protein nach der Erfindung codierenden Sequenz in bekannter Art in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt werden, der eine gute Expression des Proteins gewährleistet. Mögliche Expressionsvektoren enthalten aber sind nicht beschränkt auf Cosmide, Plasmide oder modifizierte Viren (z. B. replikationsdeffiziente Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierte Viren), soweit der Vektor mit der verwendeten Wirtszelle kompatibel ist.

[0055] Die Erfindung zieht daher einen rekombinanten Expressionsvektor nach der Erfindung in Erwägung, welcher ein Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung und die notwendigen regulatorischen Sequenzen für die Transkription und Translation der eingefügten Proteinsequenz enthält. Geeignete regulatorische Sequenzen können von einer Vielzahl von Quellen, einschließlich bakterieller, Pilz-, viralen, Säuger- oder Insektengenen erhalten werden [siehe z. B. die regulatorischen Sequenzen, die in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)] beschrieben sind. Die Wahl geeigneter regulatorischer Sequenzen hängt von der gewählten Wirtszelle, wie unten diskutiert, ab und kann von einem Fachmann leicht bewältigt werden. Die notwendigen regulatorischen Sequenzen können durch das native KLK15-Protein und/oder dessen flankierende Bereiche bereitgestellt werden.

[0056] Die Erfindung stellt weiter einen rekombinanten Expressionsvektor zur Verfügung, der ein DNA-Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist, umfaßt. D. h., das DNA-Molekül ist derart an eine regulatorische Sequenz gebunden, daß durch Transkription des DNA-Moleküls eine Expression eines RNA-Moleküls ermöglicht wird, das gegensinnig zu der Nukleinsäuresequenz eines Proteins nach der Erfindung oder eines Fragments davon ist. Es können mit der Antisense-Nukleinsäure verbundene regulatorische Sequenzen gewählt werden, die zu einer kontinuierlichen Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zellarten führen, beispielsweise ein viral Promotor und/oder Verstärker, oder es können regulatorische Sequenz gewählt werden, die zu einer Zellart-spezifischen Expression von Antisense-RNA führen.

[0057] Die rekombinanten Expressionsvektoren nach der Erfindung können auch ein Markergen enthalten, das die Selektion von mit einem rekombinanten Molekül nach der Erfindung transformierten oder transfizierten Wirtszellen vereinfacht. Beispiele für Markergene sind Gene, die ein Protein wie G418 und Hygromycin codieren, die eine Resistenz gegen bestimmte Arzneimittel verleihen, β -Galaktosidase, Chloramphenikolacetyltransferase, Leuchtkäferluziferase oder ein Immunglobulin oder ein Teil davon, wie der Fc-Teil eines Immunglobulins, bevorzugt IgG. Die Marker können auf einem von der interessierenden Nukleinsäure getrennten Vektor eingebracht werden.

[0058] Die rekombinanten Expressionsvektoren können auch Gene enthalten, die einen Fusionsanteil codieren, der eine verstärkte Expression des rekombinanten Proteins, bessere Löslichkeit des rekombinanten Proteins und Hilfe bei der Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins durch Fungieren als ein Ligand bei der Affinitätsaufräumung zur Verfügung stellt. Z. B. kann eine proteolytische Spaltstelle zum Ermöglichen der Abtrennung des rekombinanten Proteins von dem Fusionsanteil im Anschluß an die Aufreinigung des Fusionsproteins an das rekombinante Zielprotein angefügt werden. Typische Fusionsexpressionsvektoren enthalten pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australien), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), die jeweils Glutathion-S-transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein oder Protein A mit dem rekombinanten Protein fusionieren.

[0059] Die rekombinanten Expressionsvektoren können zum Herstellen einer transformierten Wirtszelle in Wirtszellen eingebracht werden. „Transformierte Wirtszellen“ umfassen Wirtszellen, die mit einem rekombinanten Expressionsvektor nach der Erfindung transformiert oder transfiziert wurden. Die Begriffe „transformiert mit“, „transfiziert mit“, „Transformation“ und „Transfektion“ umfassen das Einbringen einer Nukleinsäure (z. B. eines Vektors) in eine Zelle durch eine von vielen Standardtechniken. Prokaryotische Zellen können beispielsweise durch Elektroporation oder Calciumchlorid vermittelte Transformation mit einer Nukleinsäure transformiert werden. Eine Nukleinsäure kann in Säugerzellen mittels herkömmlicher Techniken, wie Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Mitfällung, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, Elektroporation oder Mikroinjektion eingebracht werden. Geeignete Methoden zur Transformation und Transfektion von Wirtszellen können in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor LaboratoryPress (1989)) und anderen Laborleitfäden gefunden werden.

[0060] Geeignete Wirtszellen schließen eine große Vielfalt an prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen ein. Z. B. können die Proteine nach der Erfindung in Bakterienzellen wie *E. coli*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus), Hefezellen oder Säugerzellen exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen können in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991) gefunden werden.

[0061] Es kann auch eine Wirtszelle gewählt werden, die die Expression einer eingefügten Nukleinsäuresequenz moduliert oder das Protein in gewünschter Art modifiziert (z. B. Glykosylierung oder Phosphorylierung) und prozessiert (z. B. Spaltungen). Es können Wirtssysteme oder -zelllinien gewählt werden, die spezifische und charakteristische Mechanismen zur posttranslationalen Prozessierung und Modifizierung von Proteinen haben. Z. B. können eukaryotische Wirtszellen einschließlich CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 und WI38 verwendet werden. Für eine langfristige stabile Expression des Proteins mit hoher Ausbeute können Zelllinien und Wirtssysteme, die das Genprodukt stabil exprimieren, konstruiert werden.

[0062] Wirtszellen und insbesondere Zelllinien, die unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren hergestellt wurden, können bei der Durchmusterung und Auswertung von Verbindungen, die die Aktivität eines KLK15-Proteins modulieren, besonders geeignet sein.

[0063] Die Proteine nach der Erfindung können auch in nicht humanen, transgenen Tieren exprimiert werden, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Minischweine, Ziegen, Schafe, Schweine, nicht humane Primaten (z. B. Paviane, Affen und Schimpansen) [siehe Hammer et al. (Nature 315: 680–683, 1985), Palmiter et al. (Science 222: 809–814, 1983), Brinster et al. (Proc Natl. Acad. Sci. USA 82: 44384442, 1985), Palmiter und Brinster (Cell. 41: 343–345, 1985) und U.S. Patent Nr. 4,736,866]. Im Fachgebiet bekannte Verfahren können zum Einbringen eines ein KLK15-Protein codierenden Nukleinsäuremoleküls nach der Erfindung zur Herstellung von Gründerlinien von transgenen Tieren verwendet werden. Solche Verfahren schließen Mikroinjektion in den Vorkern, durch Retroviren vermittelter Gentransfer in Keimlinien, Gen-Targeting in embryonischen Stammzellen, Elektroporation von Embryonen und Sperma-vermittelten Gentransfer ein.

[0064] Die vorliegende Erfindung zieht ein transgenes Tier in Erwägung, das in all seinen Zellen das KLK15-Gen trägt, und Tiere, die das Transgen in einigen, aber nicht allen ihren Zellen tragen. Das Transgen kann als einzelnes Transgen oder in Konkatemerien integriert werden. Das Transgen kann selektiv in spezifische Zellarten eingebracht und aktiviert werden (siehe z. B. Lasko et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6236). Das Transgen kann an der chromosomal Stelle des endogenen Gens durch Gen-Targeting eingefügt werden. Das Transgen kann selektiv in eine spezielle Zellarten eingebracht werden, wobei das endogene Gen in dieser Zellart inaktiviert wird (siehe Gu et al. Science 265: 103–106).

[0065] Die Expression eines rekombinanten KLK15-Proteins in einem transgenen Tier kann unter Verwendung von Standardtechniken untersucht werden. Eine erste Durchmusterung zur Untersuchung, ob das Transgen eingefügt wurde, kann durch Southern Blot-Untersuchung oder PCR-Verfahren durchgeführt werden. Das Niveau der mRNA-Expression in Geweben von transgenen Tieren kann auch durch Verwenden von Techniken einschließlich Northern Blot-Untersuchung von Gewebeproben, in situ-Hybridisierung und RT-PCR ermittelt werden. Gewebe kann auch unter Verwendung von Antikörpern gegen KLK15-Protein immunozytochemisch ausgewertet werden.

[0066] Proteine nach der Erfindung können auch durch chemische Synthese unter Verwendung von in der Proteinchemie wohlbekannter Techniken wie Festphasensynthese (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149–2154) oder Synthese in homogenen Lösungen (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, Hrsg. E. Wansch, Band 15 I und II, Thieme, Stuttgart) hergestellt werden.

[0067] N-terminale oder C-terminale Fusionsproteine, die ein KLK15-Protein nach der Erfindung konjugiert mit anderen Molekülen, wie Proteine, umfassen, können durch Fusionieren des N-Terminus oder C-Terminus eines KLK15-Proteins und der Sequenz eines ausgewählten Proteins oder Markerproteins mit einer gewünschten biologischen Funktion durch rekombinante Techniken hergestellt werden. Die sich ergebenden Fusionsproteine enthalten ein KLK15-Protein, das mit dem ausgewählten Protein oder Markerprotein, wie hierin beschrieben, fusioniert ist. Beispiele für Proteine, die zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden können, umfassen Immunglobuline, Glutathion-S-transferase (GST), Hämaggglutinin (HA) und trunkiertes myc.

3. Antikörper

[0068] KLK15-Proteine nach der Erfindung können zur Herstellung von für die Proteine spezifischen Antikörpern verwendet werden. Es können Antikörper hergestellt werden, die an ein spezifisches Epitop in einem nicht-konservierten Bereich des Proteins binden. Ein nicht-konservierter Bereich eines Proteins ist einer, der keine wesentliche Sequenzhomologie zu anderen Proteinen hat. Ein Bereich aus einem konservierten Bereich, wie eine gut charakterisierte Domäne, kann auch zur Herstellung eines Antikörpers gegen einen konservierten Bereich eines KLK15-Proteins verwendet werden. Antikörper mit Spezifität für ein KLK15-Protein können auch aus Fusionsproteinen, die durch das Exprimieren von Fusionsproteinen in Bakterien, wie hierin beschrieben, geschaffen wurden, gezüchtet werden.

[0069] Die Erfindung kann ganze monoklonale oder polyklonale Antikörper und immunologisch aktive Fragmente (z. B. ein Fab, (Fab)₂-Fragment oder Fab-Fragmente aus einer Expressionsbibliothek und Epitop-bindende Fragmente davon), eine schwere Kette eines Antikörpers und eine leichte Kette eines Antikörpers, ein genetisch konstruiertes einzelkettiges Fv-Molekül (Ladner et al., U.S. Pat. Nr. 4,946,778), humanisierten Antikörper oder einen chimerischen Antikörper, z. B. ein Antikörper, der die Bindungsspezifität eines Mausantikörpers enthält, aber bei dem die verbleibenden Teile menschlichen Ursprungs sind, verwenden. Antikörper einschließlich monoklonaler und polyklonaler Antikörper, Fragmenten und Chimeren können durch dem Fachmann bekannte Verfahren hergestellt werden.

4. Anwendungen der Nukleinsäuremoleküle, KLK15-Proteine und Antikörper nach der Erfindung

[0070] Die Nukleinsäuremoleküle, KLK15-Proteine und Antikörper nach der Erfindung können bei der prognostischen und diagnostischen Bewertung von Erkrankungen, bei denen ein KLK15-Protein beteiligt ist (z. B. Krebs oder Schilddrüsenerkrankungen), und der Identifizierung von Subjekten mit einer Veranlagung für solche Erkrankungen (Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2) verwendet werden.

[0071] Die vorliegende Erfindung stellt ein Testkit zur Diagnose eines Zustandes, der mit einem Protein nach der Erfindung in Verbindung steht, durch Bestimmen der Anwesenheit eines Nukleinsäuremoleküls oder eines Proteins nach der Erfindung zur Verfügung. Das Testkit kann in einem Verfahren zum Detektieren der Expression des Krebsmarkers KLK15 in einem Patienten verwendet werden, welches folgendes umfaßt:

- (a) Nehmen einer von einem Patienten stammenden Probe und
- (b) Detektieren einer KLK15 codierenden Nukleinsäuresequenz oder eines durch eine KLK15-Nukleinsäuresequenz codierten Proteinprodukts in der Probe.

[0072] Die Nukleinsäuremoleküle, KLK15-Proteine und Antikörper nach der Erfindung können in der Diagnose und Stadieneinteilung von Krebs, insbesondere Prostatakrebs, verwendet werden. Erhöhte Niveaus an KLK15-Proteinen werden mit aggressiveren Formen von Prostatakrebs in Verbindung gebracht und können ein Hinweis auf eine schlechte Prognose sein.

[0073] Verfahren zum Detektieren von Nukleinsäuremolekülen und KLK15-Proteinen nach der Erfindung können zum Überwachen von Erkrankungen, an denen ein KLK15-Protein beteiligt ist, durch Detektieren von KLK15-Proteinen und KLK15-Proteine codierenden Nukleinsäuremolekülen verwendet werden. Die Anwendungen der vorliegenden Erfindung schließen auch Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen ein, die die biologische Aktivität von KLK15-Proteinen modulieren (Abschnitt 4.2). Die Verbindungen, Antikörper, etc. können zur Behandlung von Erkrankungen, an denen ein KLK15-Protein beteiligt ist, verwendet werden (Abschnitt 4.3). Für einen Fachmann wäre es auch ersichtlich, daß die hierin beschriebenen Verfahren zum Untersuchen der Expression von KLK15-Proteinen bei der Entwicklung verwendet werden können und demzufolge weitere Kenntnisse bezüglich der Rolle von KLK15-Proteinen zur Verfügung stellen werden.

4.1 Diagnostische Verfahren

[0074] Eine Vielzahl von Verfahren kann zur diagnostischen und prognostischen Bewertung von Erkrankungen, an denen ein KLK15-Protein beteiligt ist, und zur Identifizierung von Subjekten mit einer Veranlagung für solche Erkrankungen verwendet werden. Solche Verfahren können z. B. Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung und Fragmente davon und Antikörper gegen KLK15-Proteine, einschließlich Peptidfragmenten, verwenden. Insbesondere die Nukleinsäuren und Antikörper können verwendet werden, z. B. für: (1) die Detektion des Vorhandenseins von KLK15-Mutationen oder die Detektion von entweder einer Über- oder Unterexpression von KLK15-mRNA im Vergleich zu einem nicht erkrankten Stadium oder die qualitative oder quantitative Detektion von alternativen Spleißformen von KLK15-Transkripten, die mit gewissen Zuständen oder der Emp-

fänglichkeit gegenüber solchen Zuständen zusammentreffen können, und (2) die Detektion von entweder einer zu großen oder einer zu kleinen Menge von KLK15-Proteinen im Vergleich zu einem nicht erkrankten Stadium oder das Vorhandensein eines modifizierten KLK15-Proteins (z. B. weniger als die gesamte Länge), welches mit einem Erkrankungsstadium oder einem Voranschreiten in Richtung eines Erkrankungsstadiums zusammentrifft.

[0075] Die hierin beschriebenen Methoden können zum Bewerten der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von malignen oder prämalignen Zellen, z. B. in einer Gruppe von aus dem Wirt frisch entnommenen Zellen, verwendet werden. Solche Verfahren können zum Detektieren von Tumoren, Quantifizieren ihres Wachstums verwendet werden und helfen bei der Diagnose und Prognose von Krankheiten. Die Verfahren können zum Detektieren des Vorhandenseins von Krebsmetastasen sowie zum Bestätigen der Abwesenheit oder der Entfernung des gesamten Tumorgewebes infolge einer Operation, Chemotherapie bei Krebs und/oder Strahlentherapie verwendet werden. Sie können weiter zum Überwachen einer Chemotherapie bei Krebs und des Wiedererscheinens eines Tumors verwendet werden.

[0076] Die hierin beschriebenen Verfahren können durch Verwendung von zusammengestellten Diagnosekits durchgeführt werden, die wenigstens eine hierin beschriebene spezifische KLK15-Nukleinsäure oder Antikörper enthalten, die herkömmlich eingesetzt werden können, z. B. in klinischen Einrichtungen zur Durchmusterung und Diagnose von Patienten und zur Durchmusterung und Identifizierung der Individuen, die eine Veranlagung zur Entwicklung einer Erkrankung aufweisen.

[0077] Auf Nukleinsäure basierende Techniken sind unten in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Techniken zur Detektion von Peptiden sind unten in Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Die Proben, die unter Verwendung der Verfahren nach der Erfindung analysiert werden können, schließen solche ein, von denen bekannt ist oder angenommen wird, daß sie KLK15 exprimieren oder KLK15-Proteine enthalten. Die Proben können von einem Patienten oder einer Zellkultur stammen und schließen ein aber sind nicht begrenzt auf biologische Flüssigkeiten, Gewebeextrakte, frisch geerntete Zellen und Lysate von Zellen, die in Zellkulturen inkubiert wurden.

[0078] Oligonukleotide oder längere Fragmente, die von irgendeinem der Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung erhalten wurden, können als Ziel in einer Mikroanordnung verwendet werden. Die Mikroanordnung kann zum gleichzeitigen Überwachen der Expressionsniveaus einer großen Anzahl von Genen verwendet werden und zum Identifizieren genetischer Abweichungen, Mutationen und Polymorphismen. Die Information aus der Mikroanordnung kann zur Bestimmung der Genfunktion, zum Verständnis der genetischen Grundlage einer Erkrankung, zur Diagnose einer Erkrankung und zur Entwicklung und Überwachung der Aktivität eines therapeutischen Mittels verwendet werden.

[0079] Die Herstellung, Verwendung und Analyse von Mikroanordnungen sind einem Fachmann wohlbekannt (siehe z. B. Brennan, T. M. et al. (1995) U.S. Pat. Nr. 5,474,796, Schena, et al. 81996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614–10619, Baldeschweiler et al. (1995), PCT Anmeldung WO 95/251116, Shalom, D. et al. (1995) PCT Anmeldung WO 95/355505, Heller, R. A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 2150–2155 und Heller, M. J. et al. (1997) U.S. Pat. Nr. 5,605,662).

4.1.1 Verfahren zum Detektieren von Nukleinsäuremolekülen nach der Erfindung

[0080] Die Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung ermöglichen dem Fachmann, Nukleotidsonden zur Verwendung bei der Detektion von Nukleinsäuresequenzen nach der Erfindung in Proben zu erstellen. Geeignete Sonden schließen Nukleinsäuremoleküle ein, die auf Nukleinsäuresequenzen basieren, die wenigstens 5 aufeinanderfolgende Aminosäuren aus Bereichen des KLK15-Proteins codieren, bevorzugt umfassen sie 15 bis 30 Nukleotide (siehe SEQ. ID. NOs. 47–50). Eine Nukleotidsonde kann mit einer detektierbaren Substanz, wie einer radioaktiven Markierung, die ein geeignetes Signal zur Verfügung stellt und eine ausreichende Halbwertszeit hat, wie ^{32}P , ^{3}H , ^{14}C oder dergleichen, markiert sein. Andere detektierbare Substanzen, welche verwendet werden können, schließen Antigene, die durch einen spezifisch markierten Antikörper erkannt werden, fluoreszierende Verbindungen, Enzyme, für ein markiertes Antigen spezifische Antikörper und lumineszierende Verbindungen ein. Eine geeignete Markierung kann unter Berücksichtigung der Geschwindigkeit der Hybridisierung und der Bindung der Sonde an das zu detektierende Nukleotid und die für die Hybridisierung zur Verfügung stehende Menge an Nukleotid ausgewählt werden. Markierte Sonden können auf festem Untergrund, wie Nitrozellulosefilter oder Nylonmembranen, wie allgemein in Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2. Aufl.) beschrieben, auf Nukleinsäuren hybridisiert werden. Die Nukleinsäuresonden können zum Detektieren von KLK15-Proteine codierenden Gene, bevorzugt in humanen Zellen, verwendet werden. Die Nukleotidsonden können auch bei der Diagnose von Erkrankungen, an denen ein KLK15-Pro-

tein beteiligt ist, beim Überwachen des Voranschreitens solcher Erkrankungen oder Überwachen einer therapeutischen Behandlung geeignet sein.

[0081] Die Sonde kann bei Hybridisierungstechniken zum Detektieren von KLK15-Proteine codierenden Genen verwendet werden. Die Technik umfaßt im allgemeinen das Inkontaktbringen und Inkubieren von Nukleinsäuren (z. B. rekombinanten DNA-Molekülen, klonierten Genen), die von einer Probe von einem Patienten oder einer anderen Zellquelle erhalten wurden, mit einer Sonde nach der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen, die für das spezifische Doppelstrangbilden der Sonden mit komplementären Sequenzen in den Nukleinsäuren günstigen sind. Nach der Inkubation werden die Nukleinsäuren, die keinen Doppelstrang gebildet haben, entfernt und das Vorhandensein von Nukleinsäuren, die an die Sonde hybridisiert wurden, wird sofern vorhanden detektiert.

[0082] Die Detektion von Nukleinsäuremolekülen nach der Erfindung kann die Vervielfältigung von spezifischen Gensequenzen unter Verwendung eines Vervielfältigungsverfahrens, wie PCR, gefolgt von der Analyse der vervielfältigten Moleküle unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Techniken, einbeziehen. Geeignete Primer können durch einen Fachmann routinemäßig erstellt werden.

[0083] Genomische DNA kann bei Hybridisierungs- oder Amplifizierungsuntersuchungen von biologischen Proben zum Detektieren von mit der KLK15-Struktur verbundenen Abnormalitäten, einschließlich Punktmutationen, Insertionen, Deletionen und chromosomal Umordnungen, verwendet werden. Z. B. können direktes Sequenzieren, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Untersuchungen, Heteroduplexuntersuchungen, denaturierende Gradientengelektrophorese, chemische Spaltung von Fehlpaarungen und Oligonukleotidhybridisierung verwendet werden.

[0084] Dem Fachmann bekannte Genotypisierungstechniken können zur Typisierung von Polymorphismen, die in enger Nachbarschaft zu den Mutationen in einem *klk15*-Gen sind, verwendet werden. Die Polymorphismen können zur Identifizierung von Individuen in Familien, die wahrscheinlich eine Mutation tragen, verwendet werden. Sofern ein Polymorphismus ein Kopplungsungleichgewicht mit Mutationen in einem KLK15-Gen aufweist, kann er auch zum Durchmustern von Individuen der allgemeinen Population, die wahrscheinlich Mutationen tragen, verwendet werden. Polymorphismen, die verwendet werden können, schließen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs), Einzelbasenpolymorphismen und einfache Sequenzwiederholungspolymorphismen (SSLPs) ein.

[0085] Eine Sonde nach der Erfindung kann zum direkten Identifizieren von RFLPs verwendet werden. Eine Sonde oder Primer nach der Erfindung kann zusätzlich zur Isolierung genomicscher Klone, wie YACs, BACs, PACs, Cosmiden, Phagen oder Plasmiden verwendet werden. Die DNA in den Klonen kann unter Verwendung von Hybridisierungs- oder Sequenzierungsverfahren auf SSLPs durchmustert werden.

[0086] Die hierin beschriebenen Hybridisierungs- und Vervielfältigungstechniken können zum Untersuchen qualitativer und quantitativer Gesichtspunkte der *klk15*-Expression verwendet werden. Z. B. kann RNA aus einer Zellart oder einem Gewebe, von dem bekannt ist, daß es *klk15* exprimiert, isoliert werden und unter Verwendung der hierin genannten Hybridisierungs- (z. B. Standard-Northern-Untersuchungen) oder PCR-Techniken untersucht werden. Die Techniken können zum Detektieren von Unterschieden in der Größe des Transkripts verwendet werden, die auf normales oder abnormales alternatives Spleißen zurückzuführen sein können. Die Techniken können zum Detektieren quantitativer Unterschiede zwischen den Niveaus der Transkripte mit voller Länge und/oder alternativ gespleißen Transkripte verwendet werden, die in normalen Individuen im Vergleich solchen Individuen, die Symptome einer Erkrankung zeigen, an denen ein KLK15-Protein beteiligt ist, detektiert werden.

[0087] Die Primer und Sonden können in den oben beschriebenen Verfahren *in situ*, d.h. direkt auf Gewebeschnitten (fixiert und/oder gefroren) von aus Biopsien oder Teilentfernungen erhaltenem Patientengewebe, verwendet werden.

4.1.2 Verfahren zum Detektieren von KLK15-Proteinen

[0088] Spezifisch mit einem KLK15-Protein reaktive Antikörper oder Derivate, wie Enzymkonjugate oder markierte Derivate, können zum Detektieren von KLK15-Proteinen in zahlreichen Proben (z. B. biologischen Materialien) verwendet werden. Sie können als diagnostische oder prognostische Reagenzien verwendet werden und sie können zum Detektieren von Abnormitäten im Niveau der KLK15-Proteinexpression oder Abnormitäten in der Struktur und/oder zeitlichen, Gewebe-, zellulären oder subzellulären Lokalisation eines KLK15-Proteins

verwendet werden. Antikörper können auch zur Durchmusterung möglicher therapeutischer Verbindungen in vitro zur Bestimmung Ihrer Auswirkungen auf Erkrankungen, an denen ein KLK15-Protein beteiligt ist, und anderen Zuständen verwendet werden. In vitro-Immununtersuchungen können auch zur Beurteilung und Überwachung der Effizienz bestimmter Therapien verwendet werden. Die Antikörper nach der Erfindung können auch in vitro zur Bestimmung der Menge der KLK15-Expression in genetisch zur Herstellung eines KLK15-Proteins konstruierten Zellen verwendet werden.

[0089] Die Antikörper können in jeder bekannter Immununtersuchung, die auf der Bindungswechselwirkung zwischen einer Antigendeterminanten eines KLK15-Proteins und den Antikörpern beruht, verwendet werden. Beispiele für solche Untersuchungen sind Radioimmununtersuchungen, Enzymimmununtersuchungen (z. B. ELISA), Immunofluoreszenz, Immunopräzipitation, Latexagglutination, Hämagglutination und histochemische Tests. Die Antikörper können zum Detektieren und Quantifizieren von KLK15-Proteinen in einer Probe verwendet werden, um dessen Rolle in bestimmten zellulären Vorgängen oder pathologischen Stadien zu bestimmen und zum Diagnostizieren und Behandeln solcher pathologischer Stadien.

[0090] Insbesondere können die Antikörper nach der Erfindung in immunohistochemischen Untersuchungen, z. B. auf zellulärer und subzellulärer Ebene, zur Detektion eines KLK15-Proteins, zu dessen Lokalisation auf bestimmte Zellen und Gewebe und auf spezifische subzelluläre Orte und zur Quantifizierung der Expressionsniveaus, verwendet werden.

[0091] Im Fachgebiet bekannte zytochemische Techniken zum Lokalisieren von Antigenen unter Verwendung von Licht- und Elektronenmikroskopie können zur Detektion eines KLK15-Proteins verwendet werden. Allgemein kann ein Antikörper nach der Erfindung mit einer detektierbaren Substanz markiert werden und ein mit KLK15 verwandtes Protein kann in Geweben und Zellen basierend auf der Anwesenheit der detektierbaren Substanz lokalisiert werden: Beispiele für detektierbare Substanzen enthalten, aber sind nicht beschränkt auf die folgenden: Radioisotope (z. B. ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), fluoreszierende Markierungen (z. B. FITC, Rhodamin, seltene Erden-Phosphore), lumineszente Markierungen, wie Luminol, enzymatische Markierungen (z. B. Meerrettichperoxidase, β -Galaktosidase, Luziferase, alkalische Phosphatase, Acetylcholinesterase), Biotinylgruppen (die durch markiertes Avidin detektiert werden können, z. B. Streptavidin, das einen fluoreszierenden Marker oder eine enzymatische Aktivität aufweist, die durch optische oder kalorimetrische Verfahren detektiert werden kann), vorherbestimmte Polypeptidepitope, die durch einen sekundären Reporter erkannt werden (z. B. Leuzin-Reißverschlußpaarsequenzen, Bindungsstellen für Sekundärantikörper, metallbindende Bereiche, Epitoptags). In manchen Ausführungsformen sind die Markierungen mit Abstandshalterarmen mit variablen Längen zum Reduzieren einer möglichen sterischen Behinderung angebracht. Antikörper können auch an Substanzen mit hoher Elektronendichte gekoppelt werden, wie Ferritin oder kolloidales Gold, welche einfach durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können.

