(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 240 T2** 2004.07.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 706 568 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 240.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/07089**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 920 799.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/000642**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.06.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **05.01.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.10.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C12N 15/70, C07K 14/00, C12N 1/21, C12P 21/08, G01N 33/53, C12Q 1/68, C12Q 1/00, A61K 48/00, A61K 38/00

(30) Unionspriorität:
81448 22.06.1993 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Arch Development Corp., Chicago, Ill., US; The Regents of the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., US

(72) Erfinder:
THOMPSON, B., Craig, Chicago, US; BOISE, Lawrence H., Chicago, US; NUNEZ, Gabriel, Ann Arbor, US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: **APOPTOSEGEN VON WIRBELTIEREN, ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERWENDUNGEN**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft allgemein Zusammensetzungen und Verfahren zum Verändern oder Regulieren des programmierten Zelltods (Apoptose) von Vertebraten. Die Erfindung betrifft genauer gesagt DNA-Sequenzen, die Polypeptide kodieren, die die Apoptose fördern oder hemmen, rekombinante Vektoren, die solche Sequenzen tragen, rekombinante Wirtszellen, die entweder die Sequenzen oder Vektoren einschließen, und Polypeptide. Die Erfindung schließt sowohl Verfahren zur Verwendung der isolierten, rekombinanten Polypeptide in Tests ein, die zur Auswahl und Verbesserung solcher Kandidatensubstanzen entwickelt wurden, welche die Apoptose beeinflussen, wie auch Polypeptide und Polynukleotide zur Verwendung in diagnostischen, Wirkstoffentwicklungs- und therapeutischen Anwendungen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Kontrolle der Zellzahl in multizellulären Eukaryoten stellt ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod dar. Obwohl man in den letzten Jahren eine Menge über die Regulation der Zellproliferation gelernt hat, ist nur relativ wenig über die Regulation des Zelltods bekannt (Ellis et al., 1991; Raff, 1992). In letzter Zeit hat sich die Aufmerksamkeit auf die Mechanismen zu fokussieren begonnen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren (Williams, 1991). Die Apoptose ist ein aktiver Prozess, in dem viele Zellen in komplexen Eukaryoten während der Entwicklung und Selbsterhaltung sterben (Kerr et al., 1972). Der Zelltod durch Apoptose tritt auf, wenn eine Zelle ein intern kodiertes Selbstmordprogramm als ein Ergebnis von entweder extrinsischen oder intrinischen Signalen aktiviert. Der apoptotische Zelltod ist durch Blasenbildung der Plasmamembran (plasma membrane blebbing), Verlust an Zellvolumen, Kernkondensation und endonukleolytischen Abbau von DNA bei nukleosomalen Intervallen charakterisiert (Wyllie et al, 1980).

[0003] Zwei der am besten untersuchten Vertebratensysteme, in welchen der programmierte Zelltod eine Rolle spielt, sind die neuronale und die lymphoide Entwicklung. Während der T-Zellentwicklung im Thymus bildet jeder einzelne T-Zellvorläufer einen einmaligen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) durch kombinatorisches Wiederzusammenfügen von TCR-Genabschnitten, und die Zelle durchläuft anschließend eine Reihe von Selektionsprozessen (Blackman et al., 1990; Rothenberg, 1992). Autoreaktive TCRs-exprimierende T-Zellen werden als ein Ergebnis einer negativen Selektion durch Apoptose zerstört (Murphy et al., 1990). Andere Zellen durchlaufen eine positive Selektion durch Interaktion mit selbstkodierten Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex(MHC)-Molekülen, die auf Stroma-Zellen des Thymus exprimiert werden, ein Prozess, der programmierten Zelltod verhindert und in der anschließenden MHC-Restriktion in dem reifen T-Zell-Repertoire resultiert. Ein zusätzlicher Satz von Thymuszellen stirbt als Ergebnis der Vernachlässigung, der Abwesenheit von entweder negativer oder positiver Selektion. Ein umfangreicher Zelltod tritt auch im sich entwickelnden Nervensystem auf (Cowan et al., 1984; Davies, 1987; Oppenheim, 1991). Nach einer anfänglichen Expansion von Neuronen während der Entwicklung tritt eine signifikante Umbildung neuronaler Strukturen als ein Ergebnis der Etablierung von synaptischer Wechselwirkungen auf. Während dieser Umbildungsphase wird das Überleben der Neuronen von ihrer Versorgung mit neurotrophen Wachstumsfaktoren bestimmt. Zellen, die Wachstumsfaktor-defizient werden, sterben aufgrund von Apoptose. Wenn die synaptischen Verbindungen etabliert sind, entwickeln sich die überlebenden Neuronen zu post-mitotischen Zellen mit einer ausgedehnten Lebensdauer. Folglich spielt der programmierte Zelltod eine wesentliche Rolle in der lymphoiden Entwicklung durch Entfernen autoreaktiver T-Zellen und im Nervensystem durch Erleichterung der Etablierung von wirksamen synaptischen Netzwerken.

[0004] Wegen der Wichtigkeit des programmierten Zelltods für diese Entwicklungsprozesse ist ein bemerkenswertes Interesse an Genen entstanden, die in der Lage sind, die Apoptose zu regulieren. Einer der wichtigsten Fortschritte beim Verständnis der Regulation des apoptotischen Zelltods in Vertebraten kam aus Studien des Onkogens bcl-2. bcl-2 wurde ursprünglich aus der Bruchstelle einer t(14; 18) Translokation, die in vielen humanen B-Zell-Lymphomen vorhanden ist, kloniert (Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1986). Diese Translokation resultiert in der deregulierten Expression des bcl-2-Gens als ein Ergebnis seiner Juxtaposition mit dem Genlokus der schweren Kette des Immunglobulins (Bakhshi et al., 1985). In vitro, wurde von BCL-2 (dem Genprodukt von bcl-2; SEQ ID NR: 5) gezeigt, dass es den apoptotischen Zelltod in kultivierten Zellen, die Wachstumsfaktordepriviert waren, verhindert (Vaux et al., 1988; Hockenbery et al., 1990; Nuñez et al., 1990; Borzillo et al., 1992; Garcia et al., 1992). Allerdings ist BCL-2 nicht in der Lage, die Apoptose, die durch Zytokindeprivierung oder Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung induziert war, in allen Zellen zu blockieren. Zum Beispiel verhindert BCL-2 die Apoptose in hämatopoetischen Zelllinien, die von bestimmten Interleukinen (IL) IL-3, IL-4 oder GM-CSF abhängig waren, aber es vermochte nicht andere Zelllinien von der Apoptose als Folge von IL2- oder IL6-Deprivierung abzuhalten (Nuñez et al., 1990). Überexpression von BCL-2 versagt auch dabei, die Antigen-Rezeptor-induzierte Apopptose in einigen B-Zelllinien zu verhindern (Cuende et al., 1993). In vivo verhin-

dert BCL-2 viele, aber nicht alle, Formen von apoptotischem Zelltod, die während der lymphoiden (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991a; Strasser et al., 1991b; Seigel et al., 1992) und neuronalen (Allsop et al., 1993) Entwicklung auftreten. Die Expression eines bcl-2-Transgens kann Strahlungs- und Calciumionophor-induzierten apoptotischen Zelltod in Thymozyten verhindern, aber sie hemmt nicht den Prozess der negativen Selektion (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991a) In ähnlicher Weise kann die Überexpression von bcl-2 die Apoptose in Neuronen, die von Nervenwachstumsfaktor abhängen, aber nicht in Neuronen, die von ciliärem neurotrophischem Faktor abhängen, verhindern (Allsop et al., 1993). Diese Ergebnisse legen die Existenz einer Vielzahl unabhängiger intrazellulärer Mechanismen der Apoptose nahe, von denen einige durch BCL-2 verhindert werden können und andere von diesem Gen unbeeinflusst sind. Alternativ können diese zusätzlichen Wege Proteine involvieren, die die BCL-2-Funktion anderweitig regulieren.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0005] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid zur Verfügung, das BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) kodiert. Noch mehr bevorzugt umfasst ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung die Nukleotidbasensequenzen der SEQ ID NR: 1 und 3 (**Fig.** 1A); SEQ ID NR: 6 (**Fig.** 4A) oder SEQ ID NR: 8 (**Fig.** 4B).

[0006] Als ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid betrachtet, das eine Basensequenz enthält, die identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 14 aufeinander folgenden Basen der SEQ ID NR: 1 und 3 (**Fig.** 1A), SEQ ID NR: 6 oder SEQ ID NR: 8 ist, wobei das Polynukleotid mit einem Polynukleotid hybridisiert, das ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Vorzugsweise umfasst das isolierte und gereinigte Polynukleotid eine Basensequenz, die identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 25 bis 70 aufeinander folgenden Basen der SEQ ID NR: 1 und 3 (**Fig.** 1A), SEQ ID NR: 6 oder SEQ ID NR: 8 ist. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Polynukleotid einen Basenabschnitt umfassen, der identisch oder komplementär zu 40 oder 55 aufeinander folgenden Basen der offenbarten Nukleotidsequenzen ist.

[0007] In einer anderen Ausführungsform zieht die vorliegende Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Polypeptid in Betracht, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, so wie beansprucht. Vorzugsweise ist ein erfindungsgemäßes Polypeptid ein rekombinantes Polypeptid. Genauer gesagt ist ein erfindungsgemäßes Polypeptid BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Noch mehr bevorzugt umfasst ein erfindungsgemäßes Polypeptid die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NR: 2 (**Fig.** 1A) oder der **Fig.** 4A–4C (SEQ ID NRN: 4, 7 und 9).

[0008] In einer alternativen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen Expressionsvektor zur Verfügung, der ein Polynukleotid umfasst, das ein Polypeptid (SEQ ID NR: 5) kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, so wie beansprucht. Genauer gesagt umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das BCL-X_L (SEQ ID NR: 6), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) und BCL-X_1 (Position 510–698 von SEQ ID NR: 6) kodiert. Weiter bevorzugt enthält ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das ein Polypeptid kodiert, das eine Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NR: 2 (**Fig.** 1A) oder SEQ ID NRN: 4, 7 und 9 (**Fig.** 4A–4C) umfasst. Weiter bevorzugt umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das die Nukleotidbasensequenz von SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1A) oder SEQ ID NRN: 6 und 8 (**Fig.** 4A–4C) umfasst. Noch weiter bevorzugt umfasst ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen Enhancer-Promotor geknüpft ist. Noch mehr bevorzugt umfasst der erfindungsgemäße Expressionsvektor ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen prokaryotischen Promotor geknüpft ist. Alternativ umfasst der Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen Enhancer-Promotor geknüpft ist, der ein eukaryotischer Promotor ist, und der Expressionsvektor umfasst weiterhin ein Polyadenylierungssignal, das 3' zu der Carboxy-terminalen Aminosäure und innerhalb der Transkriptionseinheit des kodierten Polypeptids positioniert ist.