[0092] Die Antikörper oder Proben können auf einem Träger oder festen Untergrund immobilisiert werden, der zur Immobilisierung von Zellen, Antikörpern etc. geeignet ist. Z. B. kann der Träger oder Untergrund Nitrozellulose oder Glas, Polyacrylamide, Gabbros und Magnetit sein. Das Trägermaterial kann jede mögliche Gestaltung haben, einschließlich sphärisch (z. B. Kügelchen), zylindrisch (z. B. die innere Oberfläche eines Testgefäßes oder Vertiefung oder die äußere Oberfläche eines Stabs) oder flach (z. B. Blatt, Teststreifen). Indirekte Verfahren können auch verwendet werden, bei welchen die erste Antigen-Antikörper-Reaktion durch Einbringen eines zweiten Antikörpers mit Spezifität für den gegen KLK15-Protein reaktiven Antikörper vervielfältigt wird. Als Beispiel, wenn der Antikörper mit Spezifität für ein KLK15-Protein ein Kaninchen-IgG-Antikörper ist, kann der zweite Antikörper ein mit gamma-Globulin markierter Anti-Kaninchen-Ziegenantikörper sein, der mit einer detektierbaren Substanz wie hierin beschrieben markiert ist.

[0093] Sofern als detektierbare Substanz eine radioaktive Markierung verwendet wird, kann ein KLK15-Protein durch Autoradiographie lokalisiert werden. Die Ergebnisse der Autoradiographie können durch Bestimmen der Dichte der Partikel in den Autoradiogrammen durch verschiedene optische Verfahren oder durch Zählen der Körner quantifiziert werden.

[0094] In einer Ausführungsform zieht die Erfindung ein Testkit zum Überwachen des Voranschreitens von Krebs (z. B. Prostatakrebs) in einem Individuum in Erwägung, welches folgendes umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen einer Menge eines Antikörpers, der an ein KLK15-Protein bindet, mit einer Probe von dem Individuum, um einen binären Komplex zu bilden, der den Antikörper und das KLK15-Protein in der Probe umfaßt,
- (b) Bestimmen und Detektieren des Vorhandenseins oder der Menge an Komplexbildung in der Probe,
- (c) Wiederholen der Stufen (a) und (b) zu einem späteren Zeitpunkt und

(d) Vergleichen der Ergebnisse von Stufe (b) mit dem Ergebnis von Stufe (c), wobei ein Unterschied in der Menge an Komplexbildung das Voranschreiten des Krebses in dem Individuum anzeigen.

[0095] Die Menge an Komplexen kann auch mit einem repräsentativen Wert der Menge an Komplexen in einem Individuum, das nicht durch Krebs (z. B. Prostatakrebs) gefährdet ist oder darunter leidet.

4.2 Verfahren zum Identifizieren oder Auswerten von Substanzen/Verbindungen

[0096] Die hierin beschriebenen Verfahren sind zum Identifizieren von Substanzen entworfen, die die biologische Aktivität eines KLK15-Proteins modulieren, einschließlich Substanzen, die an KLK15-Proteine binden oder an andere Proteine binden, die mit einem KLK15-Protein interagieren, von Verbindungen, die die Wechselwirkung eines KLK15-Proteins stören oder verstärken, und Substanzen, die an das KLK15-Protein binden oder andere Proteine, die mit einem KLK15-Protein wechselwirken. Es werden Verfahren verwendet, die Verbindungen identifizieren, die an für KLK15 regulatorische Sequenzen binden.

[0097] Die Substanzen und Verbindungen, die unter Verwendung der Verfahren nach der Erfindung identifiziert werden, enthalten aber sind nicht beschränkt auf Peptide, wie lösliche Peptide, einschließlich Fusionspeptide mit einem Ig-Schwanz, Mitglieder von Zufallspeptid-Bibliotheken und durch kombinatorische Chemie erhaltene molekulare Bibliotheken, die aus Aminosäuren mit D- und/oder L-Konfiguration gemacht wurden, Phosphopeptide (einschließlich Mitglieder von Zufalls- oder teilweise degenerierten, gerichteten Phosphopeptidbibliotheken), Antikörper [z. B. polyklonale, monoklonale, humanisierte, anti-idiotypische, chimerische, einzelkettige Antikörper, Fragmente (z. B. Fab, F(ab)2 und Fab-Fragmente aus einer Expressionsbibliothek und Epitop-bindende Fragmente davon)] und kleine organische oder anorganische Moleküle. Die Substanz oder Verbindung kann eine endogene physiologische Verbindung oder eine natürliche oder synthetische Verbindung sein.

[0098] Substanzen, die ein KLK15-Protein modulieren, können aufgrund ihrer Fähigkeit, an ein KLK15-Protein zu binden, identifiziert werden. Daher stellt die Erfindung auch Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die an ein KLK15-Protein binden, zur Verfügung. Unter Verwendung von Verfahren nach der Erfindung identifizierte Substanzen können unter Verwendung herkömmlicher Techniken isoliert, kloniert und sequenziert werden. Eine Substanz, die mit einem Polypeptid nach der Erfindung assoziiert, kann ein Agonist oder Antagonist der biologischen oder immunologischen Aktivität eines Polypeptids nach der Erfindung sein.

[0099] Der Begriff „Agonist“ bezieht sich auf ein Molekül, das die Menge der Proteinaktivität steigert oder deren Andauern verlängert. Der Begriff „Antagonist“ bezieht sich auf ein Molekül, das die biologische oder immunologische Aktivität des Proteins verringert. Agonisten und Antagonisten können Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder jedes andere Molekül einschließen, das mit einem Protein nach der Erfindung assoziiert.

[0100] Substanzen, die an ein KLK15-Protein binden können, können durch Umsetzen eines KLK15-Proteins mit einer Testsubstanz, die möglicherweise an ein KLK15-Protein bindet, unter Bedingungen, die die Bildung von Substanz-KLK15-Protein-Komplexen gestatten und Entfernen und/oder Detektieren des Komplexes identifiziert werden. Die Komplexe können durch Untersuchen auf Substanz-KLK15-Protein-Komplexe, auf freie Substanz oder auf nicht komplexiertes KLK15-Protein detektiert werden. Bedingungen, die die Bildung von Substanz-KLK15-Protein-Komplexen gestatten, können unter Berücksichtigung von Faktoren, wie die Art und Menge der Substanz und des Proteins, ausgewählt werden.

[0101] Der Substanz-Protein-Komplex, freie Substanz oder nicht-komplexierte Proteine können durch herkömmliche Isolierungstechniken isoliert werden, z. B. Aussalzen, Chromatographie, Elektrophorese, Gelfiltration, Fraktionierung, Absorption, Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Agglutination oder Kombinationen davon. Zur Vereinfachung der Untersuchung der Bestandteile können Antikörper gegen KLK15-Protein oder gegen die Substanz, oder markiertes KLK15-Protein oder eine markierte Substanz verwendet werden. Die Antikörper, Proteine oder Substanzen können mit detektierbaren Substanzen, wie oben beschrieben, markiert werden.

[0102] Ein KLK15-Protein oder die in dem Verfahren nach der Erfindung verwendete Substanz kann unlöslich gemacht werden. Z. B. kann ein KLK15-Protein oder eine Substanz an einen geeigneten Träger gebunden werden, wie Agarose, Zellulose, Dextran, Sephadex, Sepharose, Carboxymethylzellulose, Polystyrol, Filterpapier, Ionenaustauscherharz, Plastikfilm, Plastikrörchen, Glasperlen, Polyamin-Methylvinylether-Maleinsäure-Copolymer, Aminosäure-Copolymer, Ethylen-Maleinsäure-Copolymer, Nylon, Seide etc. Der Träger kann in der Form von z. B. einem Röhrchen, Testplatte, Perlen, Scheibe, Kugel etc. sein. Das unlöslich gemachte Protein oder Substanz kann durch Umsetzen des Materials mit einem geeigneten unlöslichen Träger unter Ver-

wendung bekannter chemischer oder physikalischer Verfahren, z. B. Cyanogenbromid-Kopplung, hergestellt werden.

[0103] Die Erfindung zieht auch ein Verfahren zur Bewertung einer Verbindung auf ihre Fähigkeit zur Modulierung der biologischen Aktivität eines KLK15-Proteins nach der Erfindung durch Untersuchen auf einen Agonisten oder Antagonisten (d.h. Verstärker oder Inhibitor) der Bindung eines KLK15-Proteins mit einer Substanz, die an einen KLK15-Protein bindet, in Erwägung. Das Basisverfahren zur Bewertung, ob eine Verbindung ein Agonist oder Antagonist der Bindung eines KLK15-Proteins und einer Substanz, die an das Protein bindet, ist eine das KLK15-Protein und die Substanz enthaltende Reaktionsmischung herzustellen, unter Bedingungen, die die Bildung eines Substanz-KLK15-Protein-Komplexes gestatten, in der Anwesenheit der Testverbindung. Die Testverbindung kann am Anfang oder im Anschluß an die Zugabe des KLK15-Proteins und der Substanz zugegeben werden. Kontrollreaktionsmischungen ohne die Testverbindung oder mit einem Plazebo werden auch hergestellt. Die Bildung von Komplexen wird detektiert und die Bildung von Komplexen in der Kontrollreaktion aber nicht in der Reaktionsmischung zeigt an, daß die Testverbindung die Wechselwirkung des KLK15-Proteins und der Substanz stört. Die Reaktionen können in flüssiger Phase durchgeführt werden oder das KLK15-Protein, die Substanz oder Testverbindungen können wie hierin beschrieben immobilisiert werden. Die Fähigkeit einer Verbindung, die biologische Aktivität eines KLK15-Proteins nach der Erfindung zu modulieren, kann durch Bestimmen des biologischen Effekts auf Zellen untersucht werden.

[0104] Es versteht sich, daß die Agonisten und Antagonisten, d.h. Inhibitoren und Verstärker, die unter Verwendung der Verfahren nach der Erfindung untersucht werden können, an einer oder mehrer der Bindungsstellen an dem Protein oder der Substanz wirken können, einschließlich Agonistenbindungsstellen, kompetitive Antagonistenbindungsstellen, nicht kompetitive Antagonistenbindungsstellen oder allosterische Stellen.

[0105] Die Erfindung ermöglicht es auch, nach Antagonisten zu Durchmustern, die den Effekt eines Agonisten auf die Wechselwirkung eines KLK15-Proteins mit einer Substanz, welche zur Bindung an das KLK15-Protein fähig ist, hemmen. Somit kann die Erfindung auch zum Untersuchen auf eine Verbindung verwendet werden, die um die gleiche Bindungsstelle an einem KLK15-Protein konkurriert.

[0106] Die Erfindung zieht auch Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen in Erwägung, die an Proteine binden, die mit einem KLK15-Protein wechselwirken. Protein-Protein-Wechselwirkungen können unter Verwendung herkömmlicher Verfahren, wie Coimmunopräzipitation, Vernetzung und Mitaufreinigung durch Gradienten oder Chromatographiesäulen, identifiziert werden. Es können auch Verfahren angewendet werden, die zu einer gleichzeitigen Identifizierung von Genen führen, die für mit einem KLK15-Protein wechselwirkende Proteine codieren. Diese Verfahren schließen das Sondieren von Expressionsbibliotheken mit markiertem KLK15-Protein ein.

[0107] Zwei-Hybrid-Systeme können auch zur Detektion von Proteininteraktionen in vivo verwendet werden. Im allgemeinen werden Plasmide erstellt, die zwei Hybridproteine codieren. Ein erstes Hybridprotein besteht aus der DNA-bindenden Domäne eines Transkriptionsaktivatorproteins, das mit einem KLK15-Protein fusioniert ist, und das zweite Hybridprotein besteht aus der Aktivatordomäne des Transkriptionsaktivatorproteins, das mit einem unbekannten Protein fusioniert ist, das durch eine cDNA codiert ist, welche als Teil einer cDNA-Bibliothek in das Plasmid rekombiniert wurde. Die Plasmide werden in einen Hefestamm transformiert (z. B. *S. cerevisiae*), der ein Reportergen (z. B. *lacZ*, Luciferase, alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase) enthält, dessen regulatorischer Bereich die Bindestelle des Transkriptionsaktivators enthält. Die Hybridproteine alleine können die Transkription des Reportergens nicht aktivieren. Jedoch die Interaktion der zwei Hybridproteine stellt das funktionelle Aktivatorprotein wieder her und führt zur Expression des Reportergens, welche durch eine Untersuchung auf das Reporterprodukt detektiert wird.

[0108] Es wird begrüßt werden, daß Fusionsproteine in den oben beschriebenen Verfahren verwendet werden können. Insbesondere KLK15-Proteine, die mit Glutathion-S-transferase fusioniert sind, können in den Verfahren verwendet werden.

[0109] Ein Modulator eines KLK15-Proteins nach der Erfindung kann auch aufgrund seiner Fähigkeit, die katalytische Aktivität des Proteins zu hemmen oder zu verstärken, identifiziert werden.

[0110] Die zur Anwendung der Verfahren nach der Erfindung geeigneten Reagenzien zur Untersuchung von Verbindungen, die ein KLK15-Protein modulieren, können in zweckmäßige Kits verpackt werden, die die nötigen Materialien in geeignete Behälter verpackt enthalten. Die Kits können auch geeignete Hilfsmittel enthalten, die bei der Durchführung der Verfahren nach der Erfindung geeignet sind.

4.3 Zusammensetzungen und Behandlungen

[0111] Die Proteine nach der Erfindung, durch die hierin beschriebenen Verfahren identifizierte Substanzen oder Verbindungen und Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung können zur Modulierung der biologischen Aktivität eines KLK15-Proteins verwendet werden, und sie können bei der Behandlung von Zuständen wie Krebs (insbesondere Schilddrüsen-, Prostata-, Dickdarm-, Nieren-, Hodenkrebs) und Schilddrüsenerkrankungen in einem Patienten verwendet werden.

[0112] Dementsprechend können die Substanzen, Antikörper, Peptide und Verbindungen in pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Verabreichung an Subjekte in einer biologisch verträglichen Form, die zur in vivo-Verabreichung geeignet ist, formuliert werden. Mit „biologisch verträglicher Form, die zur in vivo-Verabreichung geeignet ist“ ist eine Form der zu verabreichenden aktiven Substanz gemeint, bei welcher jegliche toxische Effekte durch die therapeutischen Effekte überwogen werden. Die aktiven Substanzen können an lebende Organismen, einschließlich Menschen und Tieren, verabreicht werden. Verabreichung einer therapeutisch aktiven Menge einer pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung ist definiert als eine effektive Menge in Dosierungen und über Zeiträume, die zum Erreichen des gewünschten Ergebnisses notwendig sind. Z. B. kann eine therapeutisch aktive Menge einer Substanz gemäß Faktoren, wie das Krankheitsstadium, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit eines Antikörpers, eine gewünschte Reaktion in dem Individuum auszulösen, variieren. Die Dosierungsverabreichung kann zum Bereitstellen der optimalen therapeutischen Antwort angepaßt werden. Z. B. können mehrere aufgeteilte Dosen täglich verabreicht werden oder die Dosis kann proportional reduziert werden, wie es durch die Notwendigkeit der therapeutischen Situation angezeigt ist.

[0113] Die aktive Substanz kann in einer zweckmäßigen Art verabreicht werden, wie durch Injektion (subkutan, intravenös etc.), orale Verabreichung, Inhalierung, transdermale Anwendung oder rektale Verabreichung. Abhängig von dem Weg der Verabreichung kann die aktive Substanz von einem Material umhüllt sein, um die Substanz vor der Wirkung von Enzymen, Säuren und anderen natürlichen Bedingungen zu schützen, die die Substanz inaktivieren können.

[0114] Die hierin beschriebenen Zusammensetzungen können durch an sich bekannte Verfahren zur Herstellung von pharmazeutisch annehmbaren Zusammensetzungen, die an Subjekte verabreicht werden können, hergestellt werden, so daß eine effektive Menge der aktiven Substanz in einer Mischung mit einer pharmazeutisch annehmbaren Trägersubstanz kombiniert wird. Geeignete Trägersubstanzen sind z. B. in Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) beschrieben. Auf dieser Grundlage enthalten die Zusammensetzungen, wenngleich nicht ausschließlich, Lösungen der aktiven Substanzen in Verbindung mit einer oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägersubstanzen oder Verdünnungsmittel und sind in gepufferten Lösungen mit einem geeigneten pH enthalten und isoosmotisch mit physiologischen Flüssigkeiten.

[0115] Die Zusammensetzungen sind als therapeutische Mittel entweder allein oder in Verbindung mit anderen therapeutischen Mitteln oder Behandlungsformen angezeigt (z. B. Chemotherapie oder Bestrahlung). Z. B. können die Zusammensetzungen in Verbindung mit antiproliferativen Mitteln, antimikrobiellen Mitteln, immunstimulierenden Mitteln oder Entzündungshemmern verwendet werden. Insbesondere können die Zusammensetzungen in Verbindung mit antiviralen und/oder antiproliferativen Mitteln verwendet werden. Die Zusammensetzungen der Erfindung können zusammen, getrennt oder im Anschluß an andere therapeutische Mittel oder Therapien verabreicht werden. Vektoren, die von Retroviren, Adenoviren, Herpes oder Vakziniaviren oder von bakteriellen Plasmiden stammen, können zur Lieferung der Nukleinsäuremoleküle in ein Zielorgan, -gewebe oder -zellpopulation verwendet werden. Dem Fachmann wohlbekannte Verfahren zum Erstellen rekombinanter Vektoren, die Antisense-Nukleinsäuremoleküle nach der Erfindung exprimieren werden, können verwendet werden (siehe z. B. die Techniken, die in Sambrook et al. (oben) und Ausubel et al. (oben) beschrieben sind).

[0116] Die Nukleinsäuremoleküle, die cDNA-Sequenzen in voller Länge und/oder deren regulatorische Elemente enthalten, befähigen einen Fachmann, Sequenzen, die ein Protein nach der Erfindung codieren, als Ermittlungswerkzeug bei der Sense- (Youssoufian H. und H. F. Lodish 1993 Mol Cell Biol 13: 98–104) oder Antisense- (Eguchi et al. (1991) Annu Rev Biochem 60: 631–652) Regulation der Genfunktion zu verwenden. Diese Technologie ist im Stand der Technik wohl bekannt und Sense- oder Antisense-Oligomere oder größere Fragmente können aus zahlreichen Orten entlang der codierenden Bereiche oder Kontrollbereiche entworfen werden.

[0117] Gene, die ein Protein nach der Erfindung codieren, können durch Transfektion einer Zelle oder von

Gewebe mit Vektoren, die große Mengen eines gewünschten KLK15-codierenden Fragments exprimieren, abgestellt werden. Solche Konstrukte können Zellen mit nicht translatierbaren Sense- oder Antisense-Sequenzen überschwemmen. Selbst bei Ausbleiben der Eingliederung in die DNA können solche Vektoren solange RNA-Moleküle transkribieren, bis alle Kopien durch endogene Nukleasen abgeschaltet wurden.

[0118] Modifikationen der Genexpression können durch Entwerfen von Antisense-Molekülen, DNA, RNA oder PNA zu den regulatorischen Bereichen eines Gens, das ein Protein nach der Erfindung codiert, d.h. den Promotoren, Verstärkern und Introns, erhalten werden. Bevorzugt stammen die Oligonukleotide von der Transkriptionsinitiationsstelle, z. B. zwischen –10 und +10 Bereich der Führungssequenz. Die Antisense-Moleküle können auch so entworfen sein, daß sie die Translation der mRNA durch Verhindern der Bindung des Transkripts an Ribosomen blockieren. Inhibition kann auch durch Verwendung der Tripelhelix-Basenpaarungsmethodik erreicht werden. Tripelhelix-Paarung kompromittiert die Fähigkeit der Doppelhelix, sich für die Bindung von Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Molekülen ausreichend zu öffnen. Therapeutische Vorteile bei der Verwendung von Triplex-DNA wurden durch Gee J. E. et al. besprochen (in: Huber B. E. und B. I. Carr (1994) Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co, Mt Kisco N. Y.) Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, die die spezifische Spaltung von RNA katalysieren. Ribozyme wirken durch sequenzspezifische Hybridisierung des Ribozymmoleküls an komplementäre Ziel-RNA, gefolgt von endonukleolytischer Spaltung. Die Erfindung zieht daher konstruierte Ribozymmoleküle mit Hammerkopfmotiv in Erwähnung, die spezifisch und effizient die endonukleolytische Spaltung von Sequenzen katalysieren, die ein Protein nach der Erfindung codieren.

[0119] Spezifische Ribozymspaltungsstellen innerhalb eines möglichen RNA-Ziels können anfänglich durch Durchmustern des Zielmoleküls nach Ribozymspaltungsstellen, die die folgenden Sequenzen enthalten, identifiziert werden: GUA, GUU und GUC. Sind diese Stellen einmal identifiziert, können kurze RNA-Sequenzen von zwischen 15 und 20 Ribonukleotiden, die dem die Spaltungsstellen enthaltenden Bereich des Zielgens entsprechen, auf sekundäre strukturelle Eigenheiten, die das Oligonukleotid funktionslos machen können, bewertet werden. Die Eignung von Zielkandidaten kann auch durch Testen auf Zugänglichkeit gegenüber der Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotiden unter Verwendung von Ribonuklease-Schutzuntersuchungen bestimmt werden. Verfahren zum Einbringen von Vektoren in Zellen oder Gewebe schließen die hierin angesprochenen Methoden ein, die geeignet für in vivo-, in vitro- und ex vivo-Therapie sind. Zur ex vivo-Therapie können Vektoren in Stammzellen eingebracht werden, die von einem Patienten erhalten und zur autologen Transplantation in denselben Patienten vermehrt wurden, eingebracht werden (siehe U.S. Pat. Nr. 5,399,493 und 5,437,994). Die Verabfolgung durch Transfektion und durch Liposom ist im Fachgebiet wohlbekannt.

[0120] Ein Antikörper gegen ein KLK15-Protein kann mit chemotherapeutischen Arzneimitteln, Toxinen, Modifikatoren der immunologischen Antwort, hämatogenen Mitteln, Enzymen und Radioisotopen konjugiert werden und bei der Vorbeugung und Behandlung von Krebs (z. B. Schilddrüsen-, Prostata-, Dickdarm-, Nieren-, Hodenkrebs) verwendet werden. Z. B. kann ein Antikörper gegen ein KLK15-Protein mit toxischen Resten, einschließlich aber nicht beschränkt auf Rizin A, Diphterietoxin, Abrin, Modeccin, und bakteriellen Toxinen aus Pseudomonas oder Shigella, konjugiert werden. Von Toxinen und ihren Derivaten wurde beschrieben, daß sie Konjugate mit für bestimmte Zielgewebe, wie Krebs- oder Tumorzellen, spezifischen Antikörpern bilden, zur Gewinnung von spezifischer zielgerichteter zellulärer Toxizität (Moolten F. L. et al., Immun. Rev. 62: 47–72, 1982 und Bernhard, M. I. Cancer Res. 43: 4420, 1983).

[0121] Konjugate können durch im Stand der Technik bekannte Mittel hergestellt werden. Eine Anzahl bifunktional verknüpfender Mittel (z. B. heterobifunktionale Verbindungsstücke, wie N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)-propionat) ist von Pierce Chemically Company, Rockford, Ill im Handel erhältlich.

[0122] Die Antikörper oder Immunotoxine zur therapeutischen Verwendung können über einen intravenösen Weg verabreicht werden, wobei bei geeigneter Formulierung auch zusätzliche Wege der Verabreichung, wie intraperitoneale, orale oder transdermale Verabreichung, verwendet werden kann.

[0123] Ein KLK15-Protein kann unter Verwendung von im Fachgebiet bekannter Verfahren mit chemotherapeutischen Arzneimitteln, Toxinen, Modifikatoren der immunologischen Antwort, Enzymen und Radioisotopen konjugiert werden.

[0124] Die Erfindung stellt auch immunotherapeutische Ansätze zur Vorbeugung oder Reduzierung der Schwere von Krebs zur Verfügung. Die klinischen Anzeichen oder Symptome des Krebses in einem Subjekt zeigen einen vorteilhaften Effekt für den Patienten aufgrund der Stimulierung der Immunantwort des Subjektes gegen Krebs an. Das Stimulieren einer Immunantwort bezieht sich auf das Induzieren einer Immunantwort

oder Verstärken der Aktivität der Immuneffektorzellen als Antwort auf die Verabreichung eines Impfstoffpräparates nach der Erfindung. Die Vorbeugung von Krebs kann durch eine verlängerte Zeitspanne vor dem Auftreten von Krebs in einem Patienten, der für die Entwicklung von Krebs aufgrund von beispielsweise einer genetischen Veranlagung oder dem Kontakt mit einem karzinogenen Mittel empfänglich ist, angezeigt werden. Die Reduktion der Schwere eines Krebses kann durch Abnahme an Größe oder Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors angezeigt werden.

[0125] Impfstoffe können von einem KLK-Protein, davon abgeleiteten Peptiden oder chemisch hergestellten synthetischen Peptiden oder irgendeiner Kombination dieser Moleküle oder Fusionsproteinen oder Peptiden davon erhalten werden. Die Proteine, Peptide, etc. können synthetisiert oder rekombinant oder andernfalls biologisch hergestellt werden, zur Einbeziehung einer oder mehrerer Aminosäuresequenzen, die einem oder mehreren Epitopen eines Tumor-assozierten Proteins entsprechen. Epitope eines Tumor-assozierten Proteins sollen so verstanden werden, daß die Möglichkeit enthalten ist, daß in manchen Fällen Aminosäuresequenzabweichungen eines natürlich auftretenden Proteins oder Polypeptids antigen sein können und eine Schutzmündigkeit gegen Krebs oder antitumorärzeugende Effekte verleihen. Sequenzabweichungen können ohne Begrenzung Aminosäuresubstitutionen, Extensionen, Deletionen, Trunkierungen, Interpolierungen und Kombinationen davon einschließen. Solche Veränderungen fallen in den Bereich der Erfindung, vorausgesetzt, daß das sie enthaltende Protein immunogen ist und Antikörper gegen ein solches Polypeptid mit natürlich auftretendem KLK15-Protein zur Bereitstellung einer Schutzmündigkeit und/oder antitumorärzeugenden Aktivität in ausreichenden Maße kreuzreagieren, wenn es als Impfstoff verabreicht wird.

[0126] Die Proteine, Peptide, etc. können unter Verwendung von im Fachgebiet bekannter Verfahren in Impfstoffe eingefügt werden, die zur Auslösung einer Immunantwort geeignet sind. Techniken zur Verstärkung der Antigenizität der Proteine, Peptide, etc. sind im Fachgebiet bekannt und schließen Einbringen in eine multimedrale Struktur, Binden an einen hoch immunogenen Proteinträger, z. B. Schlüssellochschnecken-Hämocyanin (KLH) oder Diphtherietoxoid, und Verabreichung in Kombination mit Hilfsstoffen oder jedem anderen Verstärker der Immunantwort ein.

[0127] Impfstoffe können mit physiologisch annehmbaren Medien, einschließlich immunologisch annehmbaren Verdünnungsmittel und Träger, sowie gewöhnlich eingesetzter Hilfsstoffe, wie komplettem Freund'schen Adjuvans, Saponin, Alaun und ähnlichem, kombiniert werden.

[0128] Es wird weiter begrüßt werden, daß anti-idiotypische Antikörper gegen Antikörper gegen hierin beschriebene KLK15-Proteine auch als Impfstoffe geeignet sind und in gleicher Weise formuliert werden können.

[0129] Die Verabreichung eines Impfstoffs gemäß der Erfindung ist generell anwendbar bei der Vorbeugung oder Behandlung von Krebs, einschließlich Schilddrüsen-, Prostata-, Dickdarm-, Nieren- und Hodenkrebs.

[0130] Die Verabreichung eines Impfstoffs gemäß der Erfindung an einen Patienten zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebs kann vor oder nach einem operativen Eingriff zur Entfernung des Krebses, vor oder nach einer chemotherapeutischen Maßnahme zur Behandlung von Krebs und vor oder nach einer Bestrahlungstherapie zur Behandlung von Krebs und jeder Kombination davon stattfinden. Die Krebsimmuntherapie gemäß der Erfindung würde eine bevorzugte Behandlung zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebs sein, da die damit verbundenen Nebenwirkungen im wesentlichen minimal sind im Vergleich zu den anderen vorhandenen Therapien, z. B. Operation, Chemotherapie, Bestrahlungstherapie. Die Impfstoffe haben die Möglichkeit oder Fähigkeit, Krebs in Subjekten ohne Krebs, die aber Gefahr laufen, einen Krebs zu entwickeln, vorzubeugen.

[0131] Die Aktivität der Proteine, Substanzen, Verbindungen, Antikörper, Nukleinsäuremoleküle, Mittel und Zusammensetzungen nach der Erfindung können Tierversuchsmodellsystemen bestätigt werden. Therapeutische Effizienz und Toxizität können durch pharmazeutische Standardverfahren in Zellkulturen oder mit Versuchstieren, wie durch Berechnen der ED_{50} - (die Dosierung, die bei 50% der Population therapeutisch wirksam ist) oder LD_{50} - (die Dosierung, die für 50% der Population tödlich ist) Statistiken, bestimmt werden. Der therapeutische Index ist das Dosisverhältnis von therapeutischen zu toxischen Effekten und kann durch das Verhältnis ED_{50}/LD_{50} ausgedrückt werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die hohe therapeutische Indizes aufweisen, sind bevorzugt.

4.4 Andere Anwendungen

[0132] Die hierin offenbarten Nukleinsäuremoleküle können auch in molekularbiologischen Techniken, die

noch nicht entwickelt wurden, verwendet werden, vorausgesetzt daß die neuen Techniken auf den derzeit bekannten Eigenschaften der Nukleotidsequenzen beruhen, einschließlich aber nicht begrenzt auf Eigenschaften wie dem genetischen Triplettscode und spezifischen Basenpaarwechselwirkungen.

[0133] Um die Funktion eines Polypeptids nach der Erfindung zu untersuchen, können Zellen, Gewebe und nicht humane Tiere mit einem Mangel an Expression oder teilweisem Mangel an Expression eines Nukleinsäuremoleküls oder -gens nach der Erfindung unter Verwendung von rekombinanten Expressionsvektoren nach der Erfindung mit spezifischen Deletions- oder Insertionsmutationen in dem Gen entwickelt werden. Ein rekombinanter Expressionsvektor kann zur Inaktivierung oder Veränderung des endogenen Gens durch homologe Rekombination verwendet werden und dadurch eine Zelle, ein Gewebe oder ein Tier mit einem Mangel erschaffen.

[0134] Nullallele können in Zellen, wie embryonischen Stammzellen, durch Deletionsmutation erzeugt werden. Ein rekombinantes Gen kann auch so konstruiert werden, daß es eine das Gen inaktivierende Insertionsmutation enthält. Ein solches Konstrukt kann dann durch Techniken, wie Transfektion, Elektroporation, Injektion, etc., in eine Zelle, wie eine embryonische Stammzelle, eingebracht werden. Zellen, denen ein intaktes Gen fehlt, können dann durch z. B. Southern Blot, Northern Blot oder durch Untersuchen auf die Expression des codierten Polypeptids unter Verwendung hierin beschriebener Methoden identifiziert werden. Solche Zellen können dann mit embryonischen Stammzellen zum Erzeugen transgener, nicht humaner Tiere mit einem Mangel an einem Polypeptid nach der Erfindung fusioniert werden. Keimlinienübertragung der Mutation kann z. B. durch Aggregieren der embryonischen Stammzellen mit Embryonen in einem frühen Stadium, wie 8-Zellen-Embryonen, in vitro erreicht werden, wobei die entstehenden Plastozysten in weibliche Empfänger überführt werden und Keimlinientransmission der sich ergebenden Aggregationschimeren erzeugt wird. Ein solches mutantes Tier kann zum Bestimmen spezifischer Zellpopulationen, Entwicklungsmuster und in vivo-Prozesse, die für gewöhnlich von der Genexpression abhängen, verwendet werden.

[0135] Ein transgener, nicht humaner Säuger, dessen gesamte Keimzellen und Körperzellen einen rekombinanten Expressionsvektor enthalten, der ein Gen inaktiviert oder verändert, das ein KLK15-Protein enthält, kann entwickelt werden. Der transgene, nicht humane Säuger (dessen gesamte Keimzellen und Körperzellen einen rekombinanten Expressionsvektor enthalten, der ein Gen inaktiviert oder verändert, das ein KLK15-Protein enthält) kann zu mit einem KLK15-Protein assoziierter Pathologie führen. Ein transgener, nicht humaner Säuger, der ein KLK15-Protein nach der Erfindung nicht exprimiert oder eine veränderte (z. B. verringerte) Expression hat, kann zu mit einem KLK15-Protein assoziierter Pathologie führen. Eine KLK15-Protein-Pathologie bezieht sich auf einen Phänotyp, der bei für ein KLK15-Protein homozygoten oder heterozygoten Mutanten beobachtet wird.

[0136] Ein transgenes, nicht humanes Tier kann zum Beispiel eine Maus, Ratte, Kaninchen, Schaf, Hamster, Hund, Katze, Ziege oder Affe sein.

[0137] Ein transgenes, nicht humanes Tieruntersuchungssystem kann ein Modellsystem zum Testen eines Mittels zur Verfügung stellen, das eine mit einem KLK15-Protein assozierte Pathologie reduziert oder hemmt, wie eine mit einem KLK15-Protein assozierte Pathologie, welches folgendes umfaßt:

- (a) Verabreichen des Mittels an ein transgenes, nicht humanes Tier und
- (b) Bestimmen, ob das Mittel die Pathologie (z. B. mit KLK15-Protein assozierte Pathologie) in dem transgenen, nicht humanen Tier im Vergleich zu einem transgenen, nicht humanen Tier in Stufe (a), dem das Mittel nicht verabreicht wurde, reduziert oder hemmt.

[0138] Das Mittel kann bei der Behandlung und Vorbeugung von Zuständen wie Krebs, wie hierin besprochen, geeignet sein. Das Mittel kann auch in pharmazeutische Zusammensetzungen, wie hierin beschrieben, eingebracht sein.

[0139] Das folgende, nicht begrenzende Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung:

Beispiel

Materialien und Verfahren

Identifizierung des neuen Gens

[0140] Eine zusammenhängende Karte für den humanen Kallikrein-Genort, die sich vom KLK1-Gen (Zentro-

mer) bis zum KLK14-Gen (Telomer) (7, 8, 11, 12, 27) erstreckt, wurde erstellt. Diesen Bereich überspannende, sich überschneidende künstliche Bakterienchromosomen (BAC) wurden durch Durchmustern einer humanen BAC-Bibliothek unter Verwendung unterschiedlicher, radioaktiv markierter, genspezifischer Sonden identifiziert. Ein Bereich von – 300 kb genomische Sequenz wurde, wie vorher beschrieben, (11, 27) unter Verwendung verschiedener Techniken etabliert. Durch Durchführen einer EcoR1-Restriktionsuntersuchung wurde der Kallikrein-Ort entlang der EcoR1-Restriktionskarte von Chromosom 19q13, welche vom Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) erhältlich ist, angeordnet. Ein BAC-Klon, der sich mehr näher dem Zentromer erstreckt (BC 781134), wurde dann identifiziert. Contigs der linearen genomischen Sequenz dieses Klons sind vom LLNL erhältlich. Anfänglich wurden diese Contig-Sequenzen zur Vorhersage des Vorhandensein neuer Gene unter Verwendung bioinformatischer Ansätze, wie vorher beschrieben (8, 12), verwendet, und eine neue Serienprotease wurde identifiziert. Die Sequenz des mutmaßlichen Gens wurde dann durch unterschiedliche Ansätze, einschließlich Sequenzieren, EST-Datenbanksuche, PCR-Durchmusterung von Geweben, wie unten beschrieben, bestätigt.

Suche nach exprimierten, sequenzmarkierten Stellen (EST)

[0141] Die vorhergesagten Exons des mutmaßlichen neuen Gens wurden einer Homologiesuche unter Verwendung des BLASTN-Algorithmus (28) auf dem Internetrechner des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gegen die humane EST-Datenbank (dbEST) unterzogen. Klone mit > 95% Homologie wurden vom I. M. A. G. E.-Konsortium (29) durch Research Genetics Inc, Huntsville, AL, bezogen. Die Klone wurden vermehrt, wie an anderer Stelle beschrieben aufgereinigt (30) und mit einem automatischen Sequenzierer aus beiden Richtungen unter Verwendung von den Insert-flankierenden Vektorprimern sequenziert.

Prostatakrebszelllinie und hormonelle Stimulationsexperimente

[0142] Die LNCaP-Prostatakrebszelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, erworben. Die Zellen wurden in RPMI-Medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), ergänzt mit Glutamin (200 mmol/L), Rinderinsulin (10 mg/L), fetalem Rinderserum (10%), Antibiotika und Antimykotika, in Plastikflaschen bis zu annähernder Konfluenz gezogen. Die Zellen wurden dann in 24-Lochplatten für Zellkultur aufgeteilt und bis 50% Konfluenz gezogen. 24 Stunden vor den Experimenten wurden die Kulturmedien gegen Phenolrot-freies Medium, das 10% mit Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum enthält, ausgetauscht. Für die Stimulationsexperimente wurden verschiedene Steroidhormone, gelöst in 100% Ethanol, bis zu einer Endkonzentration von 10^{-8} M in die Kulturmedien gegeben. Zellen, die mit 100% Ethanol stimuliert wurden, wurden als Kontrollen eingeschlossen. Die Zellen wurden für 24 Stunden kultiviert und dann zur mRNA-Extraktion geerntet.

Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) für das KLK15-Gen

[0143] Die gesamte RNA wurde von den LNCaP-Zelllinien oder aus Prostatageweben unter Verwendung von Trizol-Reagenz (Gibco BRL), den Anweisungen des Herstellers folgend, extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch ermittelt. 2 µg der gesamten RNA wurde unter Verwendung des Superscript™ preamplification system (Gibco BRL) zu einem ersten cDNA-Strang revers transkribiert. Das Endvolumen war 20 µl. Basierend auf der kombinierten Information, die aus der vorhergesagten genomischen Struktur des neuen Gens und der EST-Sequenz (siehe unten) erhalten wurde, wurden zwei genspezifische Primer (KLK15-F1 – SEQ ID NO. 47 und KLK15-R1 – SEQ ID NO. 48) (Tabelle 1) entworfen und ein PCR wurde in einer Reaktionsmischung, die 1 µl cDNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Deoxynukleosidtriphosphate), 150 ng der Primer und 2,5 Einheiten HotStar™ DNA-Polymerase (Qiagen Inc., Valencia, CA) enthielt, in einem Perkin-Eimer 9600 Thermozyklierer durchgeführt. Die Zyklusbedingungen waren 95°C für 15 Minuten zur Aktivierung der Taq DNA Polymerase, gefolgt von 35 Zyklen von 94°C für 30 s, 64°C für 30 s, 72°C für 1 min und einem Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 min am Ende. Gleiche Mengen an PCR-Produkten wurden auf 2%-Agarosegelenen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Alle Primer für die RT-PCR umspannten wenigstens 2 Exons, um eine Kontamination durch genomische DNA zu vermeiden. Zur Bestätigung der Identität der PCR-Produkte wurden diese in den pCR 2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), entsprechend den Anweisungen des Herstellers, kloniert. Die Inserts wurden aus beiden Richtungen unter Verwendung von vektorspezifischen Primern mit einem automatischen DNA-Sequenzierer sequenziert.

Gewebeexpression

[0144] Die gesamte RNA, die aus 26 unterschiedlichen humanen Geweben isoliert wurde, wurde von Clontech, Palo Alto, CA, erworben. cDNA wurde, wie oben für die Zellkulturexperimente beschrieben, hergestellt und für PCR-Reaktionen verwendet. Die Gewebe-cDNAs wurden in zahlreichen Verdünnungen unter Verwendung von zwei genspezifischen Primern (KLK15-F2 – SEQ. ID. NO. 49 und KLK15-R1 – SEQ. ID. NO. 48) (Tabelle 1) vervielfältigt. Aufgrund des hohen Maßes an Homologie zwischen den Kallikreinen und um nicht spezifische Vervielfältigung auszuschließen, wurden die PCR-Produkte kloniert und sequenziert.

Prostatakrebsgewebe

[0145] Prostatagewebeproben wurden von 29 Patienten erhalten, die einer radikalen retropubischen Prostatektomie bei einem Adenokarzinom der Prostata im Universitätsklinikum Charite, Berlin, Deutschland unterzogen worden waren. Die Patienten erhielten keine hormonelle Therapie vor der Operation. Die Verwendung dieser Gewebe zu Forschungszwecken wurde durch die Ethikkommission des Charite Krankenhauses genehmigt. Frische Prostatagewebeproben wurden aus den kanzerösen und nicht kanzerösen Teilen der selben Prostata, die entfernt worden war, erhalten. Kleine Stücke des Gewebes wurden unmittelbar nach Entfernen der Prostata zerlegt und bis zur Untersuchung in flüssigem Stickstoff gelagert. Eine histologische Untersuchung aller Gewebestücke wurde, wie vorher beschrieben (31), durchgeführt, zur Sicherstellung, daß das Gewebe entweder maligne oder benigne war. Das Gewebe wurde mit einem Hammer unter flüssigem Stickstoff pulvriert und die RNA wurde, wie oben beschrieben, unter Verwendung von Trizol-Reagenz extrahiert.

Statistische Untersuchung

[0146] Die statistische Untersuchung wurde mit der SAS-Software (SAS Institute, Cary, NC) durchgeführt. Die Untersuchung der Unterschiede zwischen der KLK15-Expression in nicht kanzerösen gegenüber kanzerösen Geweben desselben Patienten wurden mit dem nicht parametrischen McNemar-Test durchgeführt. Die Binomialverteilung wurde zur Berechnung des Signifikanzniveaus verwendet. Die KLK15-mRNA-Niveaus in den Prostataatumoren wurden qualitativ in zwei Klassen aufgeteilt (Gruppen mit niedrigem KLK15 und hohem KLK15), und Zusammenhänge zwischen dem KLK15-Status und anderen Variablen wurden unter Verwendung des exakten Fisher-Tests untersucht.

Strukturuntersuchung

[0147] Eine Mehrfachangleichung wurde unter Verwendung des "Clustal X"-Softwarepakets und dem Multiple Alignment Programm, das vom Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA erhältlich ist, durchgeführt. Phylogenetische Studien wurden unter Verwendung des "Phylipl"-Softwarepakets durchgeführt. Eine Abstandsma-trixuntersuchung wurde unter Verwendung des "Neighbor-Joining/UPGMA"-Programms, und eine Sparsamkeitsuntersuchung wurde unter Verwendung des "Protpars"-Programms durchgeführt. Hydrophobizitätsunter-suchungen wurden unter Verwendung des Baylor College of Medicine Search Launcher durchgeführt. Signal-peptide wurden unter Verwendung des "SignalP"-Rechners vorhergesagt. Proteinstrukturuntersuchungen wurden durch das "SAPS"-Programm (structural analysis of proteins sequence) durchgeführt.

Ergebnisse

Klonieren des KLK15-Gens

[0148] Eine zusammenhängende Karte des humanen Kallikrein-Genorts, der sich vom KLK1-Gen (Zentromer) bis zum KLK14-Gen (Telomer) erstreckt, wurde zuvor festgelegt (7, 8, 11, 12, 27). Um das Vorhandensein von anderen Kallikrein-ähnlichen Genen, die sich näher dem Zentromer im Bezug auf KLK1 befinden, zu erforschen, wurde wie in Materialien und Verfahren beschrieben ein BAC-Klon (BC 781134) erhalten. Entsprechend der veröffentlichten genomischen Sequenz des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) und des humanen renalen Kallikrein (KLK1)-Gens, wurden für jedes dieser Gene genspezifische Primer entworfen (Tabelle 1, SEQ. ID. NOS. 47–50) und auf der Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierende Vervielfältigungsprotokolle entwickelt, die das Erzeugen spezifischer PCR-Produkte mit genomischer DNA als Vorlage erlaubten. Eine PCR-Durchmusterung des BAC-Klons mit diesen genspezifischen Primern zeigte an, daß dieser Klon für KLK1 positiv, aber für PSA negativ ist, wodurch folglich bestätigt wurde, daß es sich im Bezug auf PSA näher am Zentromer befindet.

[0149] Eine mutmaßliche neue Serienprotease wurde aus der Sequenz dieses Klons durch Computerpro-

gramme, wie vorher beschrieben (12), vorhergesagt. Dieser Klon wurde verdaut, auf eine Membran übertragen und mit genspezifischen Primern für das mutmaßliche KLK15-Gen (entsprechend der vorhergesagten Sequenz) hybridisiert und positive Fragmente wurden subkloniert und zum Bestätigen der Struktur des mutmaßlichen Gens sequenziert. Diese mutmaßliche Gensequenz wurde dann mit dem Blast-Programm gegen die humane EST-Datenbank abgeglichen und zwei EST-Klone identifiziert (GenBank-Zugangsnummern: AW274270 und AW205420). Diese beiden Klone waren bis zum letzten Exon zu 99% identisch und der 3' nicht translatierte Bereich des Gens und der zweite EST endet mit einer Reihe von 17 Adeninnukleotiden (A), die in der genomischen Sequenz nicht gefunden wurden, wodurch das 3'-Ende des Gens und die Position des poly A-Schwanzes bestätigt wurde.

[0150] Zum Identifizieren der Struktur der gesamten mRNA des Gens und zum Bestimmen der Exon/Intron-Grenzen wurden PCR-Reaktionen mit Primern, die in unterschiedlichen, vom Computer vorhergesagte Exons lokalisiert sind, unter Verwendung einer Auswahl von 26 cDNAs aus humanem Gewebe als Vorlagen, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden sequenziert. Zwei dieser Primer (KLK15-F1 – SEQ. ID. NO. 47 und KLK15-R1 – SEQ. ID. NO. 48) (Tabelle 1) konnten den gesamten codierenden Bereich des Gens aus unterschiedlichen Geweben vervielfältigen. Ein Vergleich der mRNA mit der genomischen Struktur zeigte das Vorhandensein eines Gens an, das aus 5 codierenden Exons mit 4 dazwischenliegenden Introns besteht. Die Translation der mRNA-Sequenz in allen möglichen Leserastern offenbarte das Vorhandensein von nur einem Raster, das zu einer ununterbrochenen Polypeptidkette führt, die auch die hochkonservierten Strukturmotive der Kallikreine, wie unten besprochen, enthält.

Strukturelle Charakterisierung des KLK15-Gens

[0151] Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, besteht das KLK15-Gen aus 5 codierenden Exons und 4 dazwischenliegenden Introns, obwohl, wie bei anderen Kallikrein-Genen, das Vorhandensein eines weiteren/weiterer nicht translatierten(r) Exons nicht ausgeschlossen werden konnte (17, 32, 33). Alle Exon/Intron-Spleißstellen entsprechen der Consensus-Sequenz für eukaryotische Spleißstellen (34). Das Gen folgt weiter streng den gemeinsamen strukturellen Eigenschaften anderer Mitglieder der humanen Kallikrein-Multigenfamilie, wie unten beschrieben. Der vorhergesagte, ein Protein codierende Bereich des Gens besteht aus 771 bp, die ein davon abgeleitetes Polypeptid aus 256 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 28,1 kDa codieren. Das mögliche Translationsinitiationscodon entspricht der Consensus-Kozak-Sequenz (35), überdies befindet sich an Position (-3) ein Purin, das bei 97% aller Wirbeltier-mRNAs erscheint (36). Es sollte auch beachtet werden, daß KLK15, wie die meisten anderen Kallikrein-ähnlichen Gene, an Position (+4) kein Consensus-G-Nukleotid hat.

[0152] Die Nukleotide 7764–7769 (ATTAAA) (SEQ. ID. NO. 40) erinnern stark an ein Consensus-Polyadenylierungssignal (37) und werden nach 17 Nukleotiden von dem poly A-Schwanz gefolgt. In dem 3' nicht translatierten Bereich waren keine weiteres möglichen Polyadenylierungssignale erkennbar, was nahelegt, daß die obige Sequenz das tatsächliche Polyadenylierungssignal ist. Obwohl ATTAAA (SEQ. ID. NO. 40) hochkonserviert ist, gibt es natürliche Abweichungen, und es wird berichtet, daß die ATTAAA-Sequenz (SEQ. ID. NO. 40) als natürliche Polyadenylierungsvariante in 12% der Wirbeltier-mRNA-Sequenzen (38) auftritt. Das Vorhandensein von Glutaminsäure (E) an Position 203 legt nahe, daß KLK15 vermutlich eine einzigartige Substratspezifität besitzt. PSA hat einen Serinrest (S) an der entsprechenden Stelle und hat eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität. Viele andere Kallikreine haben gewöhnlich Aspartat (D) an dieser Stelle, was eine Trypsin-ähnliche Aktivität anzeigt ([Fig. 2](#)) (6).

[0153] Obwohl die Sequenz des KLK15-Proteins einzigartig ist, haben Vergleichsuntersuchungen ergeben, daß es einen beträchtlichen Grad an Homologie mit anderen Mitgliedern der Kallikrein-Multigenfamilie hat. KLK15 zeigt 51% Proteinidentität und 66% Ähnlichkeit mit der Trypsin-ähnlichen Serinprotease (TLSP) und jeweils 49%, 48% Identität mit den Neuropsin- und den KLK-L3-Proteinen. Hydrophobizitätsuntersuchungen haben ergeben, daß der aminotermrale Bereich ziemlich hydrophob ist ([Fig. 3](#)), was mit der Möglichkeit, daß dieser Bereich eine Signalsequenz trägt, entsprechend anderen Serinproteasen konsistent ist. Eine Computeruntersuchung der KLK15-Proteinsequenz sagte eine Spaltungsstelle zwischen den Aminosäuren 16 und 17 (TAA-QD) vorher. Eine Sequenzangleichung ([Fig. 2](#)) offenbarte eine weitere mögliche Spaltungsstelle (Lys²¹) an einer zu der Aktivierungsstelle von anderen Serinproteasen homologen Stelle [Lysin (K) oder Arginin (R) ist in den meisten Fällen vorhanden] (39). Mehrere gleichmäßig verteilte hydrophobe Bereiche im gesamten KLK15-Polypeptid stimmen mit einem globulären Protein, ähnlich zu anderen Kallikreinen und Serinproteasen, überein. Somit wird KLK15, wie das bei anderen Kallikreinen der Fall ist, vermutlich als ein inaktiver, aus 256 Aminosäuren bestehender Präproenzymvorläufer translatiert. Präpro-KLK15 hat 21 zusätzliche Reste, die den Präbereich (das Signalpeptid, das aus 16 Resten besteht) und das Propeptid (5 Reste) darstellen.

[0154] Der gepunktete Bereich in [Fig. 2](#) gibt eine Schlaufe aus 11 Aminosäuren an, die für klassische Kallikreine (PSA, KLK1 und KLK2) charakteristisch ist, aber nicht in KLK15 oder anderen Mitgliedern der Kallikrein-Multigenfamilie (10, 11, 13, 14) gefunden wird. KLK15 hat jedoch eine einzigartige Schleife aus 8 Aminosäuren (HNEPGTAG) (SEQ. ID. NO. 10) an den Positionen 148–155, die in keinem anderen Kallikrein gefunden wird ([Fig. 2](#)). Neunundzwanzig "unveränderliche" Aminosäuren, die die aktive Stelle der Serinproteasen umgeben, wurden beschrieben (40). Von diesen sind achtundzwanzig in KLK15 konserviert. Eine der nicht konservierten Aminosäuren (Ser¹⁷³ anstelle von Pro) wird auch in Prostase, KLK-L2 und KLK-L5-Proteinen gefunden und stellt gemäß Proteinevolutionsstudien (41) eine konservierte evolutionäre Veränderung eines Proteins derselben Gruppe dar. In dem mutmaßlichen gereiften KLK15-Protein sind zwölf Cysteinreste vorhanden, von denen zehn in allen Kallikreinen konserviert sind und von denen die Bildung von Disulfidbrücken erwartet würde. Die anderen beiden (C131 und C243) werden nicht in PSA, KLK1, KLK2 oder KLK-L4 gefunden, sie werden jedoch in ähnlichen Positionen in allen anderen Kallikreingenen gefunden und die Bildung einer zusätzlichen Disulfidbindung wird von ihnen erwartet.

[0155] Zur Vorhersage der phylogenetischen Verwandtschaft des KLK15-Proteins mit anderen Serinproteasen wurden die Aminosäuresequenzen unter Verwendung der Unweighted-Pair-Group-Method-with-Arithmetical-Mean (UPGMA), des Neighbor-Joining-Distanzmatrixverfahrens und des "Prot pars"-Sparsamkeitsverfahrens miteinander angeglichen. Alle erhaltenen phylogenetischen Bäume stimmten darin überein, daß andere Sennproteasen (Nicht-Kallikreine) als eine separate Gruppe zusammengefaßt werden können, wodurch angezeigt wird, daß die Kallikreine einen getrennten Schritt in der Evolution von Serinproteasen darstellen. KLK15 wurde mit dem KLK-L3 und TLSP ([Fig. 4](#)) zusammengefaßt und die klassischen Kallikreine (hK1, hK2 und PSA) sind in allen Bäumen zusammengefaßt, was nahelegt, daß die Trennung zwischen klassischen Kallikreinen und den Kallikrein-ähnlichen Genen früh in der Evolution stattfand, was mit Vorschlägen früherer Studien übereinstimmt (13).

Spleißvarianten des KLK15-Gens

[0156] Eine PCR-Durchmusterung nach KLK15-Transkripten unter Verwendung genspezifischer Primer (KLK15 – F2-SEQ. ID. NO. 49 und KLK15-R2 – SEQ. ID. NO. 50) (Tabelle 1) ergab in den meisten untersuchten Gewebe-cDNAs das Vorhandensein von drei Banden ([Fig. 6](#)). Diese Banden wurden auf einem Gel aufgereinigt, kloniert und sequenziert. Die obere Bande stellt die klassische Form des Gens dar und die untere Bande ist Spleißvariante 3 ([Fig. 7](#)). Die mittlere Bande stellt zwei andere Spleißvarianten dar. Ein Restriktionsverdau des PCR-Produkts der mittleren Bande mit Stu I gefolgt von Geltrennung, Aufreinigung und Sequenzieren ergab, daß diese aus den Spleißvarianten 1 und 2 besteht, die ungefähr dieselbe Länge haben (Spleißvariante 1 hat Exon 4 (137 bp), aber es fehlen 118 bp aus Exon 3, während Spleißvariante 2 zusätzlich 118 bp aus Exon 3 hat, aber Exon 4 fehlt). Es wird angenommen, daß alle Spleißvarianten für trunkierte Proteinprodukte codieren ([Fig. 5](#)).

Chromosomal Lokalisierung des KLK15-Gens

[0157] Eine Restriktionsanalysenuntersuchung einer Anzahl von überlappenden BAC-Klone, die den humanen Kallikrein-Ort umspannen, gefolgt von einem Vergleich mit der EcoR I-Restriktionskarte des Gebiets (erhältlich auf der LLNL-Internetseite), ermöglichte die Identifikation eines BAC-Klons (BC 25479), der näher dem Telomer, benachbart zu BC 781134 (der das KLK15-Gen enthält) ist. Ein Abgleich der Sequenzen der zwei Klone mit einem BLAST-Programm zeigte, daß die Enden dieser Klone überlappen. Durch Identifizieren der Positionen der KLK1-, KLK3- und KLK15-Gene entlang dieser Klone wurde die relative Anordnung und die Richtung der Transkription dieser drei Gene präzise definiert. KLK1 liegt dem Zentromer am nächsten und seine Transkriptionsrichtung ist vom Telomer zum Zentromer, gefolgt durch KLK15, welches näher am Telomer gelegen ist und in die gleiche Richtung transkribiert wird. Der Abstand zwischen den beiden Genen beträgt eine Länge von 1.501 bp. Das KLK3-Gen ist näher am Telomer gelegen und befindet sich in einem Abstand von 23.335 von dem KLK15 und wird in die umgekehrte Richtung transkribiert ([Fig. 6](#)). Diese Ergebnisse stimmen mit vorhergehenden Berichten überein, bei denen der Abstand zwischen KLK3 und KLK1 grob auf ~31 kbp geschätzt wurde (6, 27).

Gewebeexpression und hormonelle Regulation des KLK15-Gens

[0158] Wie in [Fig. 7](#) gezeigt, wird das KLK15-Gen in der Schilddrüse auf höchstem Niveau exprimiert. Geringere Expressionsniveaus werden auch in der Prostata, Speicheldrüse und Nebenniere, Dickdarm, Hoden und Niere gesehen. Um die Spezifität der RT-PCR zu bestätigen, wurden typische PCR-Produkte kloniert und sequenziert. [Fig. 8](#) zeigt, daß das KLK15-Gen durch Steroidhormone in der humanen LNCaP-Prostatakrebszel-

linie heraufreguliert ist.