[0009] In einer noch anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine rekombinante Wirtszelle zur Verfügung, die mit einem Polynukleotid transfiziert wurde, das ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, so wie beansprucht wurde. Die **Fig.** 1 und 4 führen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus den beispielhaften Vertebraten Huhn und Mensch aus. Auch von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden homologe oder biologisch äquivalente Polynukleotide und Polypeptide, die nicht BCL-2 sind (SEQ ID NR: 5), die in anderen Vertebraten gefunden werden. Vorzugsweise ist eine rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung mit dem Polynukleotid transfiziert, das BCL-X_L (SEQ ID NR: 6), BCL-X_S (SEQ ID NR: 8) und BCL-X_1 (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) kodiert. Mehr bevorzugt ist eine rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung mit der Polynukleotidsequenz der SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1A) oder SEQ ID NRN: 6 und 8 (**Fig.** 4A–4C) transfiziert. Sogar weiter bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Wirtszelle eine eukaryotische Wirtszelle. Noch

mehr bevorzugt ist eine rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung eine Vertebratenzelle. Vorzugsweise ist eine erfindungsgemäße rekombinante Wirtszelle eine Säugerzelle.

[0010] In einem weiteren Aspekt ist eine rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung eine prokaryotische Wirtszelle. Vorzugsweise ist eine erfindungsgemäße rekombinante Wirtszelle eine Bakterienzelle, vorzugsweise ein Stamm von Escherichia coli. Mehr bevorzugt umfasst eine rekombinante Wirtszelle ein Polynukleotid unter der transkriptionellen Kontrolle von regulatorischen Signalen, die in der rekombinanten Wirtszelle funktional sind, wobei die regulatorischen Signale in geeigneter Weise die Expression des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, in einer Weise kontrollieren, um alle notwendigen transkriptionalen oder posttranskriptionalen Modifikationen zu ermöglichen.

[0011] In einer noch anderen Ausführungsform zieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen des gewünschten Polypeptids in Betracht, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, welches das Transfizieren einer Zelle mit einem Polynukleotid umfasst, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, um eine transformierte Wirtszelle herzustellen; und Halten der transformierten Wirtszelle unter biologischen Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids ausreichen. Vorzugsweise ist die transformierte Wirtszelle eine eukaryotische Zelle. Noch weiter bevorzugt ist die eukaryotische Zelle eine Vertebratenzelle. Alternativ ist die Wirtszelle eine prokaryotische Zelle. Weiter bevorzugt ist die prokaryotische Zelle eine Bakterienzelle des Stamms DH5α von Escherichia coli. Genauer gesagt umfasst ein Polynukleotid, das in die transformierte Zelle transfiziert wird, die Nukleotidbasensequenz von SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1A) oder SEQ ID NRN: 6 und 8 (**Fig.** 4A–4C). Die **Fig.** 1 und 4 führen die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen für die beispielhaften Vertebraten Huhn und Mensch aus. Auch von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen sind homologe oder biologisch äquivalente Polynukleotide und Polypeptide, die nicht bcl-2/BCL-2 (SEQ ID NR: 5) sind, die in anderen Vertebraten gefunden werden.

[0012] In einer noch anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen Antikörper bereit, der mit einem Polypeptid immunreaktiv ist, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, so wie beansprucht. Die **Fig.** 1 und 4 führen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus den beispielhaften Vertebraten Huhn und Mensch aus. Auch von der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen sind Antikörper, die mit homologen oder biologisch äquivalenten Polynukleotiden und Polypeptiden, die nicht bcl-2 sind, immunreaktiv sind, die in anderen Vertebraten gefunden werden. Vorzugsweise ist ein erfindungsgemäßer Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Genauer gesagt, ist ein Polypeptid, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Vorzugsweise umfasst ein Polypeptid die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NR: 2 (**Fig.** 1) oder SEQ ID NRN: 4, 7 und 9 (**Fig.** 4A–4C).

[0013] In einem weiteren Aspekt erwägt die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zum Herstellen eines immunreaktiven Antikörpers mit dem gewünschten Polypeptid, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, umfassend die Schritte (a) Transfizieren einer rekombinanten Wirtszelle mit einem Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt; (b) Kultivieren der Wirtszelle unter Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids ausreichen; (c) Gewinnen des Polypeptids; und (d) Herstellen des Antikörpers gegen das Polypeptid. Die **Fig.** 1 und 4 führen die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus den beispielhaften Vertebraten Huhn und Mensch aus. Vorzugsweise ist die Wirtszelle mit dem Polynukleotid der SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1A) oder SEQ ID NRN: 6 und 8 (**Fig.** 4A–4C) transfiziert. Sogar mehr bevorzugt stellt die vorliegende Erfindung einen Antikörper bereit, der gemäß dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt wurde. Auch durch die vorliegende Erfindung in Betracht gezogen ist die Verwendung von homologen oder biologisch äquivalenten Polynukleotiden und Polypeptiden, die nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) sind, die in anderen Vertebraten gefunden werden, um Antikörper herzustellen.

[0014] Alternativ stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen eines Polypeptids bereit, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei das Verfahren umfasst Immunreagieren des Polypeptids mit einem Antikörper, der gemäß dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt wurde, um ein Antikörper-Polypeptid-Konjugat zu bilden, und Nachweisen des Konjugats, so wie beansprucht.

[0015] In noch einer weiteren Ausführungsform zieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen eines Messenger-RNA-Transkripts in Betracht, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei das Verfahren umfasst (a) Hybridisieren des Messenger-RNA-Transkripts mit einer Polynukleotidsequenz, die dieses Polypeptid kodiert, um eine Duplex zu bilden; und (b) Nachweisen der Duplex. Zusätzlich ist ein Verfahren zum Nachweisen eines DNA-Moleküls, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, beschrieben, wobei das Verfahren

umfasst (a) Hybridisieren von DNA-Molekülen mit dem gewünschten Polynukleotid, das ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, um eine Duplex zu bilden; und (b) Nachweisen der Duplex.

[0016] In einem anderen Aspekt erwägt die vorliegende Offenbarung einen diagnostischen Testkit zum Nachweisen der Gegenwart des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten in einer biologischen Probe fördert oder hemmt, wobei der Kit umfasst ein erstes Behältnis, enthaltend einen Erstantikörper, der zur Immunreaktion mit dem gewünschten Polypeptid in der Lage ist, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei der Erstantikörper in einer Menge, die zur Durchführung mindestens eines Tests ausreichend ist, vorhanden ist. Vorzugsweise umfasst solch ein Testkit weiter ein zweites Behältnis, enthaltend einen Zweitantikörper, der mit dem Erstantikörper immunreagiert. Weiter bevorzugt sind die in einem solchen Testkit verwendeten Antikörper monoklonale Antikörper. Sogar mehr bevorzugt ist der Erstantikörper an einem festen Träger befestigt. Noch weiter bevorzugt umfassen die Erst- und Zweitantikörper einen Indikator und der Indikator ist, vorzugsweise, ein radioaktiver Marker oder ein Enzym.

[0017] In einem alternativen Aspekt stellt die vorliegende Offenbarung einen diagnostischen Testkit zum Nachweisen der Gegenwart des gewünschten Polynukleotids in einer biologischen Probe zur Verfügung, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei die Kits ein erstes Behältnis umfassen, das ein zweites Polynukleotid enthält, das identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 14 aufeinander folgenden Nukleotidbasen von bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) oder bcl-x_1 (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) ist.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform zieht die vorliegende Offenbarung einen diagnostischen Testkit zum Nachweisen der Gegenwart eines Antikörpers in einer biologischen Probe in Betracht, der immunreaktiv mit dem gewünschten Polypeptid ist, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei der Kit ein erstes Behältnis umfasst, das das gewünschte Polypeptid enthält, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, das mit dem Antikörper immunreagiert, wobei das Polypeptid in einer Menge, die zur Durchführung mindestens eines Tests ausreichend ist, vorhanden ist.

[0019] Zusätzlich ist ein Verfahren zum Vorbeugen oder Behandeln des programmierten Zelltods in Zellen beschrieben, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Herstellen eines nicht-pathogenen Vektors umfassend ein Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt; und

(b) Einführen des nicht-pathogenen Vektors in Zellen, die den programmierten Zelltod durchlaufen oder wahrscheinlich durchlaufen werden.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Vektor ein Retrovirus, ein Vacciniavirus, ein Picornavirus, ein Coronavirus, ein Togavirus oder ein Rhabdovirus, das in einer solchen Weise geändert wurde, die es nicht-pathogen macht.

[0021] Vorzugsweise ist die Zelle eine neuronale Zelle und das Verfahren umfasst weiter das Einführen des Vektors in die Zellen, die den programmierten Zelltod durchlaufen oder wahrscheinlich durchlaufen werden, durch ein Verfahren umfassend das Transplantieren der Zellen einer multipotenten neuronalen Zelllinie in eine Region des zentralen Nervensystems, in welcher diese neuronalen Zellen, die den programmierten Zelltod durchlaufen oder wahrscheinlich durchlaufen werden, lokalisiert sind. Alternativ wird der Vektor in neuronale Zellen eines Tiers durch Injektion des Vektors an der Stelle der peripheren Nervenendigungen von neuronalen Zellen, die den Zelltod durchlaufen oder wahrscheinlich durchlaufen werden, oder in neuronale Zellen in Kultur, die den Zelltod wahrscheinlich durchlaufen werden oder durchlaufen, durch Inkubieren des Vektors mit den neuronalen Zellen eingeführt.

[0022] In noch weiteren Aspekten werden ein Verfahren zum Screenen einer Substanz auf ihre Fähigkeit, den programmierten Zelltod zu verändern, und ein Verfahren zum Beeinflussen des programmierten Zelltods in einer Zelle, wie in den Ansprüchen definiert, zur Verfügung gestellt.

[0023] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung das gewünschte Polypeptid zur Verwendung in einem Verfahren zum Vorbeugen oder Behandeln des programmierten Zelltods in neuronalen Zellen und Lymphozyten zur Verfügung. Vorzugsweise umfasst dieses Verfahren:

(a) Herstellen des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt;

(b) Kombinieren des gewünschten Polypeptids mit einem physiologisch geeigneten Träger, um eine pharmazeutische Zusammensetzung zu bilden; und

(c) Verabreichen der Zusammensetzung an Neuronen oder Lymphozyten, die einen programmierten Zelltod wahrscheinlich durchlaufen werden oder gerade durchlaufen.

[0024] Zusätzlich betrifft die Erfindung die Verwendung von BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) zur Herstellung eines Arzneimittels zum Vorbeugen oder Behandeln des programmierten Zelltods in neuronalen Zellen oder Lymphozyten.
[0025] In noch anderen Aspekten stellt die Erfindung das Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1–3 zur Verwendung in einem Verfahren zum Verändern des programmierten Zelltods, das Polypeptid von Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zum Vorbeugen oder Behandeln des programmierten Zelltods in neuronalen Zellen oder Lymphozyten, ein Gen kodierend das Polypeptid von Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zum Verabreichen des Gens zur Gentherapie und den Expressionsvektor von Anspruch 7 oder 8 zur Verwendung in einem Verfahren zum Behandeln tumorigener Krankheiten zur Verfügung.
[0026] Zusätzlich ist ein Verfahren zum Verabreichen eines Gens, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, zur Gentherapie beschrieben, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Bereitstellen des Vektors von Anspruch 7;
(b) Kombinieren des Vektors mit einem physiologisch geeigneten Träger, um eine pharmazeutische Zusammensetzung zu bilden; und
(c) Verabreichen dieser pharmazeutischen Zusammensetzung, so dass der Vektor die beabsichtigten Zellziele erreichen wird.

[0027] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die pharmazeutische Zusammensetzung durch Injektion in ein Tier an der Stelle dieser Zellziele eingeführt und die Zellziele sind im zentralen Nervensystem und die pharmazeutische Zusammensetzung wird durch Injektion in ein Tier an der Stelle der peripheren Nervenendigungen eingeführt, die von Neuronen, die an der Stelle der Zellziele lokalisiert sind, stammen.
[0028] Zusätzlich ist ein Verfahren zum Behandeln tumorigener Krankheiten beschrieben, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Bereitstellen eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 7;
(b) Kombinieren des Vektors mit einem physiologisch geeigneten Träger, um eine pharmazeutische Zusammensetzung zu bilden; und
(c) Verabreichen der Zusammensetzung an Tumorzellziele.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0029] In den Zeichnungen, die einen Teil der Beschreibung bilden:
[0030] **Fig.** 1. Nukleotidsequenz und vorhergesagter offener Leserahmen von bcl-x des Huhns (SEQ ID NRN: 1 und 3). A. Die Nukleotidsequenz von bcl-x des Huhns (SEQ ID NRN: 1 und 3) stellt eine zusammengesetzte Sequenz dar, die aus einem cDNA-Klon und dem entsprechenden genomischen Klon abgeleitet ist. Die cDNA bestand aus einem 1,3 kb Klon, dessen 5'-Ende durch den Pfeil angezeigt ist. Das 5'-Ende der Sequenz wurde aus einem genomischen Klon erhalten und zeigt das 5'-Ende eines vorhergesagten offenen Leserahmens sowie 257 zusätzliche Nukleotide, die mit einer 5' NarI-Stelle enden. Das putative Startkodon stimmt schwach mit der eukaryotischen Translationsstart-Konsensussequenz überein, wohingegen eine eukaryotische Konsensusstartsequenz nicht im Leserahmen 32 Nukleotide 5' von dieser Stelle auftritt. Sowohl die cDNA als auch die genomischen Sequenzen enden bei einer natürlichen EcoRI-Schnittstelle. B. Der Aminosäurevergleich des vorhergesagten offenen Leserahmens aus bcl-x des Huhns (SEQ ID NR: 2) (obere Sequenz) mit dem offenen Leserahmen aus der humanen bcl-2b (SEQ ID NR: 5) Proteinsequenz (untere Sequenz). Eine Suche in GenBank ergab, dass bcl-x eine signifikante Homologie mit allen Formen von bcl-2 zeigte, die in GenBank vorhanden waren, mit der höchsten Homologie zu der bcl-2b-Form. Wie die bcl-2b cDNA scheint die bcl-x cDNA (SEQ ID NRN: 1 und 3) aus einer ungespleissten RNA entstanden zu sein, da sie kolinear mit der genomischen Sequenz ist, von der sie abgeleitet ist. **Fig.** 2 enthält zwei Bilder.
[0031] **Fig.** 2. blc-x mRNA-Expression in Geweben, die aus einem frisch ausgeschlüpften Huhn isoliert wurden. Gewebe-mRNAs, die aus einem Huhn am Tag des Schlüpfens isoliert wurden, wurden mit einer Huhn-bcl-x-spezifischen Sonde wie auch einer murinen bcl-2-Sonde hybridisiert. Während die murine bcl-2-Sonde eine 6,5 kb mRNA erkannte, die durch den Pfeil angezeigt ist und die in allen getesteten Geweben vorhanden war, hybridisierte die bcl-x-Sonde mit einer 2,7 kb mRNA, die durch den Pfeil angezeigt ist.
[0032] **Fig.** 3. Southern-Blot-Analyse von bcl-x und bcl-2 unter Verwendung von genomischer DNA aus Huhn, Maus und Mensch. Genomische DNA aus Hühnern, Mäusen und Menschen wurde mit BamHI (B), HindIII (H) und PstI (P) verdaut. Die resultierende DNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf Nitrozellulose überführt. Die Southern-Blots wurden mit spezifischen Sonden, die aus dem ersten kodierenden Exon des murinen bcl-2 und einer ähnlichen Region aus Huhn-bcl-x isoliert waren, hybridisiert und die resultierenden Autoradiogramme sind gezeigt.
[0033] **Fig.** 4. Vorhergesagte Aminosäuresequenz der humanen mRNAs im Vergleich zu Huhn-bcl-x (SEQ ID NR: 2). In den **Fig.** 4A und 4B sind die vorhergesagten offenen Leserahmen zweier distinkter humaner cDNAs

(bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) bzw. bcl-x_S (SEQ ID NR: 8)) mit Homologie zu Huhn-bcl-x. In **Fig.** 4C ist die 63 Aminosäureregion (SEQ ID NR: 4) des humanen BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), die im humanen BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) deletiert ist, durch Punkte gekennzeichnet. Eine vorhergesagt 19 Aminosäure lange hydrophobe Domäne und flankierende geladene Reste, die sowohl in BCL-X_L (SEQ ID NR: 7) als auch BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) vorhanden sind, sind durch Unterstreichung bzw. Sterne gekennzeichnet. Die mittlere Hydrophobizität dieser Domäne, die sowohl in BCL-X_L (SEQ ID NR: 7) als auch BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) vorhanden ist, wurde mittels Kyte-Doolittle-Verfahren als 1,3 kalkuliert. Die **Fig.** 4 enthält drei Bilder.

[0034] **Fig.** 5. Translationsprodukte von bcl-x_L- und bcl-x_S-mRNAs. Sowohl bcl-x_L- als auch bcl-x_S-mRNAs wurden einer in-vitro-Translation in Gegenwart von 35S-radioaktiv markiertem Methionin unterzogen. Die resultierenden translatierten Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel laufen gelassen. Die Größen der resultierenden Proteine sind auf der rechten Seite in Kilodalton angezeigt. Das Ergebnis einer Translationsreaktion unter Verwendung von bcl-x_L Antisense-mRNA (bcl-x_L-as) ist als Kontrolle gezeigt, um die Spezifität der Translationsprodukte zu demonstrieren.

[0035] **Fig.** 6. Die Wirkung der bcl-x_L-Expression auf das Überleben von FL5.12-Zellen nach IL-3-Entzug. Stabile Transfektanten von FL5.12 mit dem pSFFV-Neo-Vektor enthaltend bcl-x_L in Vorwärts- (blc-x_L; B) und Rückwärtsorientierung (bcl-$x_L$rev; Ñ), bcl-2 (H), bcl-2 + bcl-x_L (F) und Vektorkontrolle (Neo; J) wurden wie in den Beispielen beschrieben hergestellt. Das Zellüberleben wurde durch Trypan-Blau-Ausschluss zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert + S.D. von Triplikatskulturen dargestellt.

[0036] **Fig.** 7. Stabile Expression von bcl-x_S verhindert das bcl-2-induzierte Überleben von FL5.12-Zellen nach IL-3-Entzug. A. Stabile Transfektanten von FL5.12, die bcl-2 (J), bcl-x_S (H), bcl-2 + bcl-x_S (É) oder den selektionierbaren Marker Neomycin alleine (Neo; B) exprimierten, wurden wie in den Beispielen beschrieben hergestellt. Zusätzlich wurden einzelne Subklone von bcl-x_S (bcl-x_S Klon 1 [Ñ] und bcl-x_S Klon 2 [F]) analysiert. Zum Zeitpunkt Null wurde den exponentiell wachsenden Zellen die IL-3-Unterstützung entzogen und das Überleben über die Zeit durch Trypan-Blau-Ausschluss analysiert. Der untere Teil der Figur zeigt eine Flusszytometrieanalyse der Neomycin-(Neo), bcl-2- und blc-2 + bcl-x_S-Hauptpopulationen. Die Zellen wurden wie in den Beispielen angegeben permeabilisiert und dann mit einem für humanes bcl-2 spezifischen monoklonalen Antikörper (dicke Linie) oder einem irrelevanten Kontrollantikörper (dünne Linie) gefärbt. B. Überleben von einzelnen bcl-2 + bcl-x_S Subklonen nach IL-3-Entzug. Das Überleben von Subklonen, die sowohl bcl-2 als auch bcl-x_S exprimierten, wurde nach Wachstumsfaktorentzug wie oben beschrieben analysiert (bcl-2 + bcl-x_S Klon 1 und bcl-2 + bcl-x_S Klon 2). In der unteren Hälfte der Figur ist eine Flusszytometrieanalyse für bcl-2-Expression in den Neomycin-, bcl-2-, bcl-2 + bcl-x_S Klon 1-, bcl-2 + bcl-x_S Klon 2-Populationen gezeigt. Die Zellen wurden wie in den Beispielen beschrieben permeabilisiert und dann mit einem für humanes bcl-2 spezifischen monoklonalen Antikörper (dicke Linie) oder einem irrelevanten Isotyp-angepassten Kontrollantikörper (dünne Linie) gefärbt und die Daten als Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl gezeigt. C. Expression von bcl-x-RNA in stabil transfizierten FL5.12-Zelllinien. RNA wurde aus jedem der oben angegebenen Klone isoliert und auf einem Northern-Blot durch Hybridisierung mit einer bcl-x-spezifischen und einer b-actin-spezifischen Sonde analysiert. **Fig.** 7 besteht aus drei Bildern.

[0037] **Fig.** 8. bcl-2-induziertes Überleben von FL5.12-Zellen nach IL-3-Entzug ist durch Antisense-bcl-x_S-Expression unbeeinflusst. FL5.12-Zellen, die entweder mit bcl-2 (J) oder bcl-2 plus einem Expressionsvektor enthaltend in umgekehrter Orientierung kloniertes bcl-x_S (bcl-2 + bcl-$x_S$rev; H) oder Neomycin alleine (Neo; B) stabil transfiziert waren, wurden auf ihr Überleben nach IL-3-Entzug analysiert. In den unteren Bildern wurde der Spiegel der bcl-2-Expression auf einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer durch Färben permeabilisierter Zellen mit für bcl-2 spezifischen monoklonalen Antikörpern (dicke Linien) oder einem irrelevanten Kontrollantikörper (dünne Linien) analysiert.

[0038] **Fig.** 9. Expression von bcl-x in humanen Thymozyten und T-Zellen. Um die Expression von bcl-x während der T-Zellentwicklung zu untersuchen, wurde RNA aus nicht getrennten Thymozyten, unreifen Thymozyten, reifen Thymozyten und T-Zellen des peripheren Bluts, wie in den Beispielen beschrieben, hergestellt. Die unreifen Thymozyten, reifen Thymozyten und T-Zellpopulationen wurden durch in-vitro-Stimulation mit PMA und Ionomycin für 6 bis 8 Stunden in Komplettmedium weiter analysiert. Die resultierenden RNAs wurden durch das Guanidiniumisothiozyanat-Verfahren isoliert und einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Die oberen Bilder zeigen das Ausgeglichensein der zur Analyse verwendeten RNA-Proben und die unteren zwei Bilder repräsentieren die Hybridisierung mit einer bcl-x-spezifischen Sonde oder einer HLA-Klasse I-spezifischen Sonde.