KLK15-Expression bei Prostatakrebs

[0159] Die Expression des KLK15-Gens in normalem und kanzerösem Prostatagewebe wurde durch RT-PCR untersucht. Aktin wurde als Kontrollgen zur Sicherstellung der Qualität und der verwendeten cDNA-Menge eingeschlossen. Zur Untersuchung der relativen Expression des KLK15-Gens in normalem im Vergleich zu malignem Gewebe, wurden 29 Paare Prostatagewebe untersucht. Jedes Paar stellte normales und kanzeröses Gewebe, das von demselben Patienten erhalten wurde, dar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. 13 von 29 Patienten hatten eine signifikant höhere KLK15-Expression in dem Krebsgewebe und nur 3 hatten eine höhere Expression des KLK15 in Nicht-Krebs- im Vergleich zu Krebsgeweben. Die Auswertung durch den McNemar-Test zeigte an, daß die Unterschiede zwischen normalem und kanzerösem Gewebe statistisch signifikant sind ($P = 0,021$). Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle wurde die Binomialverteilung zur Berechnung des Signifikanzniveaus verwendet. Die Prostatakrebspatienten wurden weiter in zwei Gruppen aufgeteilt: (a) mit positiver KLK15-Expression ($N = 21$) und (b) mit negativer (oder wenig) KLK15-Expression ($N = 8$). Als die Zuordnung der KLK15-Expression mit klinikopathologischen prognostischen Variablen verglichen wurde, wurde herausgefunden, daß eine hohe KLK15-Expression häufiger in Patienten mit späten Krankheitsstadien und Tumoren mit höheren Graden ist (Tabelle 3).

Diskussion

[0160] Kallikreine sind eine Untergruppe der Serinproteasen. Der Begriff "Kallikrein" wird gewöhnlich zur Beschreibung eines Enzyms, das auf ein Vorläufermolekül (Kininogen) zur Freisetzung eines bioaktiven Peptids (Kinin) wirkt (3, 42). Jedoch ist der Begriff "Gewebekallikrein" nicht auf die funktionelle Definition des Enzyms beschränkt. Dieser Begriff wird jetzt zur Beschreibung einer Gruppe von Enzymen mit hochkonservierter Gen- und Proteinstruktur verwendet, die sich auch am selben chromosomal Orte befinden. Unter den drei klassischen humanen Kallikrein-Genen codiert nur KLK1 für ein Protein mit starker Kininogenaseaktivität. Die durch die KLK2- und KLK3-Gene codierten Enzyme haben eine sehr schwache Kininogenaseaktivität. Die bereits klonierten 14 Mitglieder der humanen Kallikrein-Genfamilie haben wie unten gezeigte eine Anzahl an Ähnlichkeiten (7, 11):

- Alle Gene befinden sich im selben chromosomal Bereich (19g13.3–g13.4).
- Alle Gene codieren für mögliche Serinproteasen mit einer konservierten katalytischen Triade in den entsprechenden Positionen, d.h. Histidin in der Nähe des Endes der zweiten codierenden Exons, Asparaginsäure in der Mitte des dritten Exons und Serin am Anfang des fünften (letzten) Exons.
- Alle Gene haben fünf codierende Exons (einige Mitglieder enthalten ein oder mehrere 5' nicht translatierte Exons).
- Die Größen der codierenden Exons sind ähnlich oder identisch.
- Introns sind vollständig konserviert.
- Alle Gene haben eine signifikante Sequenzhomologie auf DNA- und Aminosäureebene (30–80%).
- Viele dieser Gene sind durch Steroidhormone reguliert.

[0161] Die [Fig. 2](#) und [Fig. 8](#) zeigen, daß das neu identifizierte KLK15-Gen alle der oben genannten Ähnlichkeiten teilt und somit ein neues Mitglied der humanen Kallikrein-Multigenfamilie ist. Dieses Gen wurde KLK15 genannt.

[0162] Viele der Kallikrein-Gene stehen in Verbindung mit der Krankheitsentwicklung von humanen Erkrankungen, abhängig vom Gewebe ihrer hauptsächlichen Expression. Das KLK1-Gen ist an vielen Krankheitsprozessen beteiligt, einschließlich Entzündung (3), Bluthochdruck (44), Nierenentzündung und diabetische Nierenkrankheit (45, 46). Die Zusammenhänge zwischen HSCCE (KLK7) mit Hauterkrankungen, einschließlich krankhafter Hautverhornung und Schuppenflechte, wurden schon berichtet (47, 48). Little et al. haben vorgeschlagen, daß Zyme (KLK6) stärkebildend sein kann und bei der Entwicklung der Alzheimererkrankung eine Rolle spielen kann (14). Es gibt andere Berichte, die den Zusammenhang von Neuropsin (KLK8)-Expression mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems, einschließlich Epilepsie (49, 50), beschreiben. Da KLK15 hauptsächlich in der Schilddrüse exprimiert wird, kann es eine bedeutende Rolle in der normalen Physiologie und Pathophysiologie dieser Drüse spielen. Unter allen anderen entdeckten Kallikreinen werden viele in der Schilddrüse exprimiert, aber in diesem Gewebe keines auf höchstem Niveau (7, 11).

[0163] Das KLK15-Gen ist auf mRNA-Ebene in einer Untergruppe von Prostatakrebsen heraufreguliert. Die Verteilungen des qualitativen KLK15-Expressionsstatus (hoch oder niedrig) zwischen Untergruppen von Patienten, die sich in Krankheitsstadium, Tumorgrad und Gleason-Tumorstadieneinteilung unterscheiden, gaben

an, daß eine hohe KLK15-Expression häufiger in Grad 3-Tumoren sowie in Stadium III und in Patienten mit einer Gleason-Tumorstadieneinteilung > 6 gefunden wurde. Diese Funde geben an, daß die Überexpression von KLK15 mit aggressiveren Formen der Krankheit assoziiert ist und ein Hinweis auf eine schlechte Prognose sein kann (Tabelle 3).

[0164] Es gibt zunehmend Hinweise, daß viele Kallikreine und Kallikrein-ähnliche Gene mit Malignität in Verbindung stehen. PSA ist bisher der beste Marker für Prostatakrebs (20). Kürzliche Berichte schlagen vor, daß hK2 (codiert durch das KLK2-Gen) ein weiterer geeigneter diagnostischer Marker für Prostatakrebs sein könnte (21, 51). NES1 (KLK10) scheint ein neues Tumorsuppressor-Gen (23) zu sein. Von dem Zyme (KLK6)-Gen wurde gezeigt, daß es differenziell in primären Brust- und Eierstocktumoren exprimiert wird (24) und von dem humanen Stratum corneum chymotryptischen Enzym (HSCCE, KLK7) wurde gezeigt, daß es in unnormal hohen Mengen in Eierstockkrebs exprimiert wird (25). Ein weiteres kürzlich identifiziertes Kallikrein-ähnliches Gen, das vorläufig Tumor-assoziiertes differenziell exprimierte Gen-14 (TADG-14/Neuropsin) (KLK8) genannt wurde, wurde eine Überexpression in ungefähr 60% der Eierstockkrebsgewebe gefunden (26). Von Prostase/KLK-L1/(KLK4) ein weiteres neu entdecktes Kallikrein-ähnliches Gen, wird spekuliert, daß es mit Prostatakrebs verknüpft sei (13). Bei zwei neu entdeckten Kallikreinen, KLK-L4 (KLK13) und KLK-L5 (KLK12) wurde eine Herunterregulation in Brustkrebs gefunden (10). Somit schlägt umfangreiche neue Literatur mehrfache Verbindungen von zahlreichen Kallikrein-Genen zu vielen Formen des humanen Krebs vor.

[0165] Das Vorhandensein mehrfach alternativ gespleißter mRNA-Formen ist unter den Kallikreinen häufig. Getrennte RNA-Arten werden zusätzlich zu dem hauptsächlichen 1,6 kb-Transkript von dem PSA-Gen transkribiert (19, 52, 53). Reigman et al. berichteten auch von der Identifizierung von zwei alternativen Spleißformen des humanen glandulären Kallikrein 2-Gens (KLK2) (54). Ein neues Transkript des Gewebekallikrein-Gens (KLK1) wurde auch aus dem Dickdarm isoliert (55). Von Neuropsin, einem kürzlich identifizierten Kallikrein-ähnlichen Gen, wurde festgestellt, daß es zwei alternative Spleißformen zusätzlich zu der Hauptform hat (25, 26). Auch von KLK-L4 wurde herausgefunden, daß es unterschiedliche alternative Spleißformen hat (10). Da die Spleißvarianten von KLK15 eine identische 5'-Sequenz, die zur Translation, Sekretion und Aktivierung erforderlich ist, aufweist, ist es möglich, anzunehmen, daß sie für ein ausgeschüttetes Protein (53) codieren.

[0166] Zusammenfassend wurde ein neues Mitglied der humanen Kallikrein-Genfamilie, KLK15, charakterisiert, welches sich am humanen Kallikrein-Ort (Chromosom 19q13.3–q13.4) befindet. Dieses Gen hat zusätzlich zu der klassischen Form drei verwandte Spleißformen. KLK15 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, aber hauptsächlich in der Schilddrüse, es scheint in aggressiveren Formen von Prostatakrebs heraufreguliert zu sein und seine Expression wird durch Steroidhormone beeinflußt. Da einige andere Kallikreine bereits als wertvolle Tumormarker verwendet werden, könnte KLK15 ähnliche klinische Anwendungen finden.

Tabelle 1 Für die genomische PCR-Vervielfältigung verwendete Primer

Gen	Name und Sequenz des Primers	GenBank-Zugangsnr.
KLK1	KLK1-A: ATC CCT CCA TTC CCA TCT TT	L10038
	KLK1-B: CAC ATA CAA TTC TCT GGT TC	
KLK2	KLK2-A: AGT GAC ACT GTC TCA GAA TT	M18157
	KLK2-B: CCC CAA TCT CAC GAG TGC AC	
PSA	E5-A: GTC GGC TCT GGA GAC ATT TC	M27274
	E5-B: AAC TGG GGA GGC TTG AGT C	
KLK15	KLK15-F1 CTC CTT CCT GCT GGC ATC CA	AF242195
	KLK15-R1 ATC ACA CGG GTG GTC ATG TG	
	KLK15-F2 CAA GTG GCT CTC TAC GAG CG	
	KLK15-R2 GAC ACC AGG CTT GGT GGT GT	

* Alle Primer sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

Tabelle 2 KLK15-Expression in 29 Paaren kanzerösem und nicht-kanzerösem Prostatagewebe

KLK15-Expression	Anzahl der Patienten	P-Wert
Höher im Krebs im Vgl. zum Normalen	13	
Niedriger im Krebs im Vgl. zum Normalen	3	
Hohe Expression, aber ungefähr gleich in beiden Geweben	8	
Niedrige (oder keine) Expression, aber ungefähr gleich in beiden Geweben	5	0,021

* Der P-Wert wurde durch den McNemar-Test unter Verwendung der Binomialverteilung kalkuliert.

Tabelle 3 Verhältnis zwischen KLK15-Expression und anderen klinikopathologischen Variablen in 29 Patienten mit primärem Prostatakrebs

Variable	Patienten	Anzahl der Patienten (%)			P-Wert*
		KLK15 negativ	KLK15 positiv		
Stadium		8 (40)	12 (60)	0,033	
		0 (0)	9 (100)		
Grad		8 (34,8)	15 (65,2)	0,15	
		0 (0)	6 (100)		
Gleason-Tumorstadieneinteilung		7 (31,8)	15 (62,2)	0,14	
		0 (0)	6 (100)		
		1			

* Exakter Fisher-Test

VOLLSTÄNDIGE LITERATURSTELLEN FÜR DIE IN DER BESCHREIBUNG GENANNTEN QUELLEN

1. Kraut, H., K., F. E., und Werle, E. (1930) Physiol. Chem. 189, 97–106
2. Werle, E. (1934) Biochem. Z 269, 415–434
3. Clements, J. (1997) in The Kinin System (Farmer, S. Hrsg.), S. 71–97, Academic Press, New York
4. Evans, B. A., Drinkwater, C. C. und Richards, R. I. (1987) J. Biol. Chem. 262, 8027–34
5. Ashley, P. L. und MacDonald, R. J. (1985) Biochemistry 24, 4520–7
6. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., Suurmeijer, L., Cleutjens, C. B. und Trapman, J. (1992) Genomics 14, 6–11
7. Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Luo, L. Y., Magklara, A. und Obiezu, C. V. (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11, 54–60
8. Yousef, G. M., Obiezu, C. V., Luo, L. Y., Black, M. H. und Diamandis, E. P. (1999) Cancer Res. 59, 4252–6
9. Yousef, G. M. und Diamandis, E. P. (1999) J. Biol. Chem. 274, 37511–6
10. Yousef, G. M., Chang, A. und Diamandis, E. P. (2000) J. Biol. Chem. 275, 11891–8
11. Yousef, G. M. und Diamandis, E. P. (2000) Genomics 65, 184–194
12. Yousef, G. M., Luo, L. Y. und Diamandis, E. P. (1999) Anticancer Res. 19, 2843–52
13. Nelson, P. S., Gan, L., Ferguson, C., Moss, P., Gelinas, R., Hood, L. und Wang, K. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 3114–9
14. Little, S. P., Dixon, E. P., Norris, F., Buckley, W., Becker, G. W., Johnson, M., Dobbins, J. R., Wyrick, T., Miller, J. R., MacKellar, W., Hepburn, D., Corvalan, J., McClure, D., Liu, X., Stephenson, D., Clemens, J. und Johnstone, E. M. (1997) J. Biol. Chem. 272, 25135–42
15. Liu, X. L., Wazer, D. E., Watanabe, K. und Band, V. (1996) Cancer Res. 56, 3371–9

16. Hansson, L., Stromqvist, M., Backman, A., Wallbrandt, P., Carlstein, A. und Egelrud, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19420–6
17. Yoshida, S., Taniguchi, M. Hirata, A. und Shiosaka, S. (1998) *Gene* 213 (1–2), 9–16
18. Stephenson, S. A., Verity, K., Ashworth, L. K. und Clements, J. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23210–4
19. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Romijn, J. C. und Trapman, J. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 95–102
20. Diamandis, E. P. (1998) *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 310–316
21. Stenman, U. N. (1999) *Clin. Chem.* 45, 753–4
22. Partin, A. W., Catalona, W. J., Finlay, J. A., Darte, C., Tindall, D. J., Young, C. Y., Klee, G. G., Chan, D. W., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L. und Woodrum, D. L. (1999) *Urology* 54, 839–45
23. Goyal, J., Smith, K. M., Cowan, J. M., Wazer, D. E., Lee, S. W. und Band, V. (1998) *Cancer Res.* 58, 4782–6
24. Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., Mok, S. C. und Sager, R. (1996) *Mol. Med.* 2, 624–36
25. Tanimoto, N., Underwood, L. J., Shigemasa, K., Yan Yan, M. S., Clarke, J., Parmley, T. H. und O'Brien, T. J. (1999) *Cancer* 86, 2074–82
26. Underwood, L. J., Tanimoto, H., Wang, Y., Shigemasa, K., Parmley, T. H., und O'Brien, T. J. (1999) *Cancer Res.* 59 (17), 4435–9
27. Yousef, G. M., Chang, A. und Diamandis, E. P. (2000) eingereicht
28. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389–402
29. Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. und Soares, M. B. (1996) *Genomics* 33, 151–2
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, NY
31. Meyer, A., Jung, K., Lein, M., Rudolph, B., Schnorr, D. und Loening, S. A. (1997) *Int. J. Cancer* 74, 630–6
32. Luo, L., Herbrick, J. A., Scherer, S. W., Beatty, B., Squire, J. und Diamandis, E. P. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (3), 580–6
33. Yousef, G. M., Luo, L. Y., Scherer, S. W., Sotiropoulou, G., und Diamandis, E. P. (1999) *Genomics* 62 (2), 251–9
34. Iida, Y. (1990) *J. Theor. Biol.* 145 (4), 523–33
35. Kozak, M. (1991) *J. Cell. Biol.* 115 (4), 887–903
36. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15 (20), 8125–48
37. Proudfoot, N. J. und Brownlee, G. G. (1976) *Nature* 263, 211–4
38. Sheets, M. D., Ogg, S. C. und Wickens, M. P. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18 (19), 5799–805
39. Keil, B. (1971) in *The enzymes* (P. D. Boyer, E. Hrsg.) Band 3, 3. Ausg., S. 249–275, Academic Press, New York
40. Dayhoff, M. O. (1978) *Natl. Biomed. Res. Found.* 5, 79–81
41. Miyata, T. Miyazawa, S. und Yasunaga, T. (1979) *J. Mol. Evol.* 12 (3), 219–36
42. Bhoola, K. D., Figueira, C. D. und Worthy, K. (1992) *Pharmacol. Rev.* 44 (1), 1–80
43. Diamandis, E. P., Yousef, G., Clements, J. et al., (2000) *Clin. Chem.* im Druck
44. Margolius, N. S., Horivitz, D., Pisano, J. J., und Keiser, N. R. (1974) *Circ. Res.* 35 (6), 820–5
45. Jaffa, A. A., Chai, K. X., Chao, J., Chao, L. und Mayfield, R. K. (1992) *Kidney Int.* 41 (4), 789–95
46. Cumming, A. D., Walsh, T., Wojtacha, D., Fleming, S., Thomson, D. und Jenkins, D. A. (1994) *Clin Sci.* 87 (1), 5–11
47. Sondell, B., Dyberg, P., Anneroth, G. K., Ostman, P. O. und Egelrud, T. (1996) *Acta. Derm. Venereol.* 76 (3), 177–81
48. Ekholm, E. und Egelrud, T. (1999) *Arch. Dermatol. Res.* 291 (4), 195–200
49. Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K. und Shiosaka, S. (1998) *Eur. J. Neurosci.* 10 (2), 760–4
50. Kishi, T., Kato, M., Shimizu, T., Kato, K., Matsumoto, K., Yoshida, S., Shiosaka, S. und Hakoshima, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4220–4
51. Black, M. H., Magklara, A., Obiezu, C. V., Melegos, D. N. und Diamandis, E. P. (1999) *Clin. Chem.* 45 (6 Pt 1), 790–9
52. Riegman, P. H., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Romijn, J. C. und Trapman, J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (1), 181–8
53. Heuze, N., Olayat, S., Gutman, N., Zani, M. L. und Courty, Y. (1999) *Cancer Res.* 59, 2820–4
54. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, H. A., Romijn, J. C. und Trapman, J. (1991) *Mol. Cell Endocrinol.* 76 (1–3), 181–90
55. Chen, L. M., Murray, S. R., Chai, K. X., Chao, L. und Chao, J. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27 (8), 1829–38
56. Mitsui, S., Tsuruoka, N., Yamashiro, K., Nakazato, H. und Yamaguchi, N. (1999) *Eur. J. Biochem.* 260 (3), 627–34

SEQUENZPROTOKOLL

SEQ. ID. NO. 1

KLK15 vollständige genomische Struktur

7681 tccttatctg taaaatgaga ccatcttatt gctgacttca aagggctgtt gtgaggatta
 7741 aatgagatga ttctgtctgaa ctgattaaaa tcgtgtctgg cactgagtaa ataccctcta
 7801 tctctggatc ccagttaaag gacctaacag acactagatt accaagaatg gtttttctt
 7861 taaggtagg ttctggccg ggcattgggg ctcacacctg taatcccgc actttttggag
 7921 gccaaggccg gcggtcaact tgaggctcagg agtcaagac cagccctggcc aacatggta
 7981 aaccccatct ctactaaaaa tactaaaaaa attagccgg gctgtggggc acacgactgt
 8041 aatcttagct acttggggagg gtgatgtggg aggatcgctt gaacttagga ggcaggagtt
 8101 gcaatggccg gagatcgccg cactgactt cagcctggg acagagcaag atccatctc
 8161 agaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aagatttag ttctggctt cctggtagcc atggcaaaaa
 8221 ggcataact gtccttctt tagccaggcc cctgtatatac agcagaggct ggaactctga
 8281 gctgtttga tttttacaaa aagccaagac aacctgtgg aagctatgg gtttaccatt
 8341 gaggctgcag gaatcttagtt cctaattatc ttcaagagacc aaaaaatgtg atgtcaagg
 8401 tcgtgaatg ttgaagtaca tgaacctggc tcgtgagacc taaatattgt actgggtgt
 8461 gggggggagg gtcattggaa tctgtggta gcctgtatc gacccggcgg ggaagggtgt
 8521 ccagatctt ggactttggg ggaccgcgt tgagccatc aatggggagca gaaatgcgg
 8581 gtcgttggaa ccccgcttggggggggccggccggatggggatggggatggggatggggatgg
 8641 accctgaata catctgggtt gggcgacaa tgcgtggctc cccacacatc tttagaaaca
 8701 catttggca acccggtggg agtgaacggc ctggc

SEQ ID NO 2

Klassische mRNA (1581..1623, 5259..5412, 5913..6196, 6317..6453)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCCTTCCTGCTGGCATCCACAGCAGCCCAGGATGGTACAAGTTGCTGGAAAGGTG
 ACGAGGTGCAACCCACTCCACGGCATGGCAAGTGGCTCTACGAGCGTGGACGCTTTAACCTGTGGCCTTCCCT
 CATCTCCCCACACTGGGTGCTGCTGCGGCCACTGCCAACAGCGCTTCATGAGAGTCCGCTGGGAGAGCACAAC
 CTGCGCAAGCGCATGGGCCAGAGCAACTACGGGACACGCTCTGGGTCTTCCACACCCCGCCTACGAAGCGCGCA
 GCCACCGCAACGACATCATGTTGCTGCGCTAGTCCAGCCGACGCCCTGACACCCCGCCTGGGTGCGCCCCCGCGTGC
 ACCCACCGCTTGCCTTACCGGG
 ACCGGCTGGGAGCCCCCGGTACAAGTGAATCTCCCAGATACGTTGATTTGCAACATCAGCATTATCTCGGACA
 CATCTTGACAAGAGCTACCCAGGGCGCTGACAAACACCATGGTGTGTCAGGGCGGGAGGGCAGAGCGCAGA
 ATCCCTGTGAGGGTGAATCTGGGGGACCCCTGGTCTGTGGGGGATCTGCAAGGGCATTTGTCCTGGGTGACGTC
 CCTTGTGACAACACCAAGCCTGGTGTATACCAAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGGATCAGGAAACCATGTA
 AGAGGAACACTGACTATTCTAGCCTATCTCTGGGGCTGACTGAGCAGAGGCCCCACAGCTGGCCAGCAGCCCCG
 CCTGACATGGAACAGAACGGGGCATCCCCAAGACCCCTGGGGCTCAAGGCCCCAGATGTTAGCCAAGGACTTGTCCCAC
 CTGAGGACAAAGCTGGCGCTCAAGGTCACTGTGTTAAATGCCAAGATAACAAAGCGCTGATCCAAGTTGCTCTGTAG
 GAATTCTGTGACTTTTTCTGGGGTCAAAGAGAAACCCCGAGACACTGTACACTGTTCTTTTCAACCCACCAACC
 CGATCCCAGGTGAGGAGAACGGGCTTGAAGCAGGGCTCATTCAACACACATGACCACCCGTGATCTTGA
 AACAAAGAGGCCAATCTCACTTCGCTTGGTTTCTTATCTGAAATGAGACCATCTATTGCTGACTTCAAAGG
 GCTGTTGTGAGGATTAATGAGATGATTGCTCTGAACACTGATTAAATCGTGTCTGGCAGTGA

SEQ ID NO 3

Struktur der KLK15 mRNA-Spleißvariante 1 (1581..1623, 5259..5412, 5913..6078, 6317..6453)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCCTTCCTGCTGGCATCCACAGCAGCCCAGGATGGTACAAGTTGCTGGAAAGGTG
 ACGAGGTGCAACCCACTCCACGGCATGGCAAGTGGCTCTACGAGCGTGGACGCTTTAACCTGTGGCCTTCCCT
 CATCTCCCCACACTGGGTGCTGCTGCGGCCACTGCCAACAGCGCTTCATGAGAGTCCGCTGGGAGAGCACAAC
 CTGCGCAAGCGCATGGGCCAGAGCAACTACGGGACACGCTCTGGGTCTTCCACACCCCGCCTACGAAGCGCGCA
 GCCACCGCAACGACATCATGTTGCTGCGCTAGTCCAGCCGACGCCCTGACACCCCGCCTGGGTGAGTCTCCCAGATACG
 TTGCAATTGTCACATCAGCATTATCTGGACACATCTGTGACAAGAGCTACCCAGGGCTGACAAACACCA
 TGGTGTGTCAGGGCGGGAGGGCAGAGGGCAGAACATCTGTGAGGGTGAATCTGGGGGACCCCTGGTGTGTTGGGG
 CATCTGCAGGGCATTTGTCCTGGGTGACCTCCCTTGTCAGAACACACCAAGCCCTGGTGTCTATACCAAAGTC
 TGCCTACTTGGAGTGGATCAGGGAAACCATGAGAGGAAACTGACTATTCTAGCCTATCTCTGTGCCCTGACT
 GAGCAGAACGGCCCCACAGCTGGGAGCAGCCCCGCTGACATGGAACAGAACGGAGCCATCCCCAAGACCCCTGTC
 CAAGGCCCCAGATGTTAGCCAAGGACTTGTCCCCACCTGAGGACAAGACTGCGCTCAAGGTCACCTGTTAATGCCA
 AGATAACAAAGCGCTGATCCAAGTTGCTCTGTAGGAATTCTGTGACTTTTCTGGGGTCAAAGAGAAACCCCGA
 GACACTGTACACTGTTCTTCAACCCACACCCGATCCCTAGGTGAGGAGAAGCGGCTTGAAGCAGGGCTCCAT
 TCATTCAACACACATGACCACCCGTGATCTGAACAAAGAGGCCAATCTCACTTCGCTTGGTTTCTTATCTG
 TAAATGAGACCATCTATTGCTGACTTCAAAGGGCTGTTGTGAGGATTAATGAGATGA

SEQ ID NO 4

Struktur der KLK15 mRNA-Spleißvariante 2 (1581..1623, 5259..5412, 5913..6196, 7127..7786)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCTCCCTGCTGGCATCCACAGCAGCCCAGGATGGTACAAGTTGCTGGAAGGTG ACGAGTGTGCAACCCCACTCCCAGCCATGGCAAGTGGCTCTACGAGCGTGGACGCTTAACTGTGGCGCTTCCCT CATCTCCCCACACTGGGTGCTGTCGGGCCACTGCAAAGCCGTTCATGAGAGTGCACCTGGGAGAGCACAAAC CTGCGCAAGCCGATGGCCAGAGCAACTACGGACCACTCTCGGGTATTCACACCCCGCCTACGAAGCGCGCA GCCACCGCAACGACATCTGGTCTGGCCTAGTCCACCCCGCACGCTGAACCCCGAGGTGCGGCCCCCGGGTGCT ACCCACCGCTGGGCCCCCAGGGCCTGTGGTGTCTGGGGCTGGTGTCCCACAACGAGCCTGGG ACCGCTGGGAGCCCCCGGTACAAGGGTACTCTGGGACCCCTGGTGTGTGGGGCATCTGCAGGGCATGGT TGCCCTGGGGTACGTCCCTGTGACAACACCAAGGCTGGTGTCTATACCAAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGG A TCAGGGAAACCATGAAGAGGAACGTGACTATTCTAGCCTATCTCCTGCCCCCTGACTGAGCAGAAGCCCCCACAGC TGGCCAGCAGCCCGCCTGACATGGAACAGAACGGCCATCCCCAACACCCTGTCACAGGCCCAGATGTTAGCC AAGGACTTGTCCACCTGAGGACAAAGTGGCCTCAAGGTACCTGTTAAATGCAAGATAACAAACCGCTGATC CAAGTTGCTCTGTAGGAATTCTGTGACTTTCTGGGTCAAAGAGAAACCCCGAGACACTGTACACTGTTCCCT TTTCACCCACACCCCCGATCCCTAGGTGAGGAGAACGGGCTCATTCAACACACATGACC ACCCGTGTGATCTGAACAGAGGCCCACACTCACTGCCCTGGTTTCCTTATCTGTAAAATGAGACCATCTTAT TGCTGACTTCAAAGGGCTGTTGTGAGGATTAATGAGATGA

SEQ ID NO 5

Struktur der KLK15 mRNA-Spleißvariante 3 (1581..1623, 5259..5412, 5913..6078, 7127..7786)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCTCCCTGCTGGCATCCACAGCAGCCCAGGATGGTACAAGTTGCTGGAAGGTG ACGAGTGTGCAACCCCACTCCCAGCCATGGCAAGTGGCTCTACGAGCGTGGACGCTTAACTGTGGCGCTTCCCT CATCTCCCCACACTGGGTGCTGTCGGGCCACTGCAAAGCCGTTCATGAGAGTGCACCTGGGAGAGCACAAAC CTGCGCAAGCCGATGGCCAGAGCAACTACGGACCACTACGGACGCTCGGGTCACTCCACACCCCGCCTACGAAGCGCGCA GCCACCGCAACGACATCTGGTCTGGCCTAGTCCACCCCGCACGCTGAACCCCGAGGTGACTCTGGGGGACC CCTGGTCTGGGGGATCTGCAGGCATTGTGTCCTGGGTGACGTCCCTGTGACAACACCAAGCCTGGT GTCTATACCAAAGTGTCCACTACTTGGAGTGGATCAGGGAAACCATGAAGAGGAACGTGACTATTCTAGCCTATCT CCTGTGCCCTGACTGAGCAGAACGCCCCACAGCTGGCAGCAGCCCGCCTGACATGGAACAGAACGGGACCATC CCCCAAGACCTGTCCAAGCCCAGATGTTAGCCAAGGACTTGTCCACCTGAGGACAAAGCTGGCCTCAAGGTC ACCTGTTAAATGCAAGATAACAAACGCTGATCCAAGTGTGCTCTGTAGGAATTCTGTGACTTTCTGGGTC AAAGAGAAACCCCGAGACACTGTGACTCTTCACCCACACCCGATCCCTAGGTGAGGAGAACGGGCTT GAAGCAGGGCTCCATTCAACACACATGACCACCCGTGTGATCTGAACAAGAGGCCCACACTCACTGCCCT TGGTTCCCTTATCTGTAAAATGAGACCATCTTATTGCTGACTTCAAAGGGCTGTTGTGAGGATTAATGAGATGA