[0039] **Fig.** 10. Muster der bcl-x und bcl-2 mRNA-Induktion nach Aktivierung von T-Zellen des peripheren Bluts. T-Zellen des peripheren Bluts wurden wie in den Beispielen beschrieben isoliert und dann einer Aktivierung mit einer Kombination von PMA und Ionomycin für 0, 6, 12 oder 24 Stunden wie angegeben unterzogen. Die relative Induktion von bcl-x und bcl-2 wurde analysiert, indem man RNA aus verschiedenen Zeitpunkten für ribosomale RNA ausglich (oberes Bild). Northern Blots in Duplikaten wurden auf entweder bcl-x oder bcl-2 und HLA-Klasse I-mRNA sondiert. In den gezeigten Daten wurde das bcl-x-Autoradiogramm für 8 Stunden bestrahlt, wohingegen das bcl-2-Autoradiogramm für 15 Tage bestrahlt wurde; beide Sonden hatten eine ähnliche

Länge und Basenzusammensetzung.

[0040] **Fig.** 11. Analyse der relativen Verhältnisse von bcl-x_S und bcl-x_L mRNAs, die in humanen Thymozyten, T-Zellen und im adulten Gehirn exprimiert sind. PCR-Primer, die die 5'- und 3'-Enden des offenen Leserahmens von bcl-x_S flankieren, wurden verwendet, um gleichzeitig bcl-x_L und bcl-x_S zu amplifizieren. Unter Verwendung dieser Primer wurden RNAs verschiedener Quellen einer PCR-Analyse unterzogen. Wenn ein bcl-x_S-Template verwendet wird, wird eine einzelne Bande von 591 Basenpaaren hergestellt, wohingegen, wenn ein bcl-x_L-Template verwendet wird, eine einzelne Bande von 780 Basenpaaren beobachtet wird. Es sind Molekulargewichtsmarker aus HaeIII-verdauten fX 174 angegeben (M). A. Die Spuren repräsentieren Produkte aus PCR-Reaktionen unter Verwendung eines bcl-x_S-Templates, eines bcl-x_L-Templates und unter Verwendung von RNA aus unstimulierten 7-Zellen des peripheren Bluts, aus für 6 Stunden mit PMA und Ionomycin stimulierten T-Zellen des peripheren Bluts, aus nicht getrennten humanen Thymozyten und aus adultem Gehirn. Die Identifikation der beobachteten Banden in den Gewebeproben als bcl-x_L und bcl-x_S wurde durch Klonierung und Teilsequenzierung von PCR-Produkten der revers transkribierten RNA aus jeder Gewebeprobe verifiziert. B. Eine Titrationskurve, um die Validität des PCR-Tests zum Quantifizieren der relativen Verhältnisse von bcl-x_L und bcl-x_S zu zeigen. Die Figur zeigt die Produkte der PCR-Reaktionen, die auf 1% Agarosegelen getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt wurden. Die PCR wurde unter Verwendung eines Verhältnisses von bcl-x_L zu bcl-x_S, das zwischen 0 : 10 bis 10 : 0 in Einheitsschritten variierte, durchgeführt. Die resultierenden Produkte spiegeln die relativen Verhältnisse von bcl-x_L- und bcl-x_S-Template, das zu dem Reaktionsgemisch zugefügt wurde, wieder.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

I. Die Erfindung

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt DNA-Abschnitte, gereinigte Polypeptide, Antikörper, Verfahren zum Klonieren und Verwenden rekombinanter Wirtszellen, die zum Erhalten und Verwenden von rekombinanten Apoptose-Polypeptiden notwendig sind, zur Verfügung. Folglich betrifft die vorliegende Erfindung allgemein Zusammensetzungen und Verfahren für die Herstellung und Verwendung der gewünschten Polypeptide, die nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) sind und die den programmierten Zelltod von Vertebraten fördern oder hemmen.

II. Polynukleotid

A. Isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, das Polypeptide kodiert, die nicht BCL-2 sind und die den programmierten Zelltod von Vertebraten fördern oder hemmen.

[0042] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid zur Verfügung, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Polynukleotid ein DNA-Molekül aus einer Vertebratenspezies. Ein bevorzugter Vertebrat ist ein Säuger. Ein bevorzugter Säuger ist ein Mensch. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung ein DNA-Molekül. Genauer gesagt, kodiert ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung Polypeptide, die als BCL-X_L (SEQ ID NR: 6), BCL-X_S (SEQ ID NR: 8) und BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) bezeichnet werden. Sogar mehr bevorzugt kodiert ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid, das die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NRN: 2, 4, 7 und 9 umfasst. Am meisten bevorzugt umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes und gereinigtes Polynukleotid die Nukleotidbasensequenzen der SEQ ID NRN: 1, 3, 6 und 8. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Polynukleotid bcl-x (SEQ ID NRN: 1 und 3).

[0043] Der Ausdruck „Polynukleotid", wie er hierin verwendet wird, meint eine Sequenz von Nukleotiden, die über Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Polynukleotide werden hierin in der Richtung von 5'- nach 3'-Richtung dargestellt. Ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung kann von circa 680 bis circa einige Hunderttausend Basenpaare umfassen. Vorzugsweise umfasst ein Polynukleotid von circa 680 bis circa 150.000 Basenpaare. Bevorzugte Längen von bestimmten Polynukleotiden sind hierin im Folgenden ausgeführt. Wie hierin verwendet werden Polynukleotide (z. B. Gene) durch die Verwendung von Kleinbuchstaben gekennzeichnet (z. B. bcl-2, bcl-x).

[0044] Ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung kann ein Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Molekül oder ein Ribonukleinsäure(RNA)-Molekül sein. Wo ein Polynukleotid ein DNA-Molekül ist, kann das Molekül ein Gen oder ein cDNA-Molekül sein. Nukleotidbasen werden hierin durch einen Einzelbuchstabencode angezeigt: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), Cytosin (C), Inosin (I) und Uracil (U).

[0045] Ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung kann unter Verwendung von Standardtechniken, die dem Fachmann gut bekannt sind, hergestellt werden. Die Herstellung eines cDNA-Moleküls, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert

oder hemmt, gemäß der vorliegenden Erfindung wird hierin in den Beispielen 1 und 3 beschrieben. Ein Polynukleotid kann auch aus genomischen DNA-Bibliotheken unter Verwendung von Lambdaphagentechnologien hergestellt werden.

[0046] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid zur Verfügung, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, wobei das Polynukleotid durch ein Verfahren herstellbar ist, das die Schritte umfasst Konstruieren einer Bibliothek von cDNA-Klonen aus einer Zelle, die das Polypeptid exprimiert; Screenen der Bibliothek mit einer markierten cDNA-Sonde, die aus RNA hergestellt wurde, die das Polypeptid kodiert; und Auswählen eines Klons, der mit der Sonde hybridisiert. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Polynukleotid durch das obige Verfahren hergestellt. Weiter bevorzugt kodiert das erfindungsgemäße Polynukleotid ein Polypeptid, das die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NRN: 6 und 8 hat. Noch weiter bevorzugt umfasst das Polynukleotid die Nukleotidsequenz von SEQ ID NRN: 1 und 3.

[0047] In einer anfänglichen Reihe von Experimenten verwendeten die Erfinder Niedrigstringenzhybridisierung mit einer murinen bcl-2-cDNA-Sonde, um bcl-2-verwandte Gene in lymphoiden Zellen des Huhns zu identifizieren. Einer der isolierten Klone, bcl-x, enthielt einen offenen Leserahmen, der 44% Aminosäureidentität mit humanem oder Maus-BCL-2 zeigte. Southern-Bloten ergab, dass BCL-X des Huhns von einem Gen kodiert wird, das von dem bcl-2 des Huhns verschieden ist. Huhn-bcl-x wurde nachfolgend verwendet, um zwei verschiedene cDNAs zu isolieren, die aus dem humanen bcl-x-Gen stammten. Diese zwei cDNAs unterschieden sich in ihren vorhergesagten offenen Leserahmen. Eine cDNA, bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), enthielt einen offenen Leserahmen mit 233 Aminosäuren (SEQ ID NR: 7) mit Domänen ähnlich denen, die zuvor für BCL-2 (SEQ ID NR: 5) beschrieben worden waren. Die andere cDNA, bcl-x_S (SEQ ID NR: 8), kodiert ein 170 Aminosäure großes Protein (SEQ ID NR: 9), in welchem der Bereich mit der höchsten Homologie zu BCL-2 (SEQ ID NR: 5) deletiert worden war. Dieser Unterschied in diesen zwei cDNAs ergibt sich aus der unterschiedlichen Verwendung von zwei 5'-Spleisssstellen innerhalb des ersten kodierenden Exons. Beim Vergleich der Fähigkeit dieser zwei Proteine, den apoptotischen Zelltod zu regulieren, wurde gefunden, dass BCL-X_L die Zellen resistent gegenüber dem apoptotischen Zelltod nach Wachstumsfaktordeprivierung machte, wohingegen BCL-X_S die Überexprimierung von bcl-2 beim Induzieren einer Resistenz gegen apoptotischen Zelltod verhindern konnte. Folglich scheint es, dass die Regulation von sowohl der Expression als auch dem Spleissen von bcl-x während der Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Empfänglichkeit der Zellen für programmierten Zelltod spielen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung haben die Erfinder gefunden, dass unreife Thymozyten, welche sich im Thymus in der Phase einer fortschreitenden Selektion befinden, einen hohen Spiegel an bcl-x_S Message exprimieren. Die Expression von bcl-x_S bedingt wahrscheinlich die Unfähigkeit von bcl-2, den Zelltod durch negative Selektion dieser Zellpopulation zu verhindern. Bcl-x_S kann als ein dominanter Regulator des Zelltods sogar in Gegenwart von hohen Niveaus an bcl-2-Expression fungieren. Zusätzlich haben die Erfinder gefunden, dass reife neuronale Strukturen die nur bcl-x_L-mRNA konstitutiv exprimieren. Folglich könnte BCL-X_L zur Resistenz gegenüber programmiertem Zelltod und zum Langzeitüberleben dieser wichtigen postmitotischen Zellpopulation beitragen. Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Studien, dass die zwei bcl-x-Genprodukte einen oder mehrere BCL-2-unabhängige Signalwege des apoptotischen Zelltods regulieren könnten.

[0048] Das bcl-x-Gen wurde während der Vertebratenevolution hoch konserviert und die bcl-x mRNA wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei die höchsten Spiegel an mRNA im lymphoiden System und im zentralen Nervensystem beobachtet werden. Die gegenwärtigen Erfinder haben zwei distinkte bcl-x-mRNA-Spezies aus humanen Geweben isoliert. Diese zwei cDNAs resultieren aus der alternativen Verwendung zweier distinkter 5'-Spleisssstellen, die innerhalb des ersten kodierenden Exons auf dem bcl-x-Gen gelegen sind. Die längere cDNA, bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), kodiert ein Protein (SEQ ID NR: 7), das anscheinend hinsichtlich Größe und vorhergesagter Struktur mit BCL-2 ähnlich ist. Die kürzere cDNA, bcl-x_S (SEQ ID NR: 8), enthält eine Deletion von 63 Aminosäuren (SEQ ID NR: 4) aus dem bcl-x_L (SEQ ID NR: 7) offenen Leserahmen, was den Bereich der höchsten Aminosäureidentität zwischen BCL-X_L (SEQ ID NR: 7) und BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) begründet.

B. Sonden und Primer.

[0049] In einem weiteren Aspekt erlaubt die DNA-Sequenzinformation, die durch die vorliegende Erfindung zur Verfügung gestellt wird, die Herstellung von relativ kurzen DNA- (oder RNA-) -Sequenzen mit der Fähigkeit, spezifisch mit Gensequenzen eines hierin offenbarten ausgewählten Polynukleotids zu hybridisieren. In diesen Aspekten werden Nukleinsäuresonden einer geeigneten Länge basierend auf der Berücksichtigung ausgewählter Nukleotidsequenzen der SEQ ID NRN: 1, 3, 6 und 8 hergestellt. Solche Nukleinsäuresonden hybridisieren spezifisch mit einem Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Am wichtigsten ist, dass die Sonden in einer Vielzahl von Tests zum Nachweisen des Vorhandenseins von komplementären Sequenzen

in einer gegebenen Probe verwendet werden können.

[0050] In bestimmten Ausführungsformen ist es vorteilhaft, Oligonukleotidprimer zu verwenden. Die Sequenz solcher Primer wurde unter Verwendung eines Polynukleotids der vorliegenden Erfindung zur Verwendung beim Nachweisen, Amplifizieren oder Mutieren eines definierten Abschnitts eines Gens oder Polynukleotids, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, unter Verwendung von PCR-Technologie entwickelt.

[0051] Um bestimmte Vorteile gemäß der vorliegenden Erfindung bereitzustellen, schließt eine bevorzugte Nukleinsäuresequenz, die für Hybridisierungsstudien oder -tests eingesetzt wird, Sondenmoleküle ein, die komplementär zu mindestens einem etwa 14 bis 70 langen Nukleotidstück eines Polynukleotids sind, das ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, so wie in SEQ ID NRN: 2, 4, 7 und 9 (**Fig.** 1 und 4A–4C) gezeigt. Eine Größe von mindestens 14 Nukleotiden in der Länge hilft sicherzustellen, dass das Fragment von ausreichender Länge ist, um ein Duplexmolekül zu bilden, das sowohl stabil als auch selektiv ist. Moleküle mit komplementären Sequenzen über Strecken von mehr als 14 Basen in der Länge sind allgemein bevorzugt, obwohl man bei der Entwicklung allgemein Nukleinsäuremoleküle mit Gen-komplementären Stücken von 25 bis 40 Nukleotiden, 55 bis 70 Nukleotiden, oder sogar, falls gewünscht, länger, vorziehen wird, um eine Erhöhung der Stabilität und Selektivität des Hybrids und dadurch eine Verbesserung der Qualität und des Ausmaßes der spezifischen Hybridmoleküle zu erhalten. Solche Fragmente können leicht zum Beispiel durch direktes Synthetisieren des Fragments durch chemische Mittel, durch Anwendung von Nukleinsäurereproduktionstechnologie, wie z. B. der PCR-Technologie des US-Patents 4,603,102, welches hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, oder durch Ausschneiden ausgewählter DNA-Fragmente aus rekombinanten Plasmiden, die passende Inserts und geeignete Restriktionsenzymschnittstellen enthalten, hergestellt werden.

[0052] In einem weiteren Aspekt erwägt die vorliegende Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, umfassend eine Basensequenz, die identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 14 aufeinander folgenden Basen ist, wobei das Polynukleotid mit dem gewünschten Polynukleotid hybridisiert, das ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Vorzugsweise umfasst das isolierte und gereinigte Polynukleotid eine Basensequenz, die identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 25 bis 70 aufeinander folgenden Basen der SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1) ist. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Polynukleotid einen Basenabschnitt umfassen, der identisch oder komplementär zu 40 oder 55 aufeinander folgende Basen der offenbarten Nukleotidsequenzen ist.

[0053] Folglich kann ein erfindungsgemäßes Polynukleotidsondenmolekül hinsichtlich seiner Fähigkeit, selektiv Duplexmoleküle mit komplementären Genstücken zu bilden, verwendet werden. In Abhängigkeit von der in Betracht gezogenen Anwendung wird man wünschen, verschiedene Hybridisierungsbedingungen anzuwenden, um unterschiedliche Grade der Selektivität der Sonde gegenüber der Zielsequenz zu erzielen. Für Anwendungen, die ein hohes Maß an Selektivität benötigen, wird man typischerweise wünschen, relativ stringente Bedingungen bei der Bildung von Hybriden anzuwenden. Zum Beispiel wird man relativ niedrige Salz- und/oder hohe Temperaturbedingungen wählen, wie z. B. bereitgestellt durch 0,02 M–0,15 M NaCl bei Temperaturen von 50°C bis 70°C. Jene Bedingungen sind besonders selektiv und tolerieren wenig, wenn überhaupt, Fehlpaarungen zwischen der Sonde und dem Template- oder Zielstrang.

[0054] Natürlich sind für manche Anwendungen, zum Beispiel dort, wo man wünscht, Mutanten unter Verwendung eines mutierten Primerstrangs, der an ein zugrunde liegendes Template hybridisiert ist, herzustellen, oder dort, wo man versucht, eine kodierende Sequenz aus anderen Zellen, funktionelle Äquivalente oder ähnliches für das gewünschte Polypeptid, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, zu isolieren, weniger stringente Hybridisierungsbedingungen typischerweise notwendig, um die Bildung der Heteroduplex zu erlauben. Unter diesen Umständen kann gewünscht werden, Bedingungen wie z. B. 0,15 M–0,9 M Salz bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 55°C einzusetzen. Kreuzhybridisierende Spezies können hierbei leicht als positiv hybridisierende Signale im Hinblick auf die Kontrollhybridisierungen identifiziert werden. Auf jeden Fall ist es allgemein anerkannt, dass die Bedingungen durch die Zugabe von steigenden Mengen von Formamid, welches der Destabilisierung von Hybridduplexen in der gleichen Weise dient wie steigende Temperatur, stringenter gemacht werden können. Folglich können die Hybridisierungsbedingungen leicht beeinflußt werden und sie werden folglich im Allgemeinen ein in Abhängigkeit von den gewünschten Ergebnissen ausgewähltes Verfahren sein.

[0055] In bestimmten Ausführungsformen ist es vorteilhaft, ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem passenden Marker zum Nachweis der Hybridbildung einzusetzen. Eine große Vielfalt solcher Marker sind im Stand der Technik bekannt, einschließlich radioaktiver, enzymatischer oder anderer Liganden, wie z. B. Avidin/Biotin, welche in der Lage sind, ein nachweisbares Signal zu erzeugen.

[0056] Allgemein stellt man sich vor, dass eine hierin beschriebene Hybridisierungssonde sowohl als ein Reagens in Lösungshybridisierung wie auch in Ausführungsformen, die eine feste Phase einsetzen, verwendbar ist. In Ausführungsformen, die eine feste Phase einbeziehen, ist die Test-DNA (oder -RNA) absorbiert oder an-

derweitig an einer ausgewählten Matrix oder Oberfläche befestigt. Diese befestigte Nukleinsäure wird dann einer spezifischen Hybridisierung mit ausgewählten Sonden unter den gewünschten Bedingungen unterzogen. Die ausgewählten Bedingungen hängen, wie im Stand der Technik gut bekannt, von besonderen Umständen und den benötigten Kriterien ab (z. B. vom G + C-Gehalt, dem Typ der Zielnukleinsäure, der Quelle der Nukleinsäure, der Größe der Hybridisierungssonde}. Nach dem Waschen der Matrix zum Entfernen nicht spezifisch gebundener Sondenmoleküle wird die spezifische Hybridisierung mittels des Markers nachgewiesen oder sogar quantifiziert.

III. Das gewünschte Polypeptid, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod fördert oder hemmt.

[0057] In einer Ausführungsform zieht die vorliegende Erfindung das gewünschte isolierte und gereinigte Polypeptid, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, in Betracht. Die SEQ ID NRN: 1 und 3, 6 und 8 führen Nukleotide und die SEQ ID NRN: 2, 4, 7 und 9 Aminosäuresequenzen aus den beispielhaften Vertebraten Huhn und Mensch aus. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid aus einer Vertebratenspezies. Ein bevorzugter Vertebrat ist ein Säuger. Ein bevorzugter Säuger ist ein Mensch. Vorzugsweise ist dieses Polypeptid ein rekombinantes Polypeptid. Genauer gesagt, ist das gewünschte Polypeptid der vorliegenden Erfindung, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Die Großbuchstaben (z. B. BCL-X, BCL-2) zeigen hierin Polypeptide (z. B. Produkte der Genexpression) an. Sogar weiter bevorzugt umfasst das gewünschte Polypeptid der vorliegenden Erfindung, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das die programmierten Zelltode von Vertebraten fördert oder hemmt, die Sequenzen der Aminosäurereste von SEQ ID NRN: 2, 4, 7 und 9.

[0058] Die Polypeptide sind hierin als Sequenzen der Aminosäurereste offenbart. Jene Sequenzen sind von links nach rechts in der Richtung vom Amino- zum Carboxy-Terminus geschrieben. Gemäß der Standardnomenklatur sind die Sequenzen der Aminosäurereste entweder durch einen Einzelbuchstaben- oder einen Dreibuchstabencode, wie unten angezeigt, bezeichnet.

Aminosäurerest	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

[0059] Modifikationen und Veränderungen können in der Struktur eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung vorgenommen werden und es kann noch ein Molekül mit ähnlichen Eigenschaften erhalten werden. Zum Beispiel können bestimmte Aminosäuren durch andere Aminosäuren in der Sequenz ohne einen nennenswerten Verlust der Rezeptoraktivität substituiert werden. Da es die interaktive Funktion und die Natur des Polypeptids ist, die die biologische funktionelle Aktivität des Polypeptids definiert, können bestimmte Aminosäuresequenz-Substitutionen in einer Polypeptidsequenz (oder natürlich ihrer zugrunde liegenden kodierenden DNA-Sequenz) vorgenommen werden und dennoch ein Polypeptid mit ähnlichen Eigenschaften erhalten werden.