SEQ ID NO 6

KLK15-Protein

MWLLLTLSFLLASTAAQDGDKLLEGDECAPHSQPWQVALYERGRFNCASLISPHWVLSAACQSRFMVRVLGEHN LRKRDGPEQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNQVRPAVLPTRCPHGEACVVSGLVSHNEPG TAGSPRSQVSLPDTLHCANISIISDTCDKSYPGRLTNTMVCAGAEGRGAESCEGDSGGPLVCGGILQGIVSWGDV PCNDTTKPGVYTKVCHYLEWIETMKRN

SEQ ID NO 7

KLK15-Spleißvariante 1

MWLLLTLSFLLASTAAQDGDKLLEGDECAPHSQPWQVALYERGRFNCASLISPHWVLSAACQSRFMVRVLGEHN LRKRDGPEQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNQ

SEQ ID NO 8

KLK15-Spleißvariante 2

MWLLLTLSFLLASTAAQDGDKLLEGDECAPHSQPWQVALYERGRFNCASLISPHWVLSAACQSRFMVRVLGEHN LRKRDGPEQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNQVRPAVLPTRCPHGEACVVSGLVSHNEPG TAGSPRSQG

SEQ ID NO 9

KLK 15-Spleißvariante 3

MWLLLTLSFLLASTAAQDGDKLLEGDECAPHSQPWQVALYERGRFNCAGSLISPHWVLSSAHCQSRFMVRVLGEHN
 LRKRDGPEQLRTTSRVIHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNPKQDGGPLVCGGILQGIVSWGDPVCDNTTKPG
 VYTKVCHYLEWIRETMKRN

SEQ ID NO 10

HNEPCTAG

SEQ ID NO 11

5' nicht-translatiert

1-1580

AGAATGGGTGCTGTGGGATTCAAGGGAGACACCTGTTAGGTGTTGGGCC
 TCCCAGAAGAGGTGGGGCAGAGTGTCAAGAGACAAGATGAATTGGAA
 GATATGGGAAAGAGGATTTCAATTCAACCTCAAAGCTTCTGAGGCC
 CCGTGGGTCGGGCCCTGCAGTACTGGAGACCCAGAGTGGAGTCAGACCA
 CTCCTGGGAGCTGCCAGTCTCGTAGGGAGGCAGACACCACTGAGGGT
 CAGGGAGGTCAAGAGAAGGCCAAGGAGGAAGCGGGCTGGAAGGGAAAT
 GCGTGGATATGGGAGGAATAGCTAAGCATGAAATGGCAGGAG
 GGAAATGGCAGCACTGGCTGCTAGGACAAGGTCAATGGAGACCCAG
 GGAGAGGGCTGGAAGGGAAAGAAGCCACTTTGTCCTGAAAGTGAGGCT
 GGAGCCAGGCAACTCATGCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCTGAGGC
 GGGTGGATCACTAGGGTCAAGACCCAGGCTGGCAACATGGT
 GAAACTCCGCTCTACTAAAATTACAAAATTAGCTGGGCTGGTGGCAC
 ACACCTGTAATCCCATTGCTGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCTCTTGA
 ACCCAGAAGGAGGTTACAGTGAGGAGACATGCCACTCCACTCCA
 ACCTGGGCTACAGGCCAGACTCCGTCCTCAAAAAAAAAAAAAAGAA
 AAAAAGAAAGAAAGTGAATTGAAGAGCTGGACTTTATCTGGTGGTG
 CCAAGGATCCATGGGGTGGTGAGCAGGGAGGGCACAGCCAGCTCCA
 GATGTAGAAAGACCTTTGGGCTCATGGCTGGAGGGCAAGCTGGTGGAGG
 GGACTGGACTGGAGGGGACCCAAAAGGCCAGATAAGAGGGTTGAGATAG
 ACCAGGCGCGTGGCTCATGCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCGAG
 GTGGGTGGATCATGAAGTCAAGAGATTGAGGCATCCTGGCTAACACGGT
 GAAACCTGCTCTACTAAAAAAATTCCAAAAAAATTAGCCGG
 CACGGTGGTGGGCCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGC
 GAATGGTGAACCTGGGAGGTGGAGCTGAGCTGAGCCACATTGTGCC
 ACTGCACTCCAGCTGGGTGACAGAGTCAAGACTCCGTCCTCAAAATAA
 AAAAAGTGGGACAGGGGTCTTGGCTGATGATGGAGAGAGATCCACCC
 GCTGGTAGCATGGTGTGGAGGCTGACAGGTGGAGGAGGTGGGAGGGT
 CTGTCAGTGCCTAGAGGAAGAGTAAACCTTCCAGAGATGGGGACCC
 GAAGGAAGCGCAGAGTGGGTTGGGAAGGGATACCGGTGGTCAGAAG
 AAATTATTAAACAGTGGATGGGATAAGTCTGTCCTGGAGGGATCTGGT
 GGAGGAGAAGGGTCTGCCCTACCTGGATTCTCACTCCCCAGA
 CTGCAGCGAACCTGGTCCCTCCACA

SEQ ID NO 12

Exon 1

1581-1623

ATGTGGCTCTCCTCACTCTCTCTGCTGGCATCCACAG

SEQ ID NO 13

Intron 1

1624-5258

SEQ ID NO 14

Exon 2

5259-5412

CAGCCCCAGGATGGTGACAAGTTGCTGGAAGGTGACCGAGTGTGCACCCCCACTCCAGCCATGGCAAGTGGCTCTA
CGAGCGTGACGCTTTAAGTGTGGCGCTTCCCTCATCTCCCCACACTGGGTGCTGTCGCGGCCACTGCCAAAGC
CG

SEQ ID NO 15

Intron 2

5413-5912

GTATGAAGGCAGGGGCTCAGGGCTTGAGGGACCTGGTCGGGGGAAGAGCTCCTAGATTTGGGGAAAGACGGA
GGCAGACGCCAGAACCTCTGGTTCTGAAAGACGAGGAGGGCGATGTCAAGCCCCCTGGGTTAGGAAGGAGTGTG
GTTTCAAAGCCTCGATCTCTGAAGGAGGAAGGAGACTAGTCCAGCTTGAGCCTCAGTTCTAGGGATGTG
AGAACCTGGATTGGGGACAGACCAGGAGGGCTGGGAGTAGTTGGAGGGATCGAGTTCTAGGAGTGTGCTG
ACTTCAGACTCGTGGTCTTGAGGAGCAGGGCTGGAACCATGGCTTCAGGGCTTGGAAAAGGTAATGGGAT
GTCGAGATTCTAAAGGGTCGGAGACCTGGTTGCCACTCTTGATCTTCTGTCCCTACTTGGGGTAACC
ACTGGCCGCACTCACTGGGGAAAACCACTCGCCCGCACAG

SEQ ID NO 16

Exon 3 (Klassische und Spleißvariante 2)

5913-6196

cttcatga gagtgcgcct gggagagcac aacctgcgca agcgcgatgg cccagagcaa ctacggacca
cgtctcggtt cattccacac ccgcgcacg aagcgcgcag ccaccgcaac gacatcatgt tgctgcgcct
agtccagccc gcacgcctga accccaggt gcccgcgcgt tgctaccca cgcgttgcgc caccgggg
gaggcctgtg tgggtctgg ctggggcctg gtgtccaca acgagcctgg gaccgcgtgg
agcccccgtt cacaag

SEQ ID NO 17

Intron 3 - Klassische und Spleißvariante 2

6197-6316

tgc gtgaaaggat ggagctggat gcgaggcctc aaggaatccta tgctccaggg ctcttggcg
gaggggaca agggccggaa ttatggatc tgctccaagtccactgtctt cccag

SEQ ID NO 18

Exon 3 - (Spleißvarianten 1 und 3)

5913-6078

CTTCATGAGAGTGCCTGGAGAGCACAAACCTGCGCAAGCGCATGGCCAGAGCAACTACGGACCACGTCTCG
GTCATTCCACACCCCGCTACGAAGCGCGACCACGACATCATGTTGCTGCCCTAGTCCAGCCCGCAC
GCCTGAACCCCGAGGTGGCCCCCGCGGTCTACCCACCGTGGCCCCACCCGGGGAGGCCTGTGTGGTCTGG
CTGGGCTGGTCCCACAACGAGCCTGGGACCGCTGGGAGCCCCGGTCACAAG

SEQ ID NO 19

Intron 3 - (Spleißvarianten 1 und 3)

6079-6316

GTGCGTAAAGGATGGAGCTGGATGCGAGGCCTCAAGGAATCTATGCTCCAGGGCTTGGCGGAGGGACAAG
GGCCGAATTATGCACTGCTCAAGTCCACTGTCTCCCCAG

SEQ ID NO 20

Exon 4

6317-6453 (Klassische und Spleißvariante 1)

TGAGTCTCCCAGATACTTGCATTGTGCCAACATCAGCATTATCTGGACACATCTTGACAGAGCTACCCAGG
GCGCCTGACAAACACCATGGTGTGCAGGCGCGAGGGCAGAGGCGCAGAACCTGTGAG

SEQ ID NO 21

Intron 4 (Klassische und Spleißvariante 1)

6454-7126

GTCAGAGCCTAGAGGGGCCATCAGCGGAAGAAGAGGGATGGGACAGGTGTGGAGTCGGATGGGTTGGATTTCTTTGCTTGGGCTAGAGAAGATGCTAGGGTTAGGCTTGAGATGGAGTAGGAAGAGAAGTTAGAATAGGGTGA
GGTGGAGTTGGGTTATAGGTGGGATTGCGTGTGAGGCTGATAACTGTGATAGTTAGTTGAGATGCCATG
GGTGGGGTTGAGAATGGGAATGGTTGGTGTGATTCGGTGGGAAATACGTCAGGGITGAATTGGGATGAGGTA
GATTTGTTGGAATGCAAGAACATGAAGATTGAGATTGGATTTGAGATGGGATGGGTTGATTTGAGATTGAGATAT
ATGGTGGAGATGTGGCTGAGTTAACCTAGTACAGTGCACATGGACTGGCATGGGGTGAGATTGAGATAT
AGGTGGGTGAGTGTATTGAGCTGTGTTGAATTGGGTTGGGTTGGCTGTGTTGGGATAAAC
TGGCCTGTATTGAGTTGAGTTGGGTTGGGATGGGATGGATTGGGTTGGGATGAGATTGCAAATG
GTGATTAGGATGAGGATGAATCCAGGAGGTTCACTCACCTGAGACCCCCCTTTCCCCACAG

SEQ ID NO 22

Intron 4 (Spleißvarianten 2 und 3)

6079-7126

T GCGCCCCCGCG GTGCTACCCA CGCGTTGCC CGACCCGGGG GAGGCCTGTG TGGTGTCTGG
CTGGGCCCTG GTGCCCACA ACGAGCCTGG GACCGCTGG AGCCCCGGT CACAAGGTGC GTGAAAGGAT
GGAGCTGGAT GCGAGGCTC AAGGAATCTATGCTCCAGG GCTCTTGGC GGAGGGACA AGGGCCGGAA
TTTATGGATC TGCTCCAAGT CCACTGTCCTT CCCCAGTGAG TCTCCAGAT ACGTGCATT GTGCCAACAT
CAGCAATTATC TCGGACACAT CTTGTGACAA GAGCTACCCA GGGGCCCTGA CAAACACCAT GGTGTGTGCA
GGCGCCGAGG GCAGAGGCGC AGAATCTGT GAGGTCAGAG CCTAGAGGGG CCATCAGGCG GAAGAAGAGG
ATGGGACA GGTGTGGGAG TCCGGATGGG GTTGGATTTT CTTGCTTG GGCCAGAGAA GATGCTAGGG
TTAGGCTTGG AGATGGAGTA GGAAGAGAAAG TTAGAATAGG GGTGAGGTTG GAGTTGGGTT TATAGGTGGG
GATTGCGTTG TTTGAGGTGG ATAAGTGTGA TAGTTAGTT GAGATGCCAT GGGTTGGGTT TGAGAATGGG
AATGGTTGG TTTGATTCTC GGTGGGAAAT ACGTCAGGGT TGAATTGGGA TGAGGTAGAT TTTGTTGGGA
ATGCAGAAGA CATGAAGATT GAGATTGGGAT TTTGAGATGG GCATGGGTTT GATTGATTT TGAATGGTGA
GGATGTGGG TGAGTTGGAT TTAACCTAGT ACAGTTGCAC TGGACTTGCA TGGGGTGAG ATTTGATATA
GGTTGGGTGA GTTGTATTGA GCTGTGTGAA ATTGGGTG TGAGTTGGGTT TGGGGTGGCT CTGTTTGGGA
TAAACTGGGC TGTATTGAGT TGAGTTGGGTT TGGGGTTCC TGGGATGGGG ATGGATTGGG TTTGGGGTGA
GATTGCAAAT GGTGATTAGG ATGAGGATGA ATCCAGGAGG TTTCACTCAA CCTGAGACCC CCTCTTTCC
CCACAG

SEQ ID NO 23

Exon 5

7127-7786

GGTGACTCTGGGGGACCCCTGGCTGTGGGGCATCCTGCAGGGCATGGTGTCTGGGTGACGTCCCTTGAC
ACACCAACGCCCTGGTCTATACCAAAGTCGCCACTACTGGAGTGGATCAGGGAAACCATGAAGAGGAACCTG
ACTATTCTAGCCTATCTCTGTGCCCTGACTGAGCAGAAGCCCCACAGCTGGCAGCAGCCCCGCTGACATGG
AACAGAACGGAGCCATCCCCAAGACCCGTCAAGGCCAGATGTTAGCCAAGGACTTGTCCCACCTGAGGACAA
AGCTGGCCCTCAAGGTACCTGTTAATGCCAAGATAACAAAGCCTGATCCAAGTTGCTCTGAGGAATTCTGT
GACTTTTCTGGGCTAAAGAGAAACCCGAGACACTGTGACTGTCCCTTCAACACACATGACCAACCCGATCCCTAG
GTGAGGAGAACGGGCTTGAAGCAGGGCTCATTCAACACATGACCAACCCGATGATCTGAACAAAGAGGC
CCAATCTACTTCGCCCTGGTTCCATTCTGAAATGAGGACATCTTATTGACTTCAAAGGGCTGGTGA
GGATTAATGAGATGATTGCTGAATGATTAATCGTGTGGCACTGA

SEQ ID NO 24

7127-7279

GGTGACTCTGGGGGACCCCTGGCTGTGGGGCATCCTGCAGGGCATGGTGTCTGGGTGACGTCCCTTGAC
ACACCAACGCCCTGGTCTATACCAAAGTCGCCACTACTGGAGTGGATCAGGGAAACCATGAAGAGGAACCTG
A

SEQ ID NO. 25

Zyme

MKKLMMVVLSLIAAAWAEQQNKLVHGGPCDKTSHPYQAALYTSGHLLCGGVLIHPLWVLTAAHCKKPQLQVFLGKHN
 LRQRESSQEQQSSVRAVIHPDYDAASHDQDIMLLRLARPAKLSLEIQPLPLERDCSANTTSCHILGWGKTADGDFP
 DTIQCAYIHLVSRECEHAYPGQITQNMLCAGDEKYGKDSCQGDSGGPLVCGDHLRGLVSWGNIPCGSKEKPGVYT
 NVCRTNWIQKTIQAK

SEQ ID NO. 26

KLK-L4

MWPLALVIASTLALSGGVSQSSKVLNTNGTSGFLPGGYTCFPHSQPWQAALLVQGRLLCGGVLVHPKWLTAAH
 CLKEGLKVYLGKHALGRVEAGEQREVVHSIPHPEYRRSPTHLNHDHNDIMLLELQSPVQLTGYIQTPLSHNNRLT
 PGTTCRVSGWTTSPQVNYPKTLQCANIQLRSDEECRQVYPGKITDNMLCAGTKEGGKDSCEGDSGGPLVCNRTL
 YGIVSWGDFPCGQPDRCGVYTRVSRYLWIRETIRKYETQQQKWLGPQ

SEQ ID NO. 27

KLK-L6

MFLLLTALQVLIAIAMTQSQEDENKIIGGHTCTRSSQPWQAALLA
 GPRRRFLCGGALLSGQWVITAACGRPILQVALGKHNLRRWEATQQVLRVVRQVTHPNYNSRTHDNDLMLLQLQOP
 ARIGRAVRPIEVTQACASPGTSCRVSGWTISSLPIARYPASLQCVNINISPDDEVCKQAKAYPRTITPGMVAGVPQGG
 KDSCQGDGGPLVCRGQLQGLVSWGMERCALPGYPGVYTNLCKYRSWIEETMRDK

SEQ ID NO. 28

TLSP

MQRLRWLRDWKSSGRGLTAKEPGARSSPLQAMRILOLILLALATGLVGETRIIKGFECKPHSQWPWQAALFEKTR
 LLCGATLIAPRWLLTAAHCLKPRYIVHLGQHNLQKEEGCEQTRTATESFPHPGFNNSLPNKDHRNDIMLVKMASPV
 SITWAVRPLTLSSRCVTAGTSCLISGWGSTSSPQLRLPHTLRCANITIIEHQKCENAYPGNITDTMVCAVQEGGK
 DSCQGDGGPLVCNQSLQGIISWGQDPCAITRKPGVYTKVCKYVDWIQE

SEQ ID NO. 29

KLK-L3

MKLGLLCALLSLLAGHGWDTRAIGAECRPNSQPWQAGLFHLTRIFCGATLISDRWLLTAAHCRKPYLWVRLGEH
 HLWKWEGPEQLFRVTDFPHPGFKDLSANDHNDIMLIRLPRQARLSPAVQPLNLSQTCVSPGMQCLISGWGAVS
 SPKALFPVTLCANISILENKLCHWAYPGHISDSMLCAGLWEGGRGSCQGDSGGPLVCNGTLAGVVSAGAEPCSR
 RRPavytSvCHYLDWIQEIMEN

SEQ ID NO. 30

NES1

MRAPHILHLSAASGARALAKLLPLLMAQLWAAEAALLPQNDTRLDPEAYGAPCARG SQPWQVSLFNGLSFH
 CAGVLVDQSWVLTAHCNKPPLWARVGGDH LL-LLQG-EQLRRRT RSVHPKYHQGSGPI LPRRTDEHDIML
 LKLARPVV-PGPRVR ALQLPYR-CAQPGDQ CQVAGWGTTAARRVK YNKGLTCSSITILSP
 KECEVYFPGVVTNNM ICAGLDR-GQDPCQS DSGGPLVCDETLQGI LSWG-
 VYPCGSAQHPAVYTQICKYMSWINK VIRSN

SEQ ID NO. 31

KLK-L5

MGLSIFLLLCVLGLSQAATPKIFNGTECGRNSQPWQVGLFEGTSLRCGGVLIDHRWVLTAAHCSGRYVWRGEHS
 LSQLDWTEQIRHSGFSVTHPGYLGASTSHEHDLRLRLPVRVTSSVQPLPLPNDCATAGTECHVSGWGITNHPR
 NPFPDLLQCLNLSIVSHATCHGVYPGRITSNMVCAGGVPQGDACQGDSGGPLVCGGVLQGLVSWGSVGPQGDGIP

GVYTYICKYVDWIRMMRNN

SEQ ID NO. 32

Neuropsin

MGRPRPRAAKTWMFLLLGGAWAGHSRAQEDKVLGGHECQPHSQWPWQAALFQGQQLLCGGVLVGGNWVLAAHCKKPKYTVRLGDHSLQNKGDPPEQEIPVVSIPHPYCNSSDVEDHNHDLMLLQLRDQASLGSKVCPISLADHCTQPGQKCTVSGWGTVTSPRENFPDTLNCAEVKIFPQKKCEDAYPGQITDGMVCAGSSKGADTCQGDGGPLVCDGALQGITSWGSDPCGRSDKPGVYTNICRYLDWIKKIIGSKG

SEQ ID NO. 33

PSA

MWVPVVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSILLGRHNSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPDDSSHDLMLLRSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTCYASGWSIEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCGDGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP

SEQ ID NO. 34

HK2

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHC GGVLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEPDGTQRPVPVSHSFPHPLYDMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRSEPAKITDVVKVLGLPTQEPA LGTTCYASGWSIEPEEFLPRPSLQCVSLLHNSNDMCARAYSEKVT EFMLCAGLWTGGKDT CGDGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP

SEQ ID NO. 35

HK1

MWFVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGWECEKHSQPWQAA LYHFSTFQCGGILVHRQWLTAAHCISDNYQLWGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPA DTTIDAVKVELPTEEVGSTM CLASGWSIEPENFSFPDDQLQCVDLKILPNDECKKAHVQKVTFMCLCVGHLEGGKDT CGDGGPLMCDGVQLQGVT SWGYVPCGTPNPKPSVAVRVLSYVWIEDTIAENS

SEQ ID NO. 36

KLK-L2

MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSRIINGSDCDMH TQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHGYSHPGHSN DLMLIKLNRRIRPTKDVRFINVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDT MFCAGDKAGR DSCQGDGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO. 37

Prostase

MATAGNPWGWFGLGYLILGVAGSLVSGSCSQIINGEDCSPHSQPWQALVMENELFCSGVVLVHPQWLSAAHCFQNS YTIGLGLHSLEADQEPGQSMVEASLSVRHPEYNRPLL ANDLMLIKLDES VSSDTIRSISIASQCPTAGNSCLVSGW GLLANGRMPTVLQCVNVSVVSEEVCSKLYDPLYHPSMFCAGGGHDQKDSCNGDGGPLICNGYLQGLVSFGKAPCG QVGPGVYTNLCKFTIEWIEKTVQAS

SEQ ID NO. 38

HSCCE

MARSLLPLQILLSLALETAGEEEAQGDKIIDGAPCARSHPWQVALLSGNQLHCHSCCEGGVLVNERWVLTAAC
KMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVS
GWGTTTSPDVTFPDLMCVDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVS
WGTFCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTMKKHR

SEQ ID NO 39

CACAAACGAGCCTGGGACCGCTGGG

SEQ ID NO 40

ATTAAA

SEQ ID NO 41

Tabelle 1 KLK1-A

ATCCCTCCATTCCCATCTTT

SEQ ID NO 42

Tabelle 1 KLK1-B

CACATACAATTCTCTGGTTC

SEQ ID NO 43

Tabelle 1 KLK2-A

AGTGACACTGTCTCAGAATT

SEQ ID NO 44

Tabelle 1 KLK2-B

CCCCAATCTCACGAGTGCAC

SEQ ID NO 45

Tabelle 1 E5-A

GTCGGCTCTGGAGACATTTC

SEQ ID NO 46

Tabelle 1 E5-B

AACTGGGAGGGTTGAGTC

SEQ ID NO 47

Tabelle 1 KLK15-F1

CTCCTTCCTGCTGGCATCCA

SEQ ID NO 48

Tabelle 1 KLK15-R1

ATCACACGGGTGGTCATGTG

SEQ ID NO 49

Tabelle 1 KLK15-F2

CAAGTGGCTCTCTACGAGCG

SEQ ID NO 50

Tabelle 1 KLK15-R2

GACACCAGGCTTGGTGGTGT

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Mount Sinai Hospital

Yousef, George, M.

Diamandis, Eleftherios, P.

<120> Kallikrein-Gen

<130> 3153-256

<140> PCT/CA01/01141

<141> 10.08.2001

<150> US 60/224,853

<151> 11.08.2000

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8735

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1		
agaatgggtg ctgtgggatt cagggagac acctgttagg tttggggcc tcccaagaaga	60	
ggtggggca gagtgtcaga ggacaaagat gaatttggaa gatatggga agaaggattt	120	
caattcaccc tcaaagcttc ctgaggcctc ccgtgggtcg ggccctgcag tactggagac	180	
ccagagtgg atcagaccag ctctcgaaa agctgccagt ctctgtgggg aggccagacac	240	
cactgagggt cagggaggt cagagaaggc ctcaaggagg aagcggggct ggaaggaaat	300	
ggcggtggat atgcgggtgg aggaatagcc taagcatgaa atggcaggag ggaaaatggc	360	
agcactggct gcgtcttagga caaggtcatg ggagacccag ggagaggggc tggaaaggaa	420	
gaagccactt ttgtccttga aagtgggtt ggagccaggc aactcatgcc tgtaatccca	480	
gcactttggg aggctgaggc gggtggatca cttagggatca ggatgtcaag accagcctgg	540	
ccaaacatggt gaaactccgt ctctactaaa attacaaaaa ttagctgggc gtgggtggcac	600	
acacctgtaa tcccaattgc ttggggaggtt gaggcaggag aatcttttgc acccagaagg	660	
cagaggttac agtgagcggaa gatcacgcca ctccactcca acctggctt cagagccaga	720	

ctccgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaagaa aaaaaaaagaa agaaagtgaa tttgaagagc	780
tggactttat cctgggtgtg ccaaggatcc atggagggtg gtgagcaggg gaggggcaca	840
gccagctcca gatgtagaaa gacccttgg ggtcatggct ggagggcaag ctggtgagg	900
ggactggact ggagggggac caaaaggcc agataagagg gttgagatag accaggcg	960
gtggctcatg cctgtaatcc cagcacttg ggaggccgag gtgggtggat catgaagtca	1020
agagattgag gccatcctgg ctaacacggt gaaaccctgt ctctacttaa aaaaaaaaaa	1080
tttccaaaaa attagccggg cacgggtgtg ggcgcctgta gtcccagcta ctggggaggc	1140
tgagggggga gaatgggtgtg aacctggag gtggagctg cagtgagccg acattgtgcc	1200
actgcactcc agcctgggtg acagagttag actccgtctc aaaaaataa aaaaagtgg	1260
gacagggggc ccttgcgtga tgatggagag agatccaccc gctggtagca tggctggaa	1320
ggctgacagg tggaggagggt ggggcagggt ctgtccgagt gcctagagga agagtaaacc	1380
ttccagagat gggggaccga gaaggaagcg cagagtgggg ttggggggaa gggataccgg	1440
tggtcagaag aaatttatta acagtggatg ggataagtct gtgtctggag ggatcctgg	1500
ggagggcagaa gggtcctgcc tcacctggat tctctcaactc cctccccaga ctgcagccga	1560
accctggtcc ctccctccaca atgtggcttc tcctcaactt ctccttcctg ctggcatcca	1620
caggtgaggt ggccccagga gggggccagg tctgtggag caggtgcccc ctccccaaagc	1680
atgtctgggc ccagtgtatc gcacccctt acctcaccctt gagaccacta aagatccttc	1740
cttcaccctc cacctgtgcc aatgtcccta agcccttacc gtcaggtgtc ggtgtgtc	1800
ctctggagtc gctatgtgc ctggggccctc tcgtgtccca cgacaaggaa cacggctctg	1860
gggttacaca aacctgagct gagtcctggg gcaaccgtt cttgtgtg tgcccttgag	1920
ggaactgttt cacctctctg ggcttcgaat gccttctcta taagacagca cccacttgag	1980
acaataacag tgaggtctca atagcataac agaggtataa tacatagcaa gcattagaca	2040
agtgtctgaga gccaacacgc acagacagac tccagcttga gtcccacacc tgccactccc	2100
tgtctttac agggtctttg agggattaa atgtgttgt gtgtgaggca gaagcataag	2160
cctggcccag gtagtgccttca ttcaggtgtg caagccaggg acgggtgttta gagcttacat	2220
acaacgtctca tgggtgggttgc gcaccaccga cctcatttga caagggaaagg ggctgtggct	2280
cagagggacg gccacaacat caaggtcacc ttgggtgtca ggcaaaactcc agattgaact	2340
cagctgccac acaccaagaa attaattgtt acctgtatcc tctttctgg agaaattggg	2400
gggtggactt tcattaacgt tctgcaccaa atgaccctca ctcctggggg cccctgagac	2460
ccccacgcctt ccaggctccc ctccggctct ctctgtgcac tcacctaccc gcctcgcc	2520
tgcctgtgc gcccagctgg ggctccacc ttcctctggc ttggactggc caggtgcagc	2580
ctcggtgccc agctgtttag cccgtaccccttccg gaggacgacc tcacccttcc	2640
tttgttaagc ccctgttca ccacatccgc attccctgg ttcacgggg gccttggcc	2700
cagttcctga ctgtgtatggg gagagtgtgg gcattggc tggctgtgca aatcctgccc	2760
ctgtgtgggt gggagtgtgc atggcttcaa cttcagggg atgcacccac attgcccagt	2820
ggagaggggt cctggtcctg tgaccttcaa tgcctctaat catgtcctta agcataatgc	2880
cattctgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtacatgcac gtgtgcagt ggtataacaag	2940
ccccctgtatg ttccacatccct tcaccatgc atgagccaga tccccatatg tgaaacccaa	3000