[0060] Bei der Vornahme solcher Austausche kann der Hydropathie-Index von Aminosäuren berücksichtigt werden. Die Wichtigkeit des Hydropathie-Index der Aminosäuren bei Verleihung der interaktiven biologischen Funktion an ein Polypeptid wird in der Wissenschaft allgemein verstanden (Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105–132, 1982). Es ist bekannt, dass bestimmte Aminosäuren mit andere mit einem ähnlichen Hydropathie-Index oder -Wert ausgetauscht werden können und dies noch in einem Polypeptid mit ähnlicher biologischer Aktivität resultiert. Jeder Aminosäure wurde ein Hydropathie-Index auf Basis ihrer Hydrophobizität und Ladungseigenschaften zugeordnet. Diese Indizes sind: Isoleucin (+4,5); Valin (+4,2); Leucin (+3,8); Phenylalanin (+2,8); Cystein/Cystin (+2,5); Methionin (+1,9); Alanin (+1,8); Glycin (–0,4); Threonin (–0,7); Serin (–0,8); Tryptophan (– 0,9); Tyrosin (–1,3); Prolin (–1,6); Histidin (–3,2); Glutamat (–3,5); Glutamin (–3,5); Aspartat (–3,5); Asparagin (–3,5); Lysin (–3,9) und Arginin (–4,5).

[0061] Man geglaubt, dass der relative hydropathische Charakter der Aminosäure die Sekundärstruktur des resultierenden Polypeptids bestimmt, was wiederum die Wechselwirkung des Polypeptids mit anderen Molekülen, wie z. B. Enzymen, Substraten, Rezeptoren, Antikörpern, Antigenen und ähnlichen, bestimmt. Es ist im Stand der Technik bekannt, dass eine Aminosäure durch eine andere mit ähnlichem Hydropathie-Index ersetzt werden kann und dennoch ein funktionell äquivalentes Polypeptid erhalten wird. Bei solchen Veränderungen ist die Substitution von Aminosäuren, deren Hydropathie-Indizes innerhalb von ±2 liegen, bevorzugt, solche, die innerhalb ±1 liegen, sind besonders bevorzugt, und solche, die innerhalb ±0,5 sind liegen, sind sogar noch

mehr bevorzugt.

[0062] Substitutionen von ähnlichen Aminosäuren können auch auf Basis der Hydrophilie vorgenommen werden, insbesondere dort wo das biologische funktionelle äquivalente Polypeptid oder Peptid, das hierdurch erzeugt wird, zur Verwendung in immunologischen Ausführungen beabsichtigt ist. US-Patent 4,554,101, welches durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird, besagt, dass die größte lokale mittlere Hydrophilie eines Polypeptids, wie sie durch die Hydrophilie ihrer angrenzenden Aminosäuren bestimmt wird, mit seiner Immunogenität und Antigenität, d. h. mit einer biologischen Eigenschaft des Polypeptids, korreliert.

[0063] Wie in US-Patent 4,554,101 ausgeführt, wurden den Aminosäureresten die folgenden Hydrophilie-Werte zugeordnet: Arginin (+3,0); Lysin (+3,0); Aspartat (+3,0 ± 1); Glutamat (+3,0 ± 1); Serin (+0,3); Asparagin (+0,2); Glutamin (+0,2); Glycin (0); Prolin (–0,5 ± 1); Threonin (–0,4); Alanin (–0,5); Histidin (–0,5); Cystein (–1,0); Methionin (–1,3); Valin (–1,5); Leucin (–1,8); Isoleucin (–1,8); Tyrosin (–2,3); Phenylalanin (–2,5); Tryptophan (–3,4). Es wird verstanden, dass eine Aminosäure durch eine andere mit einem ähnlichen Hydrophilie-Wert ausgetauscht werden kann und dennoch ein biologisch äquivalentes, und insbesondere ein immunologisch äquivalentes Polypeptid erhalten wird. Bei solchen Veränderungen ist die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophilie-Werte innerhalb von ±2 liegen, bevorzugt, solche, die innerhalb von ±1 liegen, besonders bevorzugt und solche, die innerhalb von ±0,5 liegen, sind noch mehr bevorzugt.

[0064] Wie oben ausgeführt, basieren Aminosäuresubstitutionen im Allgemeinen daher auf der relativen Ähnlichkeit der Substituenten der Aminosäureseitenketten, zum Beispiel, hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, Hydrophilie, Ladung, Größe und ähnlichem. Beispielhafte Substitutionen, die verschiedene der vorgenannten Eigenschaften in die Überlegung einbeziehen, sind dem Fachmann gut bekannt und schließen ein: Arginin und Lysin; Glutamat und Aspartat; Serin und Threonin; Glutamin und Asparagin; und Valin, Leucin und Isoleucin (siehe Tabelle 1, unten). Die vorliegende Erfindung erwägt folglich funktionelle oder biologische Äquivalente des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten, wie oben ausgeführt, fördert oder hemmt.

TABELLE 1

Ursprünglicher Rest	Beispielhafte Substitutionen
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0065] Biologische oder funktionelle Äquivalente eines Polypeptids können auch unter Verwendung von ortspezifischer Mutagenese hergestellt werden. Ortspezifische Mutagenese ist eine Technik, die bei der Herstellung von Polypeptiden der zweiten Generationen oder biologisch funktionellen äquivalenten Polypeptiden oder Peptiden, die von ihren Sequenzen durch spezifische Mutagenese der zugrunde liegenden DNA abgeleitet sind, verwendbar ist. Wie oben festgestellt, können solche Veränderungen wünschenswert sein, wo Aminosäuresubstitutionen wünschenswert sind. Die Technik stellt weiter eine einsatzbereite Fähigkeit zum Herstellen und Testen von Sequenzvarianten, zum Beispiel durch Aufnahme einer oder mehrerer der vorgenannten Überlegungen, durch Aufnahme einer oder mehrerer Nukleotidsequenzveränderungen in die DNA, bereit. Die ortspezifische Mutagenese erlaubt die Herstellung von Mutanten durch Verwendung von sowohl spezifischen Oligonukleotidsequenzen, die die DNA-Sequenz der gewünschten Mutation kodieren, als auch einer ausreichenden Zahl angrenzender Nukleotide, um eine Primersequenz einer ausreichenden Größe und Sequenzkomplexität bereitzustellen, um eine stabile Duplex auf beiden Seiten des Deletionsverknüpfungspunktes, der zu überqueren ist, zu bilden. Typischerweise ist ein Primer von circa 17 bis 25 Nukleotiden Länge be-

vorzugt, mit circa 5 bis 10 Resten auf beiden Seiten des Verknüpfungspunktes der Sequenz, die zu verändern ist.

[0066] Im Allgemeinen ist die Technik der ortspezifischen Mutagenese im Stand der Technik gut bekannt, wie beispielhaft ausgeführt durch Adelman et al., (1983). Die Technik setzt typischerweise einen Phagenvektor ein, der sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger Form existieren kann, wie klar sein wird. Typische Vektoren zur Verwendung in ortspezifischer Mutagenese schließen Vektoren wie zum Beispiel den M13 Phagen (Messing et al., 1981) ein. Diese Phagen sind kommerziell erhältlich und ihre Verwendung ist dem Fachmann allgemein bekannt.

[0067] Im Allgemeinen wird die ortspezifische Mutagenese in Einklang hiermit durchgeführt durch zuerst Erhalten eines einzelsträngigen Vektors, der in seiner Sequenz eine DNA-Sequenz einschließt, die alle oder einen Teil der ausgewählten Polypeptidsequenz kodiert. Ein Oligonukleotidprimer, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt, wird, im Allgemeinen synthetisch, zum Beispiel durch das Verfahren von Crea et al., (1978), hergestellt. Dieser Primer wird dann an den einzelsträngigen Vektor annealt und durch Verwendung von Enzymen, wie zum Beispiel E. coli Polymerase I Klenow-Fragment, verlängert, um die Synthese des mutationstragenden Stranges zu vervollständigen. So wird eine Heteroduplex gebildet, wobei ein Strang die ursprüngliche, nicht mutierte Sequenz kodiert und der zweite Strang die gewünschte Mutation trägt. Dieser Heteroduplex-Vektor wird dann verwendet, um passende Zellen, wie zum Beispiel E. coli-Zellen, zu transformieren, und die Klone, die die rekombinanten Vektoren einschließen, die die Mutation tragen, werden selektiert. Kommerziell erhältliche Kits werden mit allen notwendigen Reagenzien geliefert, außer den Oligonukleotidprimern.

[0068] Das gewünschte erfindungsgemäße Polypeptid, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, ist nicht auf eine bestimmte Quelle begrenzt. Wie hierin ausgeführt, stellen die Techniken und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zum Beispiel die Identifikation und Isolierung solcher Peptide aus Tieren, die so unterschiedlich wie Mensch und Huhn sind, bereit. Folglich stellt die Erfindung den allgemeinen Nachweis und die Isolierung dieses Genus von Polypeptiden aus einer Vielzahl von Quellen bereit, wobei spezifisch drei Spezies dieses Genus identifiziert sind. Man glaubt, dass eine Reihe von Spezies der gleichen Familie von Polypeptiden dem Nachweis und der Isolierung unter Verwendung der Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindungen zugänglich sind.

[0069] Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung wird durch Standardtechniken, die dem Fachmann wohl bekannt sind, hergestellt. Solche Techniken schließen ein, ohne hierauf begrenzt zu sein, die Isolation und Reinigung von Geweben, von denen bekannt ist, dass sie das Polypeptid enthalten, und die Expression aus klonierter DNA, die solch ein Polypeptid kodiert, unter Verwendung von transformierten Zellen.

[0070] Polypeptide, die den programmierten Zelltod von Vertebraten oder die Apoptose beeinflussen oder verändern, werden in so gut wie allen Säugern, einschließlich dem Menschen, gefunden. Obwohl es wahrscheinlich ist, dass Variationen zwischen der Struktur und Funktion solcher Polypeptide in verschiedenen Spezies bestehen, liegt es, wo solch ein Unterschied besteht, im Bereich des Könnens des Fachmanns, im Lichte der vorliegenden Erfindung diese Unterschiede zu identifizieren. Folglich zieht die vorliegende Erfindung das gewünschte Polypeptid, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, aus jedem Vertebraten in Erwägung. Ein bevorzugter Säuger ist ein Mensch. Ein bevorzugter Vertebrat ist ein Säuger.

IV. Expressionsvektoren

[0071] In einer alternativen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen Expressionsvektor bereit, der ein Polynukleotid umfasst, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Genauer gesagt, umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das die Polypeptide BCL-X_L (SEQ ID NR: 6), BCL-X_S (SEQ ID NR: 8) oder BCL-X_1 (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NRN: 2, 4, 6, 7 und 9 umfasst. Weiter bevorzugt umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das die Nukleotidbasensequenz der SEQ ID NRN: 1, 3, 6 und 8 umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen Enhancer-Promotor geknüpft ist. Noch weiter bevorzugt umfasst ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen prokaryotischen Promotor geknüpft ist. Alternativ umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das funktionsfähig an einen Enhancer-Promotor geknüpft ist, der ein eukaryotischer Promotor ist und weiter ein Polyadenylierungssignal umfasst, das 3' von der Carboxy-terminalen Aminosäure und innerhalb der Transkriptionseinheit des kodierten Polypeptids positioniert ist.

[0072] Ein Promotor ist eine Region eines DNA-Moleküls, die typischerweise innerhalb von circa 100 Nukleotidpaaren vor (stromaufwärts) dem Punkt ist, an welchem die Transkription beginnt (d. h. einem Transkriptionsstartpunkt). Dieser Bereich enthält typischerweise verschiedene Typen von DNA-Sequenzelementen, die

in ähnlichen relativen Positionen in verschiedenen Genen lokalisiert sind. Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Promotor" ein, was im Stand der Technik als eine stromaufwärts gelegene Promotorregion, eine Promotorregion oder ein Promotor einer verallgemeinerten eukaryotischen RNA-Polymerase II-Transkriptionseinheit bezeichnet wird.

[0073] Ein weiterer Typ eines eigenständigen transkriptionsregulatorischen Sequenzelements ist ein Enhancer. Ein Enhancer stellt eine Spezifizität hinsichtlich Zeit, Ort und Expressionsniveau für eine bestimmte kodierende Region (z. B. Gen) zur Verfügung. Die Hauptfunktion eines Enhancers ist es, den Spiegel der Transkription einer kodierenden Sequenz in einer Zelle zu erhöhen, die einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren enthält, die an diesen Enhancer binden. Im Gegensatz zu einem Promotor kann ein Enhancer funktionieren, wenn er in verschiedenen Entfernungen vom Transkriptionsstart lokalisiert ist, solange ein Promotor vorhanden ist.

[0074] Der Ausdruck „Enhancer-Promotor", wie er hierin verwendet wird, bedeutet eine zusammengesetzte Einheit, die sowohl Enhancer- als auch Promotorelemente enthält. Ein Enhancer-Promotor ist funktionsfähig an eine kodierende Sequenz geknüpft, die für mindestens ein Genprodukt kodiert. Der Ausdruck „funktionsfähig verknüpft", wie er hierin verwendet wird, bedeutet, dass ein Enhancer-Promotor an eine kodierende Sequenz in einer solchen Weise verknüpft ist, dass die Transkription dieser kodierenden Sequenz durch diesen Enhancer-Promotor kontrolliert und reguliert wird. Mittel zur funktionsfähigen Verknüpfung eines Enhancer-Promotors an eine kodierende Sequenz sind im Stand der Technik gut bekannt. Es ist auch gut bekannt im Stand der Technik, dass die präzise Orientierung und Lage relativ zu einer kodierenden Sequenz, deren Transkription kontrolliert wird, unter anderem von der spezifischen Natur des Enhancer-Promotors abhängt. So ist ein TATA-Box-Minimalpromotor typischerweise circa 25 bis circa 30 Basenpaare stromaufwärts einer Transkriptionsstartstelle lokalisiert und ein stromaufwärts gelegenes Promotorelement typischerweise circa 100 bis circa 200 Basenpaare stromaufwärts einer Transkriptionsstartstelle lokalisiert. Im Gegensatz dazu kann ein Enhancer stromabwärts von der Startstelle lokalisiert sein und er kann in einer beträchtlichen Entfernung von dieser Stelle liegen.

[0075] Ein Enhancer-Promotor, der in einem Vektorkonstrukt der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann irgendein Enhancer-Promotor sein, der die Expression in einer Zelle, die transfiziert werden soll, steuert. Durch den Einsatz eines Enhancer-Promotors mit gut bekannten Eigenschaften können der Spiegel und die Eigenschaft der Genproduktexpression optimiert werden.

[0076] Eine kodierende Sequenz eines Expressionsvektors ist funktionsfähig an eine transkriptionsterminierende Region geknüpft. Die RNA-Polymerase transkribiert eine kodierende DNA-Sequenz durch eine Stelle, an der Polyadenylierung auftritt. Typischerweise dienen DNA-Sequenzen, die einige Hundert Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle lokalisiert sind, zur Termination der Transkription. Solche DNA-Sequenzen werden hierin als Transkriptionsterminationsregionen bezeichnet. Solche Regionen werden für eine wirksame Polyadenylierung der transkribierten Messenger-RNA (RNA) benötigt. Die transkriptionsterminierenden Regionen sind im Stand der Technik gut bekannt. Eine bevorzugte transkriptionsterminierende Region, die in einem Adenovirus-Vektorkonstrukt der vorliegenden Erfindung verwendet wird, umfasst ein Polyadenylierungssignal von SV40 oder dem Protamingen.

[0077] Ein Expressionsvektor umfasst ein Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Solch ein Polypeptid soll so verstanden werden, dass es eine Sequenz von Nukleotidbasen einschließt, die das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, die ausreichend in der Länge ist, um diesen Abschnitt von einem Polynukleotidabschnitt zu unterscheiden, der ein Polypeptid kodiert, das nicht den programmierten Zelltod von Vertebraten beeinflusst. Ein erfindungsgemäßes Polypeptid kann auch biologisch funktionelle Polypeptide oder Peptide kodieren, die abweichende Aminosäuresequenzen haben, wie zum Beispiel mit Veränderungen, die auf der Basis von Überlegungen wie zum Beispiel dem relativen Hydropathie-Wert der Aminosäuren, die ausgetauscht werden, ausgewählt wurden. Diese abweichenden Sequenzen sind jene, die aus natürlichen Quellen isoliert wurden oder in den Sequenzen induziert wurden, die hierin offenbart sind, wobei eine mutagene Verfahrensweise, wie zum Beispiel ortspezifische Mutagenese, verwendet wurde.

[0078] Genauer gesagt umfasst ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ein Polynukleotid, das ein Polypeptid kodiert, welches BCL-X_L (SEQ ID NR: 6), BCL-X_S (SEQ ID NR: 8), BCL-X_1 (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) oder die Sequenz der Aminosäurereste von SEQ ID NRN: 2, 4, 7 und 9 umfasst. Ein Expressionsvektor kann das gewünschte Polypeptid einschließen, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, welches selbst die Region kodiert oder es kann die kodierenden Regionen enthalten, die die ausgewählten Veränderungen oder Modifikationen in der kodierenden Ausgangssequenz dieses gewünschten Polypeptids tragen, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Alternativ können solche Vektoren oder Fragmente größere Polypeptide oder Polypeptide, die dennoch die kodierende Ausgangsregion einschließen, kodieren. Auf jeden Fall sollte man erkennen, sowohl aufgrund der Kodonredundanz als auch der biologischen funktionellen Äquivalenz, dass dieser Aspekt der Erfindung nicht auf bestimmte DNA-Moleküle, die den oben

erwähnten Polypeptidsequenzen entsprechen, beschränkt ist.

[0079] Beispielhafte Vektoren schließen die Säugerexpressionsvektoren der pCMV-Familie, einschließelich pCMV6b und pCMV6c (Chiron Corp., Emeryville, CA) ein. In bestimmten Fällen, und insbesondere in Fällen dieser individuellen Säugerexpressionsvektoren, können die resultierenden Konstrukte eine Kotransfektion mit einem Vektor erfordern, der einen selektierbaren Marker enthält, wie zum Beispiel pSV2neo. Mittels Kotransfektion in eine Dihydrofolatreduktasedefiziente Ovarien-Zelllinie aus chinesischem Hamster, zum Beispiel DG44, können Klone nachgewiesen werden, die Polypeptide aufgrund der in solche Expressionsvektoren aufgenommenen DNA exprimieren.

[0080] Ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung kann in einen Vektor durch eine Anzahl von Techniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, aufgenommen sein. Zum Beispiel wurden bcl-x (SEQ ID NRN: 1 und 3), bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) und bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) in pSFFV-Neo und pBluescript-Sk+ unter Verwendung von Standardtechniken aufgenommen (siehe nachfolgende Beispiele).

[0081] Ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung ist sowohl als ein Mittel zum Herstellen von Quantitäten der kodierenden DNA selbst als auch als ein Mittel zum Herstellen des kodierten Polypeptids einsetzbar. Es wird erwogen, dass dort, wo ein erfindungsgemäßes Polypeptid durch rekombinante Mittel hergestellt wird, man entweder prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren als Shuttle-Systeme einsetzen kann. Dennoch, da prokaryotische Systeme für gewöhnlich nicht zu einem korrekten Prozessieren von Vorstufenpolypeptiden in der Lage sind und insbesondere solche Systeme nicht zu einem korrektem Prozessieren von Membran-assoziierten eukaryotischen Polypeptiden in der Lage sind und da eukaryotische Polypeptide unter Verwendung der Lehre der offenbarten Erfindung erwartet werden, wird man solche Sequenzen wahrscheinlich in eukaryotischen Wirten exprimieren. Dennoch wird, sogar dort, wo der DNA-Abschnitt ein eukaryotisches Polypeptid kodiert, in Erwägung gezogen, dass prokaryotische Expression eine zusätzliche Anwendung finden kann. Daher kann die Erfindung in Kombination mit Vektoren, die zwischen den eukaryotischen und prokaryotischen Zellen wechseln können, verwendet können. Solche ein System ist hierin beschrieben, welches die Verwendung von bakteriellen Wirtszellen wie auch eukaryotischen Wirtszellen erlaubt.

[0082] Wo die Expression von rekombinanten Polypeptiden der vorliegenden Erfindung gewünscht wird und ein eukaryotischer Wirt in Erwägung gezogen wird, ist es höchst wünschenswert, einen Vektor, wie zum Beispiel ein Plasmid, einzusetzen, der einen eukaryotischen Replikationsursprung aufgenommen hat. Zusätzlich wünscht man sich für die Zwecke der Expression in eukaryotischen Systemen, das Polypeptid, das die Sequenz kodiert, in der Nähe und unter der Kontrolle eines wirksamen eukaryotischen Promotors, wie zum Beispiel Promotoren, die in Kombination mit chinesischen Hamsterovarienzellen verwendet werden, zu positionieren. Um eine kodierende Sequenz unter die Kontrolle eines Promotors zu bringen, egal ob er eukaryotisch oder prokaryotisch ist, wird im Allgemeinen benötigt, dass das 5'-Ende der Translationsstartstelle des richtigen translationalen Leserahmens des Polypeptids zwischen circa 1 und circa 50 Nukleotide 3' oder stromabwärts im Hinblick auf den gewählten Promotor positioniert wird. Weiterhin würde man dort, wo eukaryotische Expression erwartet wird, typischerweise wünschen eine geeignete Polyadenylierungsstelle in die Transkriptionseinheit, die das gewünschte Polypeptid einschließt, aufzunehmen.

[0083] Die pCMV-Plasmide sind eine Serie von Säugerexpressionsvektoren mit besonderer Eignung für die vorliegende Erfindung. Die Vektoren wurden zur Verwendung in im Wesentlichen allen kultivierten Zellen entwickelt und arbeiten extrem gut in SV40-transformierten Affen-COS-Zelllinien. Die Vektoren pCMV1, 2, 3 und 5 unterscheiden sich voneinander hinsichtlich bestimmter einmalig vorkommender Restriktionsstellen in der Polylinkerregion eines jeden Plasmids. Der Vektor pCMV4 unterscheidet sich von diesen 4 Plasmiden dadurch, dass er einen Translationsenhancer in der Sequenz vor dem Polylinker enthält. Während sie nicht direkt aus der Vektorserie pCMV1-5 stammen, sind die funktionell ähnlichen Vektoren pCMV6b und c von der Chiron Corp. aus Emeryville, CA, erhältlich und sie sind identisch, außer im Hinblick auf die Orientierung der Polylinkerregion, die in einem im Vergleich zu dem anderen umgedreht ist.