t.cagtgactc cacagatctg gcttgggggc tgatctagag atggataaat atgtccctgcc 3060
ctggctgcct ctggcttcag ctgcatgtct ttgacattga atgcccagcc cctgtctgg 3120
gtgctgcccc agacagcaag tccacatctg agtgtggcc ttctgggtt gttgtctgcag 3180
ctcttaactct acaaaatgtc ttgtgggtga atcacggttt taacatttgcac ttttttttgt 3240
ttgtttggtt ttttttggaa cggagtcctcg ctctggccca caagctggag ttcagtggtg 3300
caacctcagc tcactgcaac ctccgcctcc caggttcaag caattctgtc tctgcctccc 3360
gagtagctag aattacaggc acgcaccacc acgcccagct gatttttgtt ttttttattta 3420
tttattttattt ttttttttag tagagacggg atttcacatgt gttggccagg ctggctctcaa 3480
actcctgacc tcaggtgatc cacccaccc ggcctggcc tcccaaagtg ctgggattac 3540
aggcgtgagc caccacaccc ggcacaccc gactattttat tataaggtaat tctgtgcaga 3600
tgtctgactt atgttggcca tctccaggat ggacctgaac tttcacatgt atgtccctgt 3660
gactaaatcc aggtgtcatt tgcaaaaaac aactaatattt attaagttagc taccagggt 3720
aggtatcact caccatacat acacacatgc acacacacac atacacatcc ctacctcatc 3780
cttacaacaa tcttcattttt acagatgagg aaacagaggc acagacagggt cgaataactt 3840
actcaaagtt tcacagctag tacattcgaa cccaggctta aggacccatc tttgtccaga 3900
ccctgtatgc aagtgtctgt gacactggat gccaagactc acactagaga ttttgaattt 3960
aggtctgaac aatatccat tctgtgtgt tgtttgc tgcattgtgtg tttgtgtatg 4020
tatttcattgtc ttaaccatcc atattcatat acacatatga acatctgtgc tttgtattttt 4080
ttttttttttt tttttttttt tttgagatgg agtttcaatc ttgtcaccctt ggctggagtg 4140
caatggagca acctccgctc actgcaatct ccgcctcccg gttcaagcg atttccctgc 4200
ctcagccctcc agagtagctg ggattacagg cacccgcac catgcccagc taattttttt 4260
tattttgtt agagacagggg tttccctata ttggccaggg tggctcgaa ctccctgaccc 4320
caggtgatcc acccgccctcg gcctcccaa gtgctggat tacaggcatg agccaccgtg 4380
cccagccctgt gctgtgattc ttgaagctgc aacccatgtc catgcaagtg aatttcagct 4440
tccagtcctg tccatagctg tacctaaatgtg tggaaagctgg atgtcatgt atgcattgtcc 4500
atgaccttgt atagccacat ctgggactca tactgcacac ttttttttttgc tgacatgtcc 4560
agactctggg gccaaggctg ggtcacacat actgagttggc cacatgcgtt tgacgtctgt 4620
gacaatttgg tgaccgtgaa tgactggttt caagtgcacca cctgtctgaa cctgtatccca 4680
gtgccccctgt ctccacccccc aaccacagag gacttcttgc cctctggctt gttcccttc 4740
ctctctctcc cagagtctta tagcaaatgg ggtggggct agagttctgg agaaaacagg 4800
cagcggttgtt aaataaaacaa cagggcagggc ggagcatggt ggctcacacc tttttttttt 4860
gcactttggg aggctgagggc gggcagagca tttgaagtcga gaagttttagt actacctggc 4920
taacatggtg agacctcgtc tctactaaaa atacaaaaat tagccaggtg tgggtggccggg 4980
cacctcagct actcgggagg ctgaggcagg aggatcactt gaacccagga ggcggaaagtt 5040
qcgagtggact gagatcatgc cactgcactc cagccctggcc aaaagagtga gactccgtct 5100
caaaaacaac aacaacaaca aaacaaaaaa cagggcaggg ttttttttttggaa agtttagggg 5160
aaggcatagg catatagtag tttagggcagg gttcaagggaa qgtqtaqqqag qcaatgtaaa 5220

cgtccctgtc ctcaggcatc ctctacccct tctcttagca gcccaggatg gtgacaagtt 5280
 gcttggaaat gacgagtgtg caccccaactc ccagccatgg caagtggctc tctacgagcg 5340
 tggacgcttt aactgtggcg cttccctcat ctccccacac tgggtgctgt ctggggccca 5400
 ctgccaaagc cggttatgaag gcaggggctc agggtcctga gggagcctgg ttcgggggga 5460
 agagctccta gatttggggg aagacggagg cagacggcg aactcttggg ttctgaaaga 5520
 cgaggaggcc ggatgtcaag cccctgggtt aggaaggagt gtgtgtttca aageccttcga 5580
 tctctgaagg aggaaggaga agacttagtc cagctttga gcctcagttc tagggatgt 5640
 agaattctgg attcggggac agaccaggag ggggctggga gtagttggag gggatcgagt 5700
 tctaggagtg tgcctgactt cagactcgtt ggtcctttag gaggcagggc tggaaaccatt 5760
 ggcttcaggg tcttgggaaa aggtaatggg atgtcgagat ttctaaaggg tcgggagacc 5820
 tcgggttgcc cactcttga tctttctgtc ctctacttgc gggtaaccac tggcccgac 5880
 tccactggcg gaaaaaccac tcgccccac agcttcatga gagtgcgcct gggagagcac 5940
 aacctgcccac agcgccatgg cccagagcaa ctacggacca cgtctcggtt cattccacac 6000
 ccgcgcctacg aagcgccgacg ccaccgcaac gacatcatgt tgctgcgcct agtccagccc 6060
 gcacgcctga accccccaggc ggcgcgcgc gtcgtaccca cgcgttgccc ccaccgggg 6120
 gagggctgtg tgggtgtctgg ctggggctg gtgtcccaca acgagcctgg gaccgctggg 6180
 agccccccgtt cacaagggtgc gtgaaaggat ggagctggat gcgaggcctc aaggaatcct 6240
 atgctccagg gctttgggc ggaggggaca agggccggaa tttatggat tgctccaagt 6300
 ccactgtctt cccccaggat tctcccagat acgttgcatt tgcccaacat cagcattatc 6360
 tcggacacat ttgtgacaa gagctaccca gggcctga caaacaccat ggtgttgca 6420
 ggcgcggagg gcagaggcgc agaattctgt gaggtcagag cctagagggg ccatcaggcg 6480
 gaagaagagg gatggggaca ggtgtggag tccggatggg gttggatttt ctgttgcctt 6540
 ggccagagaa gatgttaggg ttaggcttgg agatggagta ggaagagaag tttagaatagg 6600
 ggtgagggtt gagttgggtt tataagggtgg gattgcgtt gttgagggtgg ataactgtga 6660
 tagtttagttt gagatggcat gggttgggtt tgagaatggg aatggtttgg tttgatctg 6720
 ggtggaaat acgtcagggt tgaattggg tgaggttagat tttgtttgg atgcagaaga 6780
 catgaagatt gagattggat tttgagatgg gcatgggttt gatttggat tgaatgggtga 6840
 ggatgtgggc tgagttggat ttaacttagt acagttgcac tggagttgca tgggggtgag 6900
 attggatata ggttgggtga gttgtattga gctgtttga attgggggtt gggttgggt 6960
 tgggttggct ctgtttggga taaactgggc ttttggat ttttgggtt tgggggttccc 7020
 tggatgggg atggattggg tttgggttga gattgcaaat ggtgatttagg atgaggatga 7080
 atccaggagg tttcactcaa cctgagaccc cctctttcc ccacagggtg actctggggg 7140
 accccctggtc ttttggggca ttttggggca ctttgggttcc tgggggttgcg ttttgggttgc 7200
 caacaccacc aaggctgggtg ttttgggttgc ttttgggttgc ttttgggttgc ttttgggttgc 7260
 aaccatgttgggg atggatggg ttttgggttgc ttttgggttgc ttttgggttgc ttttgggttgc 7320
 ccccccacat gggccaggcgc cccgcctgac atggaaacaga acggagccat cccccaagac 7380
 cttgttcaag gcccaggatgt tagccaaatggg ttttgggttgc ttttgggttgc ttttgggttgc 7440
 cttgttcaag ttttgggttgc caagataaca aaggctgtat ttttgggttgc ttttgggttgc 7500

ttctgtgact	tttttctggg	gtcaaagaga	aaccccgaga	caactgtacac	tgttcctttt	7560
caccaccac	cccgatccct	aggtgaggag	aagcggcttg	aagcagggtct	ccattcattc	7620
aacacacatg	accacccgtg	tgatcttcaa	caagaggccc	aatctcactt	cgccctggtt	7680
tccttatctg	taaaatgaga	ccatcttatt	gctgacttca	aagggtgtt	gtgaggatta	7740
aatgagatga	ttcgtctgaa	ctgattaaaa	tcgtgtctgg	caactgagtaa	ataccctcta	7800
tctctggatc	ccagttaaag	gacctaacag	acactagatt	accaagaatg	gttttttttt	7860
taaggtttag	ttctggggccg	ggcatggtgg	ctcacacctg	taatcccagc	actttgggag	7920
gccaaggccg	gcccgtcact	tgaggtcagg	agtgcacac	cagcctggcc	aacatggtga	7980
aacccatct	ctactaaaaaa	tactaaaaaa	atttagccgg	gcgtggtggc	acacgactgt	8040
aatcctagct	acttgggagg	gtgatgtggg	aggatcgctt	gaacttagga	ggcaggagtt	8100
gcagtgagcc	gagatcgcgc	caactgcactc	cagcctggtg	acagagcaag	actccatctc	8160
agaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaagatttag	ttctgggtt	cctggtagcc	atggcaaaaa	8220
ggcaaatact	gtccttcct	tagccaggc	cctgatatac	agcagaggct	ggaactctga	8280
gctgcttga	ttttaccaaa	aagccaagac	aacctgttgg	aagcctatgg	gtttaccatt	8340
gaggctgcag	gaatcttagtt	cctaatttac	ttcagagacc	acaaaaatgtg	atgttcaagg	8400
tgcgtgaatg	ttgaagtaca	tgaacctggc	tcgtgagacc	taaatattgt	actgggtggtg	8460
ggggggaaagg	gtcattggaa	tctgtggta	gcctgatctt	gacctgcgag	ggaagggtgt	8520
ccagatctct	ggactttgga	ggaccgacgt	tgagcaccat	aatgggagca	gaagtgcgag	8580
gtctttgaga	ccccgttgt	tggggccggcg	ccggattttgg	atgctaaaaaa	ttacctggga	8640
accctgaata	catctgggtt	gggcgcacaa	tgtgtggctc	cccacacatc	tttaggaaca	8700
catttggca	acccgggtggg	agtgaacggc	ctggc			8735

<210> 2

<211> 1278

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2	atgtggcttc	tcctcaactct	ctcccttcctg	ctggcatcca	cagcagccca	ggatggtgac	60
	aagttgctgg	aaaggtaacga	gtgtgcaccc	cactcccagc	catggcaagt	ggctctctac	120
	gagcgtggac	gctttaactg	tggcgcttcc	ctcatctccc	cacactgggt	gctgtctgcg	180
	gcccactgcc	aaagccgctt	catgagagtg	cgcctggag	agcacaacct	gcgcaagcgc	240
	gatggcccag	agcaactacg	gaccacgtct	cgggtcattc	cacacccgcg	ctacgaagcg	300
	cgcagccacc	gcaacgacat	catgttgcgt	cgcctagtcc	agcccccacg	cctgaacccc	360
	caggtgcgcc	ccgcgggtgt	acccacgct	tgccccacc	cgggggagggc	ctgtgtggtg	420
	tctggctggg	gcctgggtgtc	ccacaacgag	cctgggaccg	ctgggagcccc	ccggtcacaa	480
	tgaggtctcc	cagatacgtt	gcattgtgcc	aacatcagca	ttatctcgga	cacatcttgt	540
	gacaagagct	acccaggcgc	cctgacaaaac	accatgggtgt	gtgcaggcgc	ggagggcaga	600

ggcgcagaat	cctgtgaggg	tgactctggg	ggacccctgg	tctgtggggg	cattctgcag	660
ggcattgtgt	cctgggtgt	cgtcccttgc	gacaacacca	ccaagcctgg	tgtctatacc	720
aaagtctgcc	actacttgg	gtggatcagg	gaaaccatga	agaggaactg	actattctag	780
cctatctct	gtgcccctga	ctgagcagaa	gcccccacag	ctggccagca	gccccctcg	840
acatggaca	gaacggagcc	atcccccaag	accctgtcca	aggcccagat	gttagccaag	900
gacttgc	acctgaggac	aaagctggcg	ctcaaggta	cctgtttat	gccaagataa	960
caaagcgctg	atccaagtt	ctctgttagga	atttctgtga	cttttttctg	gggtcaaaga	1020
gaaaccccg	gacactgtac	actgttc	ttcacccacc	accccgatcc	ctaggtgagg	1080
agaagcggct	tgaagcaggg	ctccattcat	tcaacacaca	tgaccacccg	tgtatctt	1140
aacaagagc	ccaatctac	ttcgccctgg	tttccatatac	tgtaaaatga	gaccatctt	1200
ttgctgactt	caaaggctg	ttgtgaggat	taaatgagat	gattcgtctg	aactgattaa	1260
aatcgtgtct	ggcactga					1278

<210> 3
 <211> 1124
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3	atgtggcttc	tcctcactct	ctccttcctg	ctggcatcca	cagcagccca	ggatggtgac	60
	aagtgtctgg	aaggtgacga	gtgtgcaccc	cactcccage	catggcaagt	ggctctctac	120
	gagcgtggac	gctttaactg	tggcgcttcc	ctcatctccc	cacactgggt	gctgtctgcg	180
	gcccactgcc	aaagccgctt	catgagagt	cgcctggag	agcacaacct	gcgcaagcgc	240
	gatggcccag	agcaactacg	gaccacgtct	cgggtcatc	cacacccgcg	ctacgaagcg	300
	cgcagccacc	gcaacgcacat	catgttgctg	cgcctagtcc	agcccgac	cctgaacccc	360
	cagtgagtct	cccagatacg	ttgcattgtg	ccaaacatcg	cattatctcg	gacacatctt	420
	gtgacaagag	ctacccaggg	cgcctgacaa	acaccatgg	gtgtgcaggc	gcccggc	480
	gaggcgcaga	atcctgttag	ggtgactctg	ggggacccct	ggtctgtggg	ggcatctgc	540
	aggcattgt	gtcctgggt	gacgtccctt	gtgacaacac	caccaagct	ggtgtctata	600
	ccaaagtctg	ccactacttg	gagtgatca	ggaaaccat	gaagaggaac	tgactattct	660
	aggctatctc	ctgtgcccct	gactgagcag	aagccccac	agctggccag	cagcccgcc	720
	tgacatggaa	cagaacggag	ccatccccca	agaccctgtc	caaggcccag	atgttagcca	780
	aggacttgc	ccacctgagg	acaaagctgg	cgtcaaggt	cacctgttta	atgccaagat	840
	aacaaagcgc	tgatccaagt	tgctctgtag	gaatttctgt	gacttttttc	tgggtcaaa	900
	gagaaacccc	gagacactgt	acactgtcc	tttcaccca	ccaccccgat	cccttaggtga	960
	ggagaagcgg	cttgaagcag	ggctccattc	attcaacaca	catgaccacc	cgtgtatct	1020
	tgaacaagag	gcccaatctc	acttcgcctt	ggttccctt	tctgtaaaat	gagaccatct	1080
	tattgctgac	ttcaaaggc	tgttgtgagg	attaaatgag	atga		1124

<210> 4
 <211> 1105
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgtggcttc tcctcactct ctcccttcctg ctggcatcca cagcagccca ggatggtgac 60
 aagttgctgg aaggtgacga gtgtgcaccc cactcccagc catggcaagt ggctctctac 120
 gagcgtggac gctttaactg tggcgcttcc ctcatctccc cacactgggt gctgtctgcg 180
 gcccactgccc aaagccgctt catgagagtg cgcctgggag agcacaacct gcgcaagcgc 240
 gatggcccag agcaactacg gaccacgtct cgggtcattc cacacccgcg ctacgaagcg 300
 cgcagccacc gcaacgacat catgttgctg cgccttagtcc agcccgacg cctgaacccc 360
 caggtgcgcgc cgcgggtgtt acccacgcgt tgccccccacc cggggggaggc ctgtgtgggt 420
 cctggctggg gcctgggtgtc ccacaacgag cctgggaccg ctgggagccc cgggtcacaa 480
 gggtgactct gggggacccc tggtctgtgg gggcatcctg cagggcattt tgccctgggg 540
 tggacgtccct tggacacaaca ccaccaagcc tggtgtctat accaaagtctt gccaactactt 600
 ggagtggtac agggaaacca tgaagaggaa ctgactattt tagcctatctt cctgtgcccc 660
 tgactgagca gaagccccca cagctggcca gcagccccgc ctgacatgga acagaacgga 720
 gecatcccccc aagaccctgtt ccaaggccca gatgttagcc aaggacttgtt cccacctgag 780
 gacaaagctg ggcgtcaagg tcaacctgtt aatgccaaga taacaaagcg ctgatccaag 840
 ttgcctctgtt ggaattttctg tgactttttt ctgggggtcaa agagaaaaccc cgagacactg 900
 tacactgttc cttttcaccc accaccccgaa tcccttaggtt aggagaagcg gcttgaagca 960
 gggctccatt cattcaacac acatgaccac ccgtgtgatc ttgaacaaga ggcccaatctt 1020
 cacttcgcct tggtttcctt atctgtaaaa tgagaccatc ttattgtgtt cttcaaagg 1080
 ctgttgtag gattaaatgtt gatgtt 1105

<210> 5
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atgtggcttc tcctcactct ctcccttcctg ctggcatcca cagcagccca ggatggtgac 60
 aagttgctgg aaggtgacga gtgtgcaccc cactcccagc catggcaagt ggctctctac 120
 gagcgtggac gctttaactg tggcgcttcc ctcatctccc cacactgggt gctgtctgcg 180
 gcccactgccc aaagccgctt catgagagtg cgcctgggag agcacaacct gcgcaagcgc 240
 gatggcccag agcaactacg gaccacgtct cgggtcattc cacacccgcg ctacgaagcg 300
 cgcagccacc gcaacgacat catgttgctg cgccttagtcc agcccgacg cctgaacccc 360
 cagggtgactt ctgggggacc cctgggtctgtt gggggcatcc tgcagggcat tggcgtctgg 420

ggtgacgtcc	cttgtgacaa	caccaccaag	cctgggtgtct	ataccaaaagt	ctgccactac	480
ttggagtgga	tcagggaaac	catgaagagg	aactgactat	tctagccat	ctcctgtgcc	540
cctgactgag	cagaagcccc	cacagctggc	cagcagcccc	gcctgacatg	gaacagaacg	600
gagccatccc	ccaagaccct	gtccaaggcc	cagatgttag	ccaaggactt	gtcccacctg	660
aggacaaagc	tggcgctcaa	ggtcacctgt	ttaatgccaa	gataacaaag	cgctgatcca	720
agttgctctg	taggaatttc	tgtgactttt	ttctggggtc	aaagagaaaac	cccgagacac	780
tgtacactgt	tcctttcac	ccaccacccc	gatccctagg	tgaggagaag	cggcttgaag	840
cagggctcca	ttcattcaac	acacatgacc	acccggtgtga	tcttgaacaa	gaggccaaat	900
ctcaacttcgc	cttggtttcc	ttatctgtaa	aatgagacca	tcttattgct	gacttcaaag	960
ggctgttgtg	aggataaaat	gagatga				987

<210> 6

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Ala
1						5			10				15		

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

Gln	Pro	Trp	Gln	Val	Ala	Leu	Tyr	Glu	Arg	Gly	Arg	Phe	Asn	Cys	Gly
	35					40			45						

Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	His	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Gln
	50					55			60						

Ser	Arg	Phe	Met	Arg	Val	Arg	Leu	Gly	Glu	His	Asn	Leu	Arg	Lys	Arg
65					70			75			80				

Asp	Gly	Pro	Glu	Gln	Leu	Arg	Thr	Thr	Ser	Arg	Val	Ile	Pro	His	Pro
	85					90					95				

Arg	Tyr	Glu	Ala	Arg	Ser	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Met	Leu	Leu	Arg	Leu
	100					105			110						

Val	Gln	Pro	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Gln	Val	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Pro
	115					120				125					

Thr	Arg	Cys	Pro	His	Pro	Gly	Glu	Ala	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Trp	Gly
	130				135				140						

Leu	Val	Ser	His	Asn	Glu	Pro	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Gln
145					150				155			160			

Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	His	Cys	Ala	Asn	Ile	Ser	Ile	Ile	Ser
	165					170				175					

Asp Thr Ser Cys Asp Lys Ser Tyr Pro Gly Arg Leu Thr Asn Thr Met
 180 185 190

Val Cys Ala Gly Ala Glu Gly Arg Gly Ala Glu Ser Cys Glu Gly Asp
 195 200 205

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly Ile Leu Gln Gly Ile Val Ser
 210 215 220

Trp Gly Asp Val Pro Cys Asp Asn Thr Thr Lys Pro Gly Val Tyr Thr
 225 230 235 240

Lys Val Cys His Tyr Leu Glu Trp Ile Arg Glu Thr Met Lys Arg Asn
 245 250 255

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Trp Leu Leu Leu Thr Leu Ser Phe Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ala
 1 5 10 15

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

Gln Pro Trp Gln Val Ala Leu Tyr Glu Arg Gly Arg Phe Asn Cys Gly
 35 40 45

Ala Ser Leu Ile Ser Pro His Trp Val Leu Ser Ala Ala His Cys Gln
 50 55 60

Ser Arg Phe Met Arg Val Arg Leu Gly Glu His Asn Leu Arg Lys Arg
 65 70 75 80

Asp Gly Pro Glu Gln Leu Arg Thr Thr Ser Arg Val Ile Pro His Pro
 85 90 95

Arg Tyr Glu Ala Arg Ser His Arg Asn Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu
 100 105 110

Val Gln Pro Ala Arg Leu Asn Pro Gln
 115 120

<210> 8

<211> 161

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Ala
1															15
5															

Gln	Asp	Gly	Asp	Lys	Leu	Leu	Glu	Gly	Asp	Glu	Cys	Ala	Pro	His	Ser
20															30

Gln	Pro	Trp	Gln	Val	Ala	Leu	Tyr	Glu	Arg	Gly	Arg	Phe	Asn	Cys	Gly
35															45

Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	His	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Gln
50															60

Ser	Arg	Phe	Met	Arg	Val	Arg	Leu	Gly	His	Asn	Leu	Arg	Lys	Arg
65														80

Asp	Gly	Pro	Glu	Gln	Leu	Arg	Thr	Ser	Arg	Val	Ile	Pro	His	Pro
85														95

Arg	Tyr	Glu	Ala	Arg	Ser	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Met	Leu	Leu	Arg	Leu
100														110	

Val	Gln	Pro	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Gln	Val	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Pro
115														125	

Thr	Arg	Cys	Pro	His	Pro	Gly	Glu	Ala	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Trp	Gly
130														140	

Leu	Val	Ser	His	Asn	Glu	Pro	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Gln
145														155	160

Gly

<210> 9

<211> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Ala
1															15
5															

Gln	Asp	Gly	Asp	Lys	Leu	Leu	Glu	Gly	Asp	Glu	Cys	Ala	Pro	His	Ser
20															30

Gln	Pro	Trp	Gln	Val	Ala	Leu	Tyr	Glu	Arg	Gly	Arg	Phe	Asn	Cys	Gly
35															45

Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	His	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Gln
50															60

Ser Arg Phe Met Arg Val Arg Leu Gly Glu His Asn Leu Arg Lys Arg
65 70 75 80

Asp Gly Pro Glu Gln Leu Arg Thr Thr Ser Arg Val Ile Pro His Pro
85 90 95

Arg Tyr Glu Ala Arg Ser His Arg Asn Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu
100 105 110

Val Gln Pro Ala Arg Leu Asn Pro Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
115 120 125

Val Cys Gly Gly Ile Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Val Pro
130 135 140

Cys Asp Asn Thr Thr Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys His Tyr
145 150 155 160

Leu Glu Trp Ile Arg Glu Thr Met Lys Arg Asn
165 170

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Peptid/Aminosäureabschnitt abgeleitet aus humaner Sequenz

<400> 10

His Asn Glu Pro Gly Thr Ala Gly
; 5

<210> 11

<211> 1580

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11
agaatgggtg ctgtgggatt caggggagac acctgttagg tggggggcc tcccagaaga 60
ggggggggca gagtgtcaga ggacaaaagat gaatttggaa gatatgggg agaaggattt
caattcaccctc tcaaagcttc ctgaggcctc ccgtgggtcg ggcctgcag tactggagac 120
ccagagtggc gtcagaccag ctccctgggg agctgccagt ctcgtagggg aggcagacac 180
cactgagggt caggggaggt cagagaaggc ctcaaggagg aagcggggct ggaaggaaat 240
ggcgttggat atgcgggtggg aggaatagcc taagcatgaa atggcaggag ggaaaatggc 300
agcactggct gcgcttagga caaggtcatg ggagacccag ggagaggggc tggaaaggaa 360
qaagccactt ttgtccttga aagtgaggct ggagccaggc aactcatgcc tggaaatccca 420
480

gcactttggg	aggctgaggc	gggtggatca	ctagaggta	ggagttcaag	accagcctgg	540
ccaacatgg	t gaaactccgt	ctctactaaa	attacaaaaa	ttagctggc	gtggtggcac	600
acacctgtaa	tcccaattgc	ttgggaggct	gaggcaggag	aatctcttga	acccagaagg	660
cagaggttac	agtgagcgg	gatcacgcca	ctccactcca	acctggct	cagagccaga	720
ctccgtctca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agaaagtga	tttgaagagc	780
tggactttat	cctgggtgg	ccaaggatcc	atggagggt	gtgagcagg	gaggggcaca	840
gccagctcca	gatgtagaaa	gacccttgg	ggtcatggct	ggagggcaag	ctgggtggagg	900
ggactggact	ggagggggac	ccaaaaggcc	agataagagg	gttgagatag	accaggcg	960
gtggctcatg	cctgtatcc	cagcacttt	ggaggccgag	gtgggtggat	catgaagtca	1020
agagatttag	gccatcctgg	ctaacacgt	gaaaccctgt	ctctactaa	aaaaaaaaaa	1080
tttccaaaaa	attagccgg	cacgggtgg	ggcgcctgt	gtcccagct	ctcgggaggc	1140
tgaggcggg	gaatgggt	aacctgggag	gtggagctt	cagttagcc	acattgtcc	1200
actgcactcc	agcctgggt	acagagttag	actccgtctc	aaaaaaataa	aaaaagttgg	1260
gacagggg	ccttgcgt	tgatggagag	agatccaccc	gctggtagca	tggtgctgga	1320
ggctgacagg	tggaggaggt	ggggcagggt	ctgtccgagt	gcctagagga	agagtaaacc	1380
ttccagagat	gggggaccca	gaaggaagcg	cagagtgggg	ttgggggaag	gggataccgg	1440
tggtcagaag	aaatttatta	acagtggat	ggataagtct	gtgtctggag	ggatcctgg	1500
ggagggcagaa	gggtctg	tcacctggat	tctctactc	cctccccaga	ctgcagccga	1560
accctggtcc	ctcccccaca					1580

<210> 12

<211> 43

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12	atgtggtttc	tcctcactct	ctccttcctg	ctggcatcca	cag	43
----------	------------	------------	------------	------------	-----	----

<210> 13

<211> 3635

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13	gtgagggtgc	cccaggagg	ggccaggatct	gtggggcag	gtgccccctt	cccaagcatg	60
ttctggccca	gtgatctgc	agccccatcc	tcacccagag	accactaaag	atccttcctt		120
cccccctccac	ctgtgc	aatgtccctaa	gccttacgtc	agggtgtgt	gctgctgtc		180
tggagtcgt	atgttgc	ttgg	ctgcccacga	caaggaacac	ggtcctgggg		240
ttacacaaac	ctgagctgag	tcctggg	caaccgttct	tgctgtgt	ccttgaggga		300
actgcctcac	ctctctggc	ttcgaatgc	ttctctataa	gacagcaccc	acttgagaca		360

agcctccaga gtagctggga ttacaggcac ccgcaccat gcccagctaa tttttgtat 2640
 tttttaga gacagggttt cccatattg gccaggctgg tctcgaactc ctgacccatg 2700
 gtgatccacc cgccctggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcattgagc caccgtgcc 2760
 agcctgtct gtgattttg aagctgcaac ccatgtgcat gcaagtgaat ttcagcttcc 2820
 agtccctgtcc atagctgtac ctaagtgtgg aagctggatg tgcatgtatg catgtccatg 2880
 accttgtata gccacatctg ggactcatac tgcacactga atttggctga catgtccaga 2940
 ctctggggcc aaggctgggt cacacatact gaggccac atgcgtttga cgtctgtgac 3000
 aatttggtga ccgtgaatga ctggttcaa gtgaccacct gtctgaacct gtatccagt 3060
 cccctgtctc caccggcaac cacagaggac ttcttgccct ctggctgttt ccccttctc 3120
 tctctcccaag agtcttatacg caaatgggtt gggggctaga gttctggaga aaacaggcag 3180
 cggttgtaaa taaacaacag ggcaggcggg gcatggtggc tcacacctgt aatcccagca 3240
 ctttgggagg ctgaggcggg cagacgattt gaagtcagaa gtttgagact acctggctaa 3300
 catggtggaga cctcgtctct actaaaaata caaaaattag ccaggtgtgg tggcgggcac 3360
 ctcaagctact cgggaggctg aggcaaggagg atcaacttggaa cccaggaggc ggaagttgca 3420
 gtgagctgag atcatgccac tgcactccag cctggccaaa agagtgagac tccgtctcaa 3480
 aaacaacaac aacaacaaaa caaaaaacag ggcagggtgt cttgagaagt tagggaaag 3540
 gcataggcat atagtagtta gggcagggtg caaggaaggt gttaggaggca atgtaaacgt 3600
 ccctgtctc aggcatctc tacccttctt cttag 3635

<210> 14

<211> 154

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14
 cagcccagga tggtgacaag ttgctgaaag gtgacgagtg tgcaaaaaac tccccagccat 60
 ggcaagtggc tctctacgag cgtggacgct ttaactgtgg cgtttccctc atctccccac 120
 astgggtgtt gtctgcggcc cactgccaac gccc 154

<210> 15

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15
 gtatgaaggc aggggctca ggtcctgagg gagctggtt cggggggaaag agtcctaga 60
 tttggggaa gacggaggca gacgccagaa ctccctgggtt ctgaaagacg aggaggccgg 120
 atgtcaagcc cctgggttag gaaggagtgt gtgtttcaaa gccttcgatc tctgaaggag 180
 gaaggagaag actagttcca gctttgagc ctcagttcta gggatgtgag aatcctggat 240
 tggggacag accaggaggg ggctggaggt agttggaggg gatcgagttc taggagtgtg 300

cctgacttca gactcggttgg tccttgagga gcaggggctg gaaccattgg cttcagggtc 360
 ttggggaaag gtaatggat gtcgagattt ctaaagggtc gggagaccc gggttgccc 420
 ctcttgatc tttctgtcct ctacttgcgg gtaaccactg gcccgactc cactggcggg 480
 aaaaccactc gccccacag 500

<210> 16
 <211> 284
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 ttccatgaga gtgcgcctgg gagagcacaa cctgcgcgaag cgcgatggcc cagagcaact 60
 acggaccacg tctcggttca ttccacaccc ggcgtacgaa ggcgcgcagcc accgcaacga 120
 catcatgttg ctgcgcctag tccagccgc acgcctgaac ccccaaggtgc gccccgcgg 180
 gctacccacg cgttgcggcc acccggggga ggcctgtgtg gtgtctggct ggggcctgg 240
 gtccacacaac gaggctggga ccgcgtggag ccccccgtca caag 284

<210> 17
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 tgcgtgaaag gatggagctg gatgcgagcc ctcaaggaat cctatgtcc agggctttg 60
 ggcggagggg acaaggcccg gaatttatgg atctgctcca agtccactgt cttccccag 119

<210> 18
 <211> 284
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 ttccatgaga gtgcgcctgg gagagcacaa cctgcgcgaag cgcgatggcc cagagcaact 60
 acggaccacg tctcggttca ttccacaccc ggcgtacgaa ggcgcgcagcc accgcaacga 120
 catcatgttg ctgcgcctag tccagccgc acgcctgaac ccccaaggtgc gccccgcgg 180
 gctacccacg cgttgcggcc acccggggga ggcctgtgtg gtgtctggct ggggcctgg 240
 gtccacacaac gaggctggga ccgcgtggag ccccccgtca caag 284

<210> 19
 <211> 120
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
 gtgcgtgaaa ggatggagct ggatgcgagg cctcaaggaa tcctatgctc cagggcttctt 60
 gggcggaggg gacaaggccc ggaattttagt gatctgctcc aagtccactg tcttccccag 120

<210> 20

<211> 137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
 tggatctccc agatacgttg cattgtgcca acatcagcat tatctcgac acatcttgc 60
 acaagagcta cccagggcgc ctgacaaaaca ccatggtgtg tgcaggcgcg gagggcagag 120
 gcgcagaatc ctgttag 137

<210> 21

<211> 673

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21
 gtcagagcct agagggccca tcaggcggaa gaagagggat ggggacaggt gtgggagtcc 60
 ggatggggttt ggatttctt tgctttggc cagagaagat gctagggtta ggcttggaga 120
 tggagtagga agagaagtta gaatagggat gaggttggag ttggggttat aggtggggat 180
 tgcgttggttt gaggtggata actgtgatag ttagtttagt atggcatggg ttggggttga 240
 gaatggaaat ggtttggttt gattctgggtt gggaaatacg tcagggttga attgggatga 300
 ggttagatttt gtttggaaatg cagaagacat gaagatttagt atggatttt gagatggca 360
 tgggtttgtat ttgattttga atggtgagga tggggctga gttggatata acttagtaca 420
 gttgcactgg agttgcattgg gggtgagatt ggatataggat tgggtgagtt gtattgagct 480
 gtgttgaatt ggggttgggg ttggggttgg gttggctctg tttggataaa actgggtgt 540
 attgagtttga gttgggttgg gttccctgg gatggggatg gattgggttt ggggtgagat 600
 tgcataatgtt gatttagatg aggtgaatc caggaggttt cactcaacct gagaccct 660
 cttttccccca cag 673

<210> 22

<211> 1046

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22
 tgcgcggccgc ggtgctaccc acgcgttgcc cccacccggg ggaggcctgt gtggtgtctg 60
 gctggggcct ggtgtcccac aacgagctg ggaccgctgg gagcccccgg tcacaaggtg 120
 cgtgaaagga tggagctgga tgcgaggcct caaggaatcc tatgctccag ggctcttggg 180
 cggaggggac aaggggccgga atttatggat ctgctccaag tccactgtct tccccagtga 240
 gtcctccaga tacgttgcac tgcgttgcata tcagcattat ctcggacaca tcttgac 300
 agagctaccc agggcgcctg acaaacacca tgggtgtgc aggcgcggag ggcagaggcg 360
 cagaatcctg tgaggtcaga gcctagaggg gccatcaggg ggaagaagag gatgggaca 420
 ggtgtggag tccggatggg gttggatttt ctttgctttg ggccagagaa gatgctaggg 480
 ttaggcttgg agatggagta ggaagagaag ttagaatagg ggtgaggttg gagttggggt 540
 tatagggtggg gattgcgttgc tttgaggtgg ataaactgtga tagtttagttt gagatggcat 600
 gggttgggt tgagaatggg aatggttgg tttgattctg ggtggaaat acgtcagggt 660
 tgaattggga tgaggttagat tttgtttggaa atgcagaaga catgaagatt gagatggat 720
 tttgagatgg gcatgggttt gatttgattt tgaatggtga ggatgtggc tgagttggat 780
 ttaacttagt acagttgcac tggagttgca tgggggtgag attggatata gttgggtga 840
 gttgtattga gctgtgttga attggggttt gggttgggt tgggttgct ctgtttggga 900
 taaactgggc tgtattgagt tgagttgggt tggggttccc tgggatgggg atggattggg 960
 tttgggtga gattgcaaattt ggtgatttagg atgaggatga atccaggagg tttcactcaa 1020
 cctgagaccc cctctttcc ccacag 1046

<210> 23

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23
 ggtgactctg ggggacccct ggtctgtggg ggcatacctgc agggcattgt gtccctgggt 60
 gacgtccctt gtgacaacac caccaagcct ggtgtctata ccaaagtctg ccactacttg 120
 gagtggtatca gggaaaccat gaagaggaac tgactattct agcctatctc ctgtccctt 180
 gactgagcag aagccccac agctggccag cagcccccgc tgacatggaa cagaacggag 240
 ccaccccca agaccctgtc caaggcccag atgttagcca aggacttgc ccacctgagg 300
 acaaagctgg cgctcaaggt cacctgttta atgccaagat aacaaagcgc tgatccaagt 360
 tgctctgttag gaatttctgt gactttttc tgggtcaaa gagaaacccc gagacactgt 420
 acactgttcc tttcaccca ccaccccgat cccttaggtga ggagaagcgg cttgaagcag 480
 ggctccatcc attcaacaca catgaccacc cgtgtgatct tgaacaagag gccaaatctc 540
 acttcgcctt gtttcctta tctgtaaaat gagaccatct tattgctgac ttcaaaggc 600
 tttgtgagg attaaatgag atgattcgtc tgaactgattt aaaaatcgtgt ctggcactga 660

<210> 24

<211> 153

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24	60
ggtgactctg ggggaccctt ggtctgtggg ggcatcctgc agggcattgt gtcctgggt	
gacgtccctt gtgacaacac caccaagcct ggtgtctata ccaaagtctg ccactacttg	120
gagtggatca gggaaaccat gaagaggaac tga	153

<210> 25

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Lys Lys Leu Met Val Val Leu Ser Leu Ile Ala Ala Ala Ala Trp Ala	
1 5 10 15	

Glu Glu Gln Asn Lys Leu Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser	
20 25 30	

His Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly	
35 40 45	

Gly Val Leu Ile His Pro Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys	
50 55 60	

Lys Pro Asn Leu Gln Val Phe Leu Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg	
65 70 75 80	

Glu Ser Ser Gln Glu Gln Ser Ser Val Val Arg Ala Val Ile His Pro	
85 90 95	

Asp Tyr Asp Ala Ala Ser His Asp Gln Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu	
100 105 110	

Ala Arg Pro Ala Lys Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu	
115 120 125	

Arg Asp Cys Ser Ala Asn Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly	
130 135 140	

Lys Thr Ala Asp Gly Asp Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile	
145 150 155 160	

His Leu Val Ser Arg Glu Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile	
165 170 175	

Thr Gln Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser	
180 185 190	

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg
 195 200 205

Gly Leu Val Ser Trp Gly Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro
 210 215 220

Gly Val Tyr Thr Asn Val Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Ile Gln Ala Lys

<210> 26

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Trp Pro Leu Ala Leu Val Ile Ala Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ser
 5 10 15

Gly Gly Val Ser Gln Glu Ser Ser Lys Val Leu Asn Thr Asn Gly Thr
 20 25 30

Ser Gly Phe Leu Pro Gly Gly Tyr Thr Cys Phe Pro His Ser Gln Pro
 35 40 45

Trp Gln Ala Ala Leu Leu Val Gln Gly Arg Leu Leu Cys Gly Gly Val
 50 55 60

Leu Val His Pro Lys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Lys Val Tyr Leu Gly Lys His Ala Leu Gly Arg Val Glu Ala
 85 90 95

Gly Glu Gln Val Arg Glu Val Val His Ser Ile Pro His Pro Glu Tyr
 100 105 110

Arg Arg Ser Pro Thr His Leu Asn His Asp His Asp Ile Met Leu Leu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ser Pro Val Gln Leu Thr Gly Tyr Ile Gln Thr Leu Pro
 130 135 140

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

Gly Trp Gly Thr Thr Ser Pro Gln Val Asn Tyr Pro Lys Thr Leu
 165 170 175

Gln Cys Ala Asn Ile Gln Leu Arg Ser Asp Glu Glu Cys Arg Gln Val
 180 185 190

Tyr Pro Gly Lys Ile Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Thr Lys Glu
 195 200 205

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 210 215 220

Asn Arg Thr Leu Tyr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Phe Pro Cys Gly
 225 230 235 240

Gln Pro Asp Arg Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr Val Leu
 245 250 255

Trp Ile Arg Glu Thr Ile Arg Lys Tyr Glu Thr Gln Gln Gln Lys Trp
 260 265 270

Leu Lys Gly Pro Gln
 275

<210> 27

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Phe Leu Leu Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Ala Ile Ala Met Thr
 1 5 10 15

Gln Ser Gln Glu Asp Glu Asn Lys Ile Ile Gly Gly His Thr Cys Thr
 20 25 30

Arg Ser Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Ala Gly Pro Arg Arg
 35 40 45

Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ala Leu Leu Ser Gly Gln Trp Val Ile Thr
 50 55 60

Ala Ala His Cys Gly Arg Pro Ile Leu Gln Val Ala Leu Gly Lys His
 65 70 75 80

Asn Leu Arg Arg Trp Glu Ala Thr Gln Gln Val Leu Arg Val Val Arg
 85 90 95

Gln Val Thr His Pro Asn Tyr Asn Ser Arg Thr His Asp Asn Asp Leu
 100 105 110

Met Leu Leu Gln Leu Gln Gln Pro Ala Arg Ile Gly Arg Ala Val Arg
 115 120 125

Pro Ile Glu Val Thr Gln Ala Cys Ala Ser Pro Gly Thr Ser Cys Arg
 130 135 140

Val Ser Gly Trp Gly Thr Ile Ser Ser Pro Ile Ala Arg Tyr Pro Ala
 145 150 155 160

Ser Leu Gln Cys Val Asn Ile Asn Ile Ser Pro Asp Glu Val Cys Gln
 165 170 175

Lys Ala Tyr Pro Arg Thr Ile Thr Pro Gly Met Val Cys Ala Gly Val
 180 185 190

Pro Gln Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 195 200 205

Val Cys Arg Gly Gln Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Met Glu Arg
 210 215 220

Cys Ala Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Tyr
 225 230 235 240

Arg Ser Trp Ile Glu Glu Thr Met Arg Asp Lys
 245 250

<210> 28

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Gln Arg Leu Arg Trp Leu Arg Asp Trp Lys Ser Ser Gly Arg Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Ala Lys Glu Pro Gly Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ala
 20 25 30

Met Arg Ile Leu Gln Leu Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Leu Val
 35 40 45

Gly Gly Glu Thr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Glu Cys Lys Pro His Ser
 50 55 60

Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Phe Glu Lys Thr Arg Leu Leu Cys Gly
 65 70 75 80

Ala Thr Leu Ile Ala Pro Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 85 90 95

Lys Pro Arg Tyr Ile Val His Leu Gly Gln His Asn Leu Gln Lys Glu
 100 105 110

Glu Gly Cys Glu Gln Thr Arg Thr Ala Thr Glu Ser Phe Pro His Pro
 115 120 125

Gly Phe Asn Asn Ser Leu Pro Asn Lys Asp His Arg Asn Asp Ile Met
 130 135 140

Leu Val Lys Met Ala Ser Pro Val Ser Ile Thr Trp Ala Val Arg Pro

145

150

155

160

Leu Thr Leu Ser Ser Arg Cys Val Thr Ala Gly Thr Ser Cys Leu Ile
 165 170 175

Ser Gly Trp Gly Ser Thr Ser Ser Pro Gln Leu Arg Leu Pro His Thr
 180 185 190

Leu Arg Cys Ala Asn Ile Thr Ile Ile Glu His Gln Lys Cys Glu Asn
 195 200 205

Ala Tyr Pro Gly Asn Ile Thr Asp Thr Met Val Cys Ala Ser Val Gln
 210 215 220

Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
 225 230 235 240

Cys Asn Gln Ser Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Gln Asp Pro Cys
 245 250 255

Ala Ile Thr Arg Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Lys Tyr Val
 260 265 270

Asp Trp Ile Gln Glu
 275

<210> 29

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Lys Leu Gly Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Leu Leu Ala Gly His
 1 5 10 15

Gly Trp Ala Asp Thr Arg Ala Ile Gly Ala Glu Glu Cys Arg Pro Asn
 20 25 30

Ser Gln Pro Trp Gln Ala Gly Leu Phe His Leu Thr Arg Leu Phe Cys
 35 40 45

Gly Ala Thr Leu Ile Ser Asp Arg Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys
 50 55 60

Arg Lys Pro Tyr Leu Trp Val Arg Leu Gly Glu His His Leu Trp Lys
 65 70 75 80

Trp Glu Gly Pro Glu Gln Leu Phe Arg Val Thr Asp Phe Phe Pro His
 85 90 95

Pro Gly Phe Asn Lys Asp Leu Ser Ala Asn Asp His Asn Asp Asp Ile
 100 105 110

Met Leu Ile Arg Leu Pro Arg Gln Ala Arg Leu Ser Pro Ala Val Gln
 115 120 125

Pro Leu Asn Leu Ser Gln Thr Cys Val Ser Pro Gly Met Gln Cys Leu
 130 135 140

Ile Ser Gly Trp Gly Ala Val Ser Ser Pro Lys Ala Leu Phe Pro Val
 145 150 155 160

Thr Leu Gln Cys Ala Asn Ile Ser Ile Leu Glu Asn Lys Leu Cys His
 165 170 175

Trp Ala Tyr Pro Gly His Ile Ser Asp Ser Met Leu Cys Ala Gly Leu
 180 185 190

Trp Glu Gly Gly Arg Gly Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 195 200 205

Val Cys Asn Gly Thr Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Gly Ala Glu Pro
 210 215 220

Cys Ser Arg Pro Arg Arg Pro Ala Val Tyr Thr Ser Val Cys His Tyr
 225 230 235 240

Leu Asp Trp Ile Gln Glu Ile Met Glu Asn
 245 250

<210> 30

<211> 276

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Arg Ala Pro His Leu His Leu Ser Ala Ala Ser Gly Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu Leu Met Ala Gln Leu Trp Ala Ala Glu
 20 25 30

Ala Ala Leu Leu Pro Gln Asn Asp Thr Arg Leu Asp Pro Glu Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser Gln Pro Trp Gln Val Ser Leu Phe
 50 55 60

Asn Gly Leu Ser Phe His Cys Ala Gly Val Leu Val Asp Gln Ser Trp
 65 70 75 80

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Gly Asn Lys Pro Leu Trp Ala Arg Val
 85 90 95

Gly Asp Asp His Leu Leu Leu Gln Gly Glu Gln Leu Arg Arg Thr
 100 105 110

Thr Arg Ser Val Val His Pro Lys Tyr His Gln Gly Ser Gly Pro Ile
 115 120 125

Leu Pro Arg Arg Thr Asp Glu His Asp Leu Met Leu Leu Lys Leu Ala
 130 135 140

Arg Pro Val Val Pro Gly Pro Arg Val Arg Ala Leu Gln Leu Pro Tyr
 145 150 155 160

Arg Cys Ala Gln Pro Gly Asp Gln Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Thr
 165 170 175

Thr Ala Ala Arg Arg Val Lys Tyr Asn Lys Gly Leu Thr Cys Ser Ser
 180 185 190

Ile Thr Ile Leu Ser Pro Lys Glu Cys Glu Val Phe Tyr Pro Gly Val
 195 200 205

Val Thr Asn Asn Met Ile Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gln Asp Pro
 210 215 220

Cys Gln Ser Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asp Glu Thr Leu Gln
 225 230 235 240

Gly Ile Leu Ser Trp Gly Val Tyr Pro Cys Gly Ser Ala Gln His Pro
 245 250 255

Ala Val Tyr Thr Gln Ile Cys Lys Tyr Met Ser Trp Ile Asn Lys Val
 260 265 270

Ile Arg Ser Asn
 275

<210> 31

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Gly Leu Ser Ile Phe Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Ala Ala Thr Pro Lys Ile Phe Asn Gly Thr Glu Cys Gly Arg Asn Ser
 20 25 30

Gln Pro Trp Gin Val Gly Leu Phe Glu Gly Thr Ser Leu Arg Cys Gly
 35 40 45

Gly Val Leu Ile Asp His Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ser
 50 55 60

Gly Ser Arg Tyr Trp Val Arg Leu Gly Glu His Ser Leu Ser Gln Leu
 65 70 75 80

Asp Trp Thr Glu Gln Ile Arg His Ser Gly Phe Ser Val Thr His Pro
85 90 95

Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Thr Ser His Glu His Asp Leu Arg Leu Leu
100 105 110

Arg Leu Arg Leu Pro Val Arg Val Thr Ser Ser Val Gln Pro Leu Pro
115 120 125

Leu Pro Asn Asp Cys Ala Thr Ala Gly Thr Glu Cys His Val Ser Gly
130 135 140

Trp Gly Ile Thr Asn His Pro Arg Asn Pro Phe Pro Asp Leu Leu Gln
145 150 155 160

Cys Leu Asn Leu Ser Ile Val Ser His Ala Thr Cys His Gly Val Tyr
165 170 175

Pro Gly Arg Ile Thr Ser Asn Met Val Cys Ala Gly Gly Val Pro Gly
180 185 190

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

Val Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Ser Val Gly Pro Cys Gly Gln
210 215 220

Asp Gly Ile Pro Gly Val Tyr Thr Tyr Ile Cys Lys Tyr Val Asp Trp
225 230 235 240

Ile Arg Met Ile Met Arg Asn Asn
245

<210> 32

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Ala Lys Thr Trp Met Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Ala Trp Ala Gly His Ser Arg Ala Gln Glu Asp Lys
20 25 30

Val Leu Gly Gly His Glu Cys Gln Pro His Ser Gln Pro Trp Gln Ala
35 40 45

Ala Leu Phe Gln Gly Gln Gln Leu Leu Cys Gly Val Leu Val Gly
50 55 60

Gly Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Lys Tyr Thr

65

70

75

80

Val Arg Leu Gly Asp His Ser Leu Gln Asn Lys Asp Gly Pro Glu Gln
 85 90 95

Glu Ile Pro Val Val Gln Ser Ile Pro His Pro Cys Tyr Asn Ser Ser
 100 105 110

Asp Val Glu Asp His Asn His Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Arg Asp
 115 120 125

Gln Ala Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Pro Ile Ser Leu Ala Asp His
 130 135 140

Cys Thr Gln Pro Gly Gln Lys Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Val
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Arg Glu Asn Phe Pro Asp Thr Leu Asn Cys Ala Glu Val
 165 170 175

Lys Ile Phe Pro Gln Lys Lys Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Gly Gln Ile
 180 185 190

Thr Asp Gly Met Val Cys Ala Gly Ser Ser Lys Gly Ala Asp Thr Cys
 195 200 205

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asp Gly Ala Leu Gln Gly
 210 215 220

Ile Thr Ser Trp Gly Ser Asp Pro Cys Gly Arg Ser Asp Lys Pro Gly
 225 230 235 240

Val Tyr Thr Asn Ile Cys Arg Tyr Leu Asp Trp Ile Lys Lys Ile Ile
 245 250 255

Gly Ser Lys Gly
 260

<210> 33

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

<210> 34

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Trp Asp Leu Val Leu Ser Ile Ala Leu Ser Val Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Val Pro Leu Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Val Tyr Ser His Gly Trp Ala
 35 40 45

His Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Leu Lys Lys Asn Ser Gln Val Trp Leu Gly Arg His Asn Leu
 65 70 75 80

Phe Glu Pro Glu Asp Thr Gly Gln Arg Val Pro Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asn Met Ser Leu Leu Lys His Gln Ser Leu Arg
 100 105 110

Pro Asp Glu Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Lys Ile Thr Asp Val Val Lys Val Leu Gly Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Arg Pro Arg Ser Leu Gln Cys Val Ser Leu
 165 170 175

His Leu Leu Ser Asn Asp Met Cys Ala Arg Ala Tyr Ser Glu Lys Val
 180 185 190

Thr Glu Phe Met Leu Cys Ala Gly Leu Trp Thr Gly Gly Lys Asp Thr
 195 200 205

Cys Gly Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Pro Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Lys Pro
 225 230 235 240

Ala Val Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Ala Ala Asn Pro
 260

<210> 35

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Trp Phe Leu Val Leu Cys Leu Ala Leu Ser Leu Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe
 35 40 45

Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu
 65 70 75 80

Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser Leu Leu Glu Asn His Thr Arg Gln
 100 105 110

Ala Asp Glu Asp Tyr Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu
 115 120 125

Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr
 130 135 140

Glu Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser
 145 150 155 160

Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp
 165 170 175

Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu Cys Lys Lys Ala His Val Gln Lys
 180 185 190

Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp
 195 200 205

Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu
 210 215 220

Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn Lys
 225 230 235 240

Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp
 245 250 255

Thr Ile Ala Glu Asn Ser
 260

<210> 36
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Met	Ala	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Trp	Val	Leu	Cys	Ala	Leu	Ile
1				5				10					15		

Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Thr	Glu	His	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Asp
		20					25					30			

Val	Ser	Cys	Asp	His	Pro	Ser	Asn	Thr	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Asn	Gln
		35				40					45				

Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Ser	Asp	Asp	Ser	Ser
					50		55			60					

Ser	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Ser	Asp	Cys	Asp	Met	His	Thr	Gln	Pro	Trp
				65			70		75			80			

Gln	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	Gln	Leu	Tyr	Cys	Gly	Ala	Val
					85			90			95				

Leu	Val	His	Pro	Gln	Trp	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Arg	Lys	Lys
				100			105				110				

Val	Phe	Arg	Val	Arg	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Glu
					115		120				125				

Ser	Gly	Gln	Gln	Met	Phe	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Ile	Pro	His	Pro	Gly
				130		135			140						

Tyr	Ser	His	Pro	Gly	His	Ser	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Ile	Lys	Leu	Asn
					145		150		155			160			

Arg	Arg	Ile	Arg	Pro	Thr	Lys	Asp	Val	Arg	Pro	Ile	Asn	Val	Ser	Ser
					165			170			175				

His	Cys	Pro	Ser	Ala	Gly	Thr	Lys	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Thr
					180			185			190				

Thr	Lys	Ser	Pro	Gln	Val	His	Phe	Pro	Lys	Val	Leu	Gln	Cys	Leu	Asn
					195		200		205						

Ile	Ser	Val	Leu	Ser	Gln	Lys	Arg	Cys	Glu	Asp	Ala	Tyr	Pro	Arg	Gln
					210		215		220						

Ile	Asp	Asp	Thr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Asp	Lys	Ala	Gly	Arg	Asp	Ser
				225		230			235			240			

Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln
					245			250		255					

Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Gly	Asp	Tyr	Pro	Cys	Ala	Arg	Pro	Asn	Arg	Pro
				260		265			270			275			

Gly	Val	Tyr	Thr	Asn	Leu	Cys	Lys	Phe	Thr	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Thr
					275		280		285			288			

Ile Gln Ala Asn Ser
290

<210> 37

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Thr Ala Gly Asn Pro Trp Gly Trp Phe Leu Gly Tyr Leu Ile
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Gly Ser Leu Val Ser Gly Ser Cys Ser Gln Ile Ile
20 25 30

Asn Gly Glu Asp Cys Ser Pro His Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu
35 40 45

Val Met Glu Asn Glu Leu Phe Cys Ser Gly Val Leu Val His Pro Gln
50 55 60

Trp Val Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Asn Ser Tyr Thr Ile Gly
65 70 75 80

Leu Gly Leu His Ser Leu Glu Ala Asp Gln Glu Pro Gly Ser Gln Met
85 90 95

Val Glu Ala Ser Leu Ser Val Arg His Pro Glu Tyr Asn Arg Pro Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asp Glu Ser Val Ser Ser
115 120 125

Asp Thr Ile Arg Ser Ile Ser Ile Ala Ser Gln Cys Pro Thr Ala Gly
130 135 140

Asn Ser Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Leu Leu Ala Asn Gly Arg Met
145 150 155 160

Pro Thr Val Leu Gln Cys Val Asn Val Ser Val Val Ser Glu Glu Val
165 170 175

Cys Ser Lys Leu Tyr Asp Pro Leu Tyr His Pro Ser Met Phe Cys Ala
180 185 190

Gly Gly Gly His Asp Gln Lys Asp Ser Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly
195 200 205

Pro Leu Ile Cys Asn Gly Tyr Leu Gln Gly Leu Val Ser Phe Gly Lys
210 215 220

Ala Pro Cys Gly Gln Val Gly Val Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys
225 230 235 240

Lys Phe Thr Glu Trp Ile Glu Lys Thr Val Gln Ala Ser
245 250

<210> 38

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp
20 25 30

Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu
35 40 45

Ser Gly Asn Gin Leu His Cys His Ser Cys Cys Glu Gly Gly Val Leu
50 55 60

Val Asn Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu
65 70 75 80

Tyr Thr Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln
85 90 95

Arg Ile Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln
100 105 110

Thr His Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg
115 120 125

Leu Ser Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro
130 135 140

Pro Gly Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro
145 150 155 160

Asp Val Thr Phe Pro Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser
165 170 175

Pro Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met
180 185 190

Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp
195 200 205

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser
210 215 220

Trp Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr
225 230 235 240

Gln Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met Lys Lys His
 245 250 255

Arg

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 39

cacaacgagc ctgggaccgc tggg

24

<210> 40

<211> 6

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 40

attaaaa

6

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 41

atccccccat tcccatcttt

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 42
cacatacaat tctctggttc

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 43
agtgacactg tctcagaatt

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 44
ccccaaatctc acgagtgcac

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 45
gtcggtcttg gagacatttc

20

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 46
 aactggggag gcttgagtc 19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 47
 ctcccttcctg ctggcatcca 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 48
 atcacacggg tggcatgtg 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 49
 caagtggctc tctacgagcg 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Abschnitte/Peptide hergeleitet von humaner Sequenz

<400> 50
 gacaccaggc ttgggtgggt 20

Patentansprüche

1. Isoliertes Protein, welches aus einer Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6, 7, 8 oder 9 besteht.

2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, welches ein Protein nach Anspruch 1 codiert, oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül mit wenigstens 80%, 85%, 90%, 95% oder 99% Identität dazu.

3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2 mit einer Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 oder 5, wobei T auch U sein kann, oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül mit wenigstens 80%, 85%, 90%, 95% oder 99% Identität dazu.

4. Vektor, welcher ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2 oder 3 umfaßt.

5. Wirtszelle, welche ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2 oder 3 umfaßt.

6. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 1, welches folgendes umfaßt:

- (a) Überführen eines Vektors nach Anspruch 4 in eine Wirtszelle,
- (b) Selektieren transformierter Wirtszellen gegenüber nicht transformierten Wirtszellen,
- (c) Kultivieren einer selektierten transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des Proteins gestatten, und
- (d) Isolieren des Proteins.

7. Antikörper mit Spezifität gegen ein Epitop eines Proteins nach Anspruch 1.

8. Antikörper nach Anspruch 7, der mit einer detektierbaren Substanz markiert ist und dazu verwendet wird, das Polypeptid in biologischen Proben, Geweben und Zellen zu detektieren.

9. Sonde, welche eine Sequenz umfaßt, die ein Protein nach Anspruch 1 codiert.

10. Testkit zum Diagnostizieren eines Zustands, der mit einem Protein nach Anspruch 1 assoziiert ist, durch Bestimmen des Vorhandenseins eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der vorangegangenen Ansprüche oder eines Proteins nach einem der vorangegangenen Ansprüche.

11. Testkit nach Anspruch 10, wobei der Zustand Krebs ist.

12. Testkit nach Anspruch 11, wobei der Krebs Prostatakrebs ist.

13. Verfahren zum Identifizieren einer Substanz, die sich mit einem Protein nach Anspruch 1 assoziiert, welches folgendes umfaßt:

- (a) Umsetzen des Proteins mit wenigstens einer Substanz, die sich potentiell mit dem Protein assoziieren kann, unter Bedingungen, die die Assozierung zwischen der Substanz und dem Protein gestatten, und
- (b) Entfernen oder Detektieren des mit der Substanz assoziierten Proteins, wobei die Detektion von assoziiertem Protein und Substanz anzeigt, daß die Substanz mit dem Protein assoziiert.

14. Verfahren zum Bewerten einer Verbindung auf ihre Fähigkeit, die biologische Aktivität eines Proteins nach Anspruch 1 zu modulieren, welches das Versehen des Proteins mit einer Substanz, die sich mit dem Protein assoziiert, und mit einer Testverbindung umfaßt, unter Bedingungen, die die Bildung von Komplexen zwischen der Substanz und dem Protein und das Entfernen und/oder Detektieren von Komplexen gestatten.

15. Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der Wechselwirkung eines Proteins nach Anspruch 1 und einer Substanz, die mit dem Protein wechselwirkt, welches folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen eines Reaktionsgemischs, welches das Protein und eine Substanz, die an das Protein bindet, oder wenigstens einen Teil von beiden, die miteinander wechselwirken, enthält,
- (b) Inkontaktbringen des Reaktionsgemischs mit einer oder mehreren Testverbindungen,
- (c) Identifizieren von Verbindungen, die die Wechselwirkung des Proteins und der Substanz hemmen.

16. Verfahren zum Detektieren eines Nukleinsäuremoleküls, welches ein Protein nach Anspruch 1 codiert, in einer biologischen Probe, welches die folgenden Stufen umfaßt:

- (a) Hybridisieren eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 2 oder 3 an Nukleinsäuren der biologischen Probe unter Bildung eines Hybridisierungskomplexes und
- (b) Detektieren des Hybridisierungskomplexes, wobei das Vorhandensein des Hybridisierungskomplexes mit dem Vorhandensein eines Nukleinsäuremoleküls, welches das Protein in der biologischen Probe codiert, korreliert ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei Nukleinsäuren der biologischen Probe vor der Hybridisierungsstufe durch Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden.

18. In vitro-Verfahren zum Überwachen des Voranschreitens von Prostatakrebs in einem Individuum, welches die folgenden Stufen umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen einer Menge eines Antikörpers, der an ein Protein nach Anspruch 1 bindet, mit einer Probe von dem Individuum, um einen binären Komplex zu bilden, der den Antikörper und das Protein in der Probe umfaßt,
- (b) Bestimmen oder Detektieren des Vorhandenseins oder der Menge an Komplexbildung in der Probe,
- (c) Wiederholen der Stufen (a) und (b) zu einem späteren Zeitpunkt und
- (d) Vergleichen des Ergebnisses von Stufe (b) mit dem Ergebnis von Stufe (c), wobei ein Unterschied in der Menge an Komplexbildung das Voranschreiten des Krebses in dem Individuum anzeigt.

19. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche eines oder mehrere von einem Nukleinsäuremolekül oder einem Protein nach einem der vorangegangenen Ansprüche und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, ein Bindemittel oder ein Verdünnungsmittel umfaßt.

21. Verwendung eines oder mehrerer von einem Nukleinsäuremolekül oder einem Protein nach einem der vorangegangenen Ansprüche bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatakrebs.

22. Verfahren zur Durchführung von Arzneimittelentdeckung, welches folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen von Mitteln, die anhand ihrer Fähigkeit, die Wechselwirkung eines Proteins nach Anspruch 1 und einer Substanz, die an das Protein bindet, zu hemmen oder zu verstärken, identifiziert werden,
- (b) Durchführen von therapeutischem Profiling an Mitteln, die in Stufe (a) identifiziert wurden, oder an weiteren Analogen davon auf ihre Wirksamkeit und Toxizität in Tieren und
- (c) Bestimmen einer Formulierung für eine pharmazeutische Präparation, die ein oder mehrere Mittel enthält, die in Stufe (b) mit einem annehmbaren therapeutischen Profil identifiziert wurden.

23. Impfstoff zum Stimulieren oder Verstärken der Produktion von Antikörpern, die gegen ein Protein nach Anspruch 1 gerichtet sind, in einem Subjekt, an das der Impfstoff verabreicht wird.

24. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Impfstoffs zum Stimulieren oder Verstärken der Produktion von Antikörpern gegen das Protein in einem Subjekt.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

TGGATTCTCTCACTCCCTCCCCAGACTGCAGCGAACCCCTGGTCCCTCCTCCACA
 (ATG) TGG CTT CTC CTC ACT CTC TCC TTC CTG CTG GCA TCC ACA
 M W L L L T L S F L L A S T
 G gtgagggtggccccaggagggggccaggctgtggagcaggtg.....
 ...Intron1.....gcatcctctacccttctcttag CA GCC CAG
 A A Q
 GAT GGT GAC AAG TTG CTG GAA GGT GAC GAG TGT GCA CCC CAC
 D G D K L L E G D E C A P H
 TCC CAG CCA TGG CAA GTG GCT CTC TAC GAG CGT GGA CGC TTT
 S Q P W Q V A L Y E R G R F
 AAC TGT GGC GCT TCC CTC ATC TCC CCA CAC TGG GTG CTG TCT
 N C G A S L I S P H W V L S
 GCG GCC CAC TGC CAA AGC CG gtatgaaggcagggctcagggtcctga
 A A **H** C Q S R
 ggg.....Intron 2cgcaactccactggcgaaa
 accactcgcccgacag C TTC ATG AGA GTG CGC CTG GGA GAG CAC
 F M R V R L G E H
 AAC CTG CGC AAG CGC GAT GGC CCA GAG CAA CTA CGG ACC ACG
 N L R K R D G P E Q L R T T
 TCT CGG GTC ATT CCA CAC CCG CGC TAC GAA GCG CGC AGC CAC
 S R V I P H P R Y E A R S H
 CGC AAC GAC ATC ATG TTG CTG CGC CTA GTC CAG CCC GCA CGC
 R N **D** I M L L R L V Q P A R
 CTG AAC CCC CAG GTG CGC CCC GCG GTG CTA CCC ACG CGT TGC
 L N P Q V R P A V L P T R C
 CCC CAC CCG GGG GAG GCC TGT GTG GTG TCT GGC TGG GGC CTG
 P H P G E A C V V S G W G L
 GTG TCC CAC AAC GAG CCT GGG ACC GCT GGG AGC CCC CGG TCA
 V S H N E P G T A G S P R S
 CAA G gtgcgtgaaaggatggagctggat.....Intron 3.....
 Q
 ctccaagtccactgtcttccccag TG AGT CTC CCA GAT ACG TTG CAT
 V S L P D T L H
 TGT GCC AAC ATC AGC ATT ATC TCG GAC ACA TCT TGT GAC AAG
 C A N I S I I S D T S C D K
 AGC TAC CCA GGG CGC CTG ACA AAC ACC ATG GTG TGT GCA GGC
 S Y P G R L T N T M V C A G
 GCG GAG GGC AGA GGC GCA GAA TCC TGT GAG gtcagagcctagagg
 A E G R G A E S C E
 ggccatcaggcggaaagaagaggg.....Intron 4.....cct
 gagacccctttccccacag GGT GAC TCT GGG GGA CCC CTG GTC
 G D **S** G G P L V
 TGT GGG GGC ATC CTG CAG GGC ATT GTG TCC TGG GGT GAC GTC
 C G G I L Q G I V S W G D V
 CCT TGT GAC AAC ACC ACC AAG CCT GGT GTC TAT ACC AAA GTC
 P C D N T T K P G V Y T K V
 TGC CAC TAC TTG GAG TGG ATC AGG GAA ACC ATG AAG AGG AAC
 C H Y L E W I R E T M K R N
 (TGA)CTATTCTAGCCTATCTCCTGTGCCCTGACTGAGCAGAAGCCCCCACAGCTGCCAGCAGCCC

Figur 1 Fortsetzung

CGCCTGACATGGAACAGAACGGAGCCATCCCCAAGACCCGTCCAAGGCCAGATGTTAGCCAAGG
ACTTGTCCCACCTGAGGACAAAGCTGGCGCTCAAGGTACCTGTTAATGCCAAGATAACAAAGCGC
TGATCCAAGTTGCTCTGTAGGAATTCTGTGACTTTCTGGGGTCAAGAGAAAACCCCGAGACAC
TGTACACTGTTCCCTTTCACCCACCACCCGATCCCTAGGTGAGGAGAAGCGGCTTGAAGCAGGGCT
CCATTCAATTCAACACACATGACCACCCGTGTGATCTGAACAAGAGCCCAATCTCACTTCGCCCTG
GTTTCCTTATCTGTAAAATGAGACCATCTTATTGCTGACTTCAAAGGGCTGTTGTGAGGATTAATG
AGATGATTGCTCTGAACTGATTAAAATCGTGTCTGGCACTGA

Figur 2

Sequence alignment of various proteins (Zyme, KLK-L4, KLK-L6, TLSP, KLK-L3, KLK15, NES1, KLK-L5, Neuropsin, PSA, hK2, hK1, KLK-L2, Prostase, HSCCE) showing their amino acid sequences. The alignment is presented in three blocks, each with a different set of residues highlighted in yellow. The first block highlights positions 1-20, the second 20-67, and the third 67-133. Conserved residues are marked with '+' and gaps with '-'.

Block 1 (positions 1-20):

Zyme	1	-----	MKKLKV	-----	VLSLTAAAWA	-----	EEQ
KLK-L4	1	-----	WFLAI	-----	VIASTILALSGGVSQES	-----	
KLK-L6	1	-----	MFLIUT	-----	ALQVIAATAMTQS	-----	QEDE
TLSP	1	-----	MQRRLRWLRDWKSSGRGLTAKEPGARSSPLQAMRILQLILALATGL	-----	VGGE	-----	
KLK-L3	1	-----	MK	-----	LLSLLAGHG	-----	WAD
KLK15	1	-----	MWLLDT	-----	LSFLLASTAAQ	-----	DG
NES1	1	-----	MRAPHLHLHLSAASGARALAKLUP	-----	LLMAOLWAAEAL	-----	LPQN
KLK-L5	1	-----	MGLSTFLI	-----	LCVVLGISOAAIFPK	-----	IFN
Neuropsin	1	-----	MGRPRPRAAKTWMEL	-----	LLLGGAWAGHSRA	-----	QEDK
PSA	1	-----	MWVPV	-----	FLTISVTWGAAPLIL	-----	
hK2	1	-----	MWFLV	-----	SIAISVGGCTGAVPLIQ	-----	
hK1	1	-----	MWFLV	-----	CLAISLGCTGAAPPIQ	-----	
KLK-L2	1	-----	MATARPPWMVWICA	-----	LTTAIALGVVHVLANNDVSCDHPSNTVPGSNQDL	-----	
Prostase	1	-----	MATAGNPWGWFLG	-----	YIILGVVDSLVS	-----	
HSCCE	1	-----	MARSLLLPLQI	-----	SALETAAGEEAQG	-----	

Block 2 (positions 20-67):

Zyme	20	-----	MKLVHGG	-----	+	+	+
KLK-L4	24	-----	SKVLTNTGNTSGFLPG	-----	YTCFPHSQPWQAAL	-----	LVQG
KLK-L6	23	-----	NKTTGHH	-----	TCTRSOPWQAALLA	-----	LAGPRRRF
TLSP	52	-----	TRIHK	-----	GPECKPHISQPWQAAL	-----	FEKTR
KLK-L3	21	-----	TRATG	-----	AEECOPNSQPWNQAGL	-----	FFILT
KLK15	20	-----	DKLLE	-----	CDECKPHISQPWNQVAL	-----	YERG
NES1	40	-----	DTRLDPEAY	-----	GAPCARGHSQPWQVS	-----	LENGL
KLK-L5	25	-----	GTECGRNSOPWQVS	-----	LENGL	-----	SFHCAGVLDQSNVLT
Neuropsin	33	-----	VLG	-----	QHECQPHISQPWQAAI	-----	FQGQ
PSA	23	-----	SRIVG	-----	GWECQKHISQPWQV	-----	LVASRG
hK2	23	-----	SRIVG	-----	GWECQKHISQPWQV	-----	VYSHG
hK1	23	-----	SRIVG	-----	GWECQKHISQPWQAAL	-----	YHFS
KLK-L2	51	-----	GAGAGEDARSDDSSSP	-----	ITFQCGG	-----	ILVHROWVLTAAHCISD
Prostase	27	-----	SCSQTIN	-----	GSDCDMHTQF	-----	PWQAALLLR
HSCCE	28	-----	DKHID	-----	QAFCA	-----	RGSHPNQVAL

Block 3 (positions 67-133):

Zyme	67	-----	NLQVFLCKHINLR	-----	QRESSQEQQSSVRAV	-----	HPDVAAS
KLK-L4	81	-----	GLKVLGKHALG	-----	RVEAGEQVREVWHSI	-----	HPHPE
KLK-L6	72	-----	ILQVALCKHINLR	-----	RWEATQVQLRWRV	-----	QVTHPANNSRT
TLSP	99	-----	RYIVVHQLQHNLQ	-----	KEEGCEQITRTATE	-----	SP
KLK-L3	68	-----	KWEGLHLW	-----	SPHPGCFNNSLP	-----	-----
KLK15	67	-----	FMRVRLQLEHHNR	-----	-----	-----	-----
NES1	91	-----	PLWARVQCDHIL	-----	LLQG-EQ	-----	RRRTT
KLK-L5	67	-----	RYWVRLQLEHHNL	-----	QDWTIEQFIRHSGF	-----	SVTHEGV
Neuropsin	78	-----	QDWTIEQFIRHSGF	-----	SVTHEGV	-----	LP
PSA	70	-----	KSVVILCRHNL	-----	-----	-----	-----
hK2	70	-----	HPEIDTQV	-----	-----	-----	-----
hK1	70	-----	YQOLWCRHNL	-----	-----	-----	-----
KLK-L2	113	-----	VFRVRLQHYS	-----	SPVYQSGQMFQGV	-----	KSI
Prostase	76	-----	SPVYQSGQMFQGV	-----	-----	-----	-----
HSCCE	75	-----	SPVYQSGQMFQGV	-----	-----	-----	-----

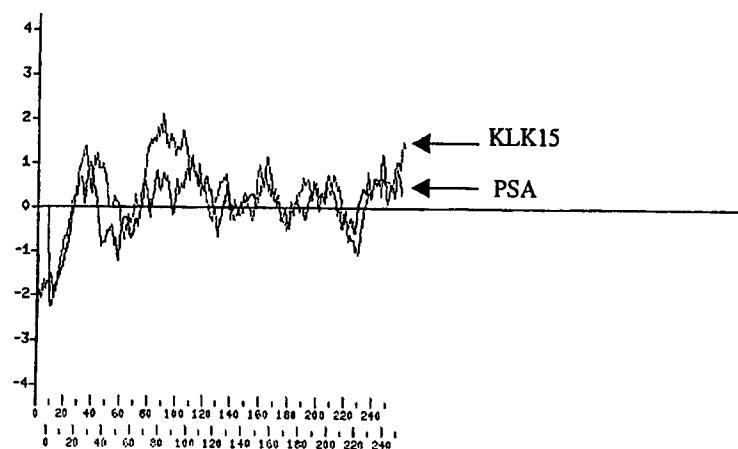
Block 4 (positions 127-133):

Zyme	127	-----	LERDGSANT	-----	TSCHLIGWGKTA	-----	-----
KLK-L4	145	-----	LSHNNRLTPG	-----	-----	-----	-----
KLK-L6	132	-----	VTQACASPE	-----	-----	-----	-----
TLSP	163	-----	LSSRCVTAG	-----	-----	-----	-----
KLK-L3	132	-----	TSCLISWGCGTS	-----	-----	-----	-----
KLK15	127	-----	LSQTCVSPG	-----	-----	-----	-----
NES1	158	-----	MQCLISWGCAVS	-----	-----	-----	-----
KLK-L5	129	-----	LPTRCPHPC	-----	-----	-----	-----
Neuropsin	141	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PSA	141	-----	-----	-----	-----	-----	-----
hK2	141	-----	-----	-----	-----	-----	-----
hK1	142	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KLK-L2	174	-----	VSSHOPSA	-----	-----	-----	-----
Prostase	137	-----	TKCLVSGWCTK	-----	-----	-----	-----
HSCCE	133	-----	IASQOPTPG	-----	-----	-----	-----

Figur 2 Fortsetzung

Zyme	187	KVGKDCS CGD SGGP LV CD HL GLVSWG-NI PCGSK E KPGVY T NVCR Y TN W IQK T QAK
KLK-L4	208	EGGKDCS E GD SGGP LV CR TL Y GV SWG -DF PCGQ F DRPGVY TR SV R VL W IRE T IRK Y ET QQQ KWL KGPQ
KLK-L6	194	QGGKDCS CGD SGGP LV CR GO GL VL WSG-MER CAL PG PGVY T NL CKY RSW EET MRD K
TLSP	225	EGGKDCS CGD SGGP LV C N S Q GL IT SWG-QD PC AI T TK PGVY T KV CKY V D W I Q ET IMK N
KLK-L3	194	EGGRG SCGD SGGP LV C N T LG GV SWG -AEP CSR P RRP A AV T TSV CH Y MD W OE IM N
KLK15	199	GRGAES CGD SGGP LV GG IT LG Q GV SWG -D VPCD NT TK PG PGVY T KV CH Y LE W IRE TE KRN
NES1	219	DRGQDP CGSD SGGP LV CD E T LG Q IT SWG-VY PCG S AGH P AV V TO CKY MSW W INK RSN
KLK-L5	190	VPGQD CGD SGGP LV GG IT LG Q GV SWG -S VPCG Q GDG PG PGVY T Y CKY V D W IR W IMR N
Neuropain	202	SKGAD ACGD SGGP LV CD G AL Q IT LG Q IT SWG-S DP CG RS D KPGVY T NL CKY V D W IK KKI EGSKG
PSA	203	TGGKST CGD SGGP LV CG N VL Q GL IT SWG-SE PC AL ER PS LY T KV W HYRK W IKD T VANP
hK2	203	TEGGK ACGD SGGP LV CG N VL Q GL IT SWG- PE PC AL PE KP A V C KV W HYRK W IKD T VANP
hK1	204	EGGKDL VG D SGGP VL CD G V VL Q GL IT SWG-YV PCG T ENK P S V AVR VL W Q W IE TD TAENS
KLK-L2	235	K AG RD SCGD SGGP LV CG N VL Q GL IT SWG-D YPC AR ENR PG PGVY T NL CKY T KW Q ET Q QAS
Prostase	197	HDQK DS CG ND SGGP LV CG N Y LG VL Q GL IT SWG-K APC Q VG PG PGVY T NL CK F TE W IK W QAS
HSCCE	195	DSK KA CG ND SGGP LV CR G T LG VL Q GL IT SWG-T F PC GQ E ND PG PGVY T W CK E T KW ND T KKHR

Figur 3



Figur 4

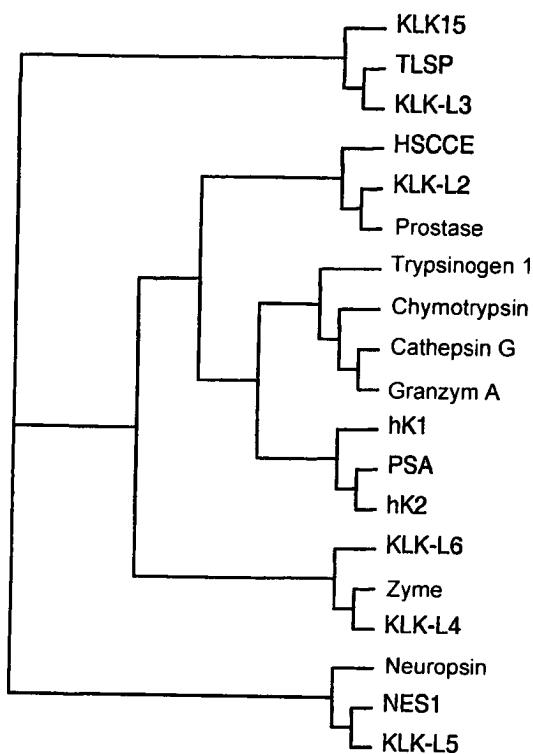
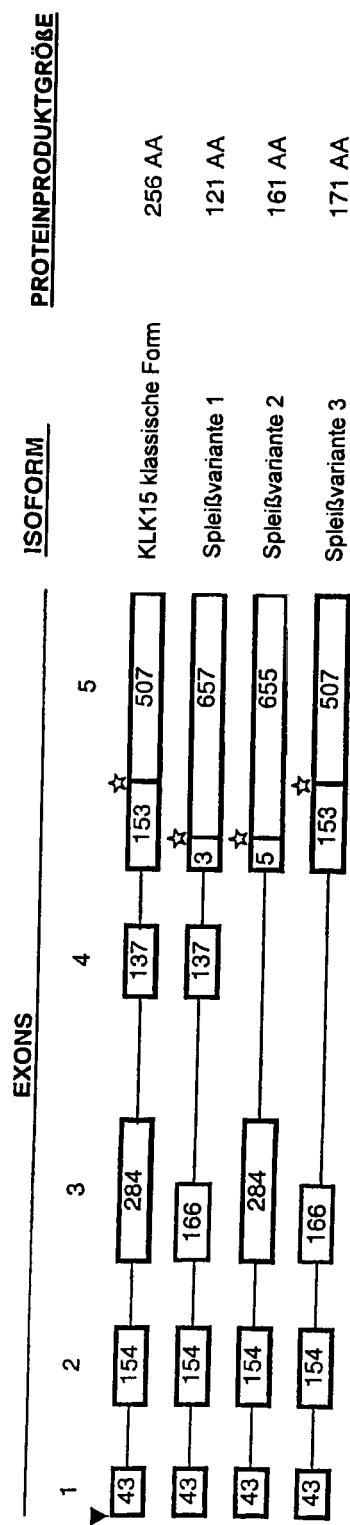
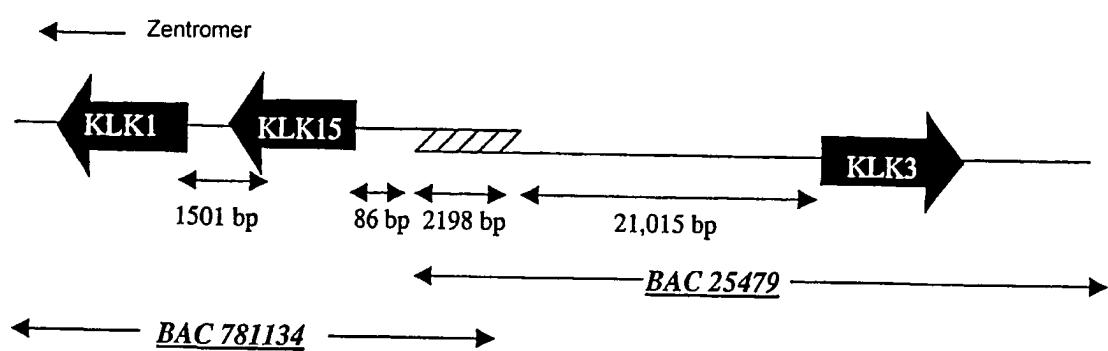


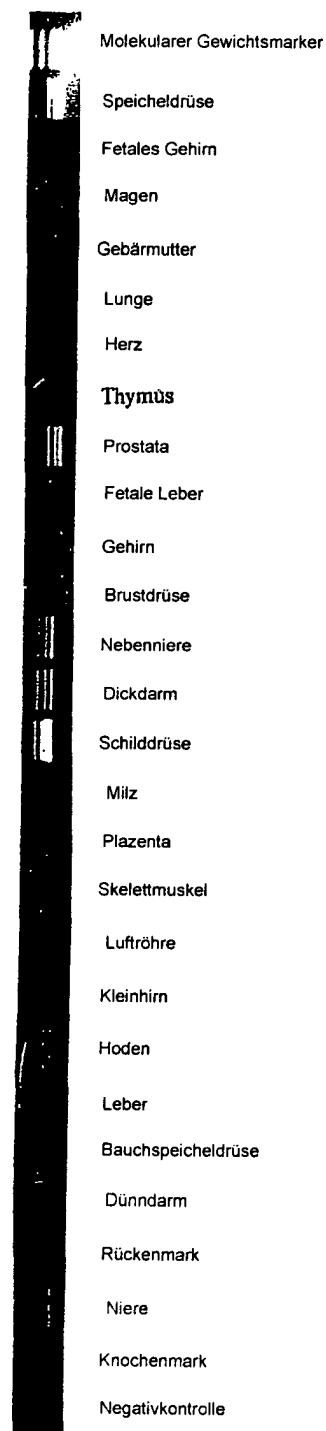
Figure 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8

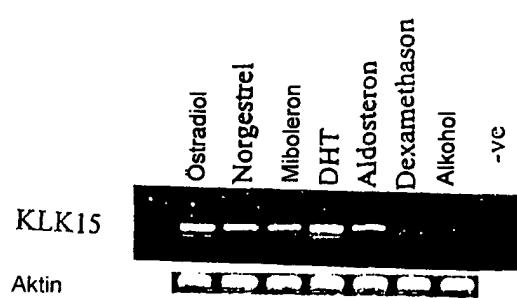


Figure 9