[0084] Die universellen Komponenten der pCMV-Plasmide sind wie folgt. Das Vektorrückgrat ist pTZ18R (Pharmacia) und enthält einen Bakteriophagen f1 Replikationsursprung zur Herstellung von einzelsträngiger DNA und ein Ampicillin-Resistenzgen. Die CMV-Region besteht aus den Nukleotiden –760 bis +3 der starken Promotor-regulatorischen Region des humanan Cytomegalovirus (Towne-Stamm) „Major Immediate Early Gene" (Thomsen et al., 1984; Boshart et al., 1985). Das humane Wachstumshormonfragment (hGH) enthält Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignale, welche die Sequenzen 1533 bis 2157 dieses Gens repräsentieren (Seeburg, 1982). Es gibt eine Alu mittelrepetitive DNA-Sequenz in diesem Fragment. Schließlich ist der SV40-Replikationsursprung und der „Early Region" Promotor-Enhancer abgeleitet aus dem pcD-X-Plasmid (HindII bis PstI Fragment), beschrieben in (Okayama et al., 1983). Der Promotor in diesem Fragment ist so orientiert, dass die Transkription von der CMV/hGH-Expressionscassette weggerichtet fortschreitet.

[0085] Die pCMV-Plasmide sind voneinander durch Unterschiede in der Polylinkerregion und durch die An- oder Abwesenheit des Translationsenhancers unterscheidbar. Das anfängliche pCMV1-Plasmid wurde fortlaufend modifiziert, um eine ansteigende Zahl einmalig vorkommender Restriktionsschnittstellen in der Polylinkerregion zu bilden. Um pCMV2 herzustellen, wurde eine von zwei EcoRI-Schnittstellen in pCMV1 zerstört. Um

pCMV3 herzustellen, wurde pCMV1 durch Deletieren eines kurzen Abschnitts aus der SV40-Region (StuI bis EcoRI) modifiziert, und dieses Vorgehen machte die PstI-, SalI- und BamHI-Schnittstellen in dem Polylinker einmalig. Um pCMV4 herzustellen, wurde zu einem synthetischen Fragment einer DNA, die der 5'-untranslatierten Region einer mRNA entsprach, die aus dem CMV-Promotor transkribiert war, C zugefügt. Die Sequenz wirkt als ein Translationsenhancer, indem die Anforderungen an Initiationsfaktoren bei der Polypeptidsynthese erniedrigt werden (Jobling et al., 1987; Browning et al., 1988). Um pCMV5 herzustellen, wurde ein DNA-Abschnitt (HpaI bis EcoRI) aus dem Bereich des SV40-Ursprungs von pCMV1 deletiert, um alle Schnittstellen in dem anfänglichen Polylinker einmalig zu machen.

[0086] Die pCMV-Vektoren wurden erfolgreich in Affen-COS-Zellen, Maus-L-Zellen, CHO-Zellen und He-La-Zellen exprimiert. In einigen Seite-an-Seite-Vergleichen ergaben sie 5- bis 10-fach höhere Expressionsspiegel in COS-Zellen als Vektoren auf SV40-Basis. Die pCMV-Vektoren wurden verwendet, um den LDL-Rezeptor, „Nuclear Factor" 1, Gs alpha Polypeptid, Polypeptidphosphatase, Synaptophysin, Synapsin, Insulinrezeptor, Influenza-Hämagglutinin, Androgenrezeptor, Sterol-26-Hydroxylase, Steroid-17- und -21-Hydroxylase, Cytochrome P-450 Oxidoreduktase, beta-adrenergen Rezeptor, Folatrezeptor, Cholesterinseitenkettenspaltenzym und eine Menge anderer cDNAs zu exprimieren. Es sollte bemerkt werden, dass der SV40-Promotor in diesen Plasmiden verwendet werden kann, um andere Gene, wie zum Beispiel dominante selektierbare Marker zu exprimieren. Schließlich gibt es eine ATG-Sequenz in dem Polylinker zwischen den HandIII- und PstI-Schnittstellen in pCMV, welche einen falschen Translationsstart verursachen kann. Dieses Kodon sollte nach Möglichkeit in Expressionsplasmiden vermieden werden. Eine Publikation, die die Konstruktion und Verwendung dieser Ausgangsvektoren pCMV1 und pCMV4 beschreibt, wurde veröffentlicht (Anderson et al., 1989b).

V. Transfizierte Zellen.

[0087] In einer noch weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung sowohl rekombinante Wirtszellen, die mit einem Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten hemmt oder fördert, transformiert oder transfiziert wurde, als auch transgene Zellen bereit, die von diesen transformierten oder transfizierten Zellen abgeleitet sind. Vorzugsweise ist eine rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung mit einem Polynukleotid enthaltend Sequenzen von SEQ ID NRN: 1, 3, 6 oder 8 transfiziert. Mittel zum Transformieren oder Transfizieren von Zellen mit exogenen Polynukleotiden, wie zum Beispiel DNA-Molekülen, sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen Techniken ein wie zum Beispiel Calciumphosphat- oder DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Liposomen-vermittelte Transfektion, direkte Mikroinjektion und Adenovirusinfektion (Sambrook Fritsch und Maniatis, 1989).

[0088] Das am weitesten verbreitete Verfahren ist die Transfektion, die entweder durch Calciumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelt wird. Obwohl der Mechanismus unklar bleibt, wird geglaubt, dass die transfizierte DNA in das Cytoplasma der Zelle durch Endozytose eindringt und in den Zellkern transportiert wird. In Abhängigkeit vom Zelltyp kann bis zu 90% einer Population von kultivierten Zellen zu jeder beliebigen Zeit transfiziert werden. Aufgrund seiner hohen Wirksamkeit ist die Transfektion, die durch Calciumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelt wird, das Verfahren der Wahl für Studien, die eine transiente Expression einer fremden DNA in einer großen Zahl von Zellen erfordert. Die Calciumphosphatvermittelte Transfektion wird auch verwendet, um Zelllinien zu etablieren, die Kopien der fremden DNA integrieren, die für gewöhnlich in Kopf-zu-Schwanz-Tandemmuster in das Wirtszellgenom angeordnet wird.

[0089] In dem Protoplasten-Fusionsverfahren werden Protoplasten, die von Bakterien abgeleitet sind, die eine hohe Kopienzahl des Plasmids von Interesse tragen, direkt mit den kultivierten Säugerzellen gemischt. Nach Fusion der Zellmembranen (gewöhnlich mit Polyethylenglycol) wird der Inhalt der Bakterien in das Cytoplasma der Säugerzellen abgegeben und die Plasmid-DNA wird in den Kern transportiert. Die Protoplastenfusion ist für viele Zelllinien, die gewöhnlich für transiente Expressionstest verwendet werden, nicht so wirksam wie die Transfektion, aber sie ist nützlich für Zelllinien, in denen die Endocytose der DNA ineffizient auftritt. Die Protoplastenfusion ergibt häufig eine Vielzahl an Kopien der Plasmid-DNA, die als Tandem in das Wirtschromosom integriert werden.

[0090] Die Anwendung von kurzen, elektrischen Hochspannungsimpulsen bei einer Vielzahl von Säuger- und Pflanzenzellen führt zur Bildung von Nanometergroßen Poren in der Plasmamembran. Die DNA wird direkt in das Zellcytoplasma entweder durch diese Poren oder als Folge der Neuverteilung von Membrankomponenten, die das Schließen der Poren begleitet, aufgenommen. Die Elektroporation kann extrem wirksam sein und kann sowohl für die transiente Expression von klonierten Genen als auch zur Etablierung von Zelllinien verwendet werden, die integrierte Kopien des Gens von Interesse tragen. Elektroporation führt im Gegensatz zur Calciumphosphat-vermittelten Transfektion und Protoplastenfusion häufig zur Bildung von Zelllinien, die ein oder höchstens wenige integrierte Kopien der fremden DNA tragen.

[0091] Die Liposomentransfektion bezieht die Einkapselung von DNA und RNA in Liposomen ein, gefolgt von einer Fusion der Liposomen mit der Zellmembran. Der Mechanismus, wie die DNA in die Zelle abgegeben wird,

ist unklar, aber die Transfektionsraten können bis zu 90% betragen.

[0092] Die direkte Mikroinjektion eines DNA-Moleküls in den Kern hat den Vorteil, dass die DNA zellulären Kompartimente, wie zum Beispiel Endosomen mit niedrigem pH, nicht ausgesetzt wird. Die Mikroinjektion wird daher hauptsächlich als das Verfahren zum Etablieren von Zelllinien verwendet, die integrierte Kopien der DNA von Interesse tragen.

[0093] Die Verwendung von Adenovirus als einem Vektor zur Zelltransfektion ist im Stand der Technik gut bekannt. Adenovirusvektor-vermittelte Zelltransfektion wurde für eine Vielzahl von Zellen berichtet (Stratford-Perricaudet et al., 1992).

[0094] Eine transfizierte Zelle kann prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen eukaryotische Wirtszellen. Eine bevorzugte erfindungsgemäße rekombinante Wirtszelle ist eine murine FL5.12-Zelle. Wo es von Interesse ist, das gewünschte humane Polypeptid, das nicht BLC-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, herzustellen, sind kultivierte Säuger- oder humane Zellen von besonderem Interesse.

[0095] In einem anderen Aspekt ist die rekombinante Wirtszelle der vorliegenden Erfindung eine prokaryotische Wirtszelle. Vorzugsweise ist eine rekombinante Wirtszelle eine bakterielle Zelle eines Stammes von Escherichia coli. Im Allgemeinen werden Prokaryoten für ein anfängliches Klonieren der DNA-Sequenzen und das Konstruieren der Vektoren, die in der Erfindung verwendbar sind, bevorzugt. Zum Beispiel können die E. coli K12-Stämme besonders nützlich sein. Andere mikrobielle Stämme, die verwendet werden können, schließen ein E. coli B und E. coli X1776 (ATCC Nr. 31537). Diese Beispiele sind natürlich nur zur Erläuterung und nicht zur Begrenzung beabsichtigt.

[0096] Prokaryoten können auch zur Expression verwendet werden. Die zuvor genannten Stämme wie auch E. coli W3110 (F-, Lambda-, prototroph, ATCC Nr. 273325), Bazillen, wie z. B. Bacillus subtilis oder andere Enterobacteriaceae, wie z. B. Salmonella typhimurium oder Serratus marcesans und verschiedene Pseudomonas-Spezies können verwendet werden.

[0097] Im Allgemeinen werden Plasmidvektoren enthaltend die Replicon- und Kontrollsequenzen, die aus Spezies abgeleitet sind, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, in Verbindung mit diesen Wirten verwendet. Der Vektor trägt für gewöhnlich sowohl eine Replikationsstelle als auch markierende Sequenzen, die in der Lage sind, eine phänotypische Selektion in den transformierten Zellen zur Verfügung zu stellen. Zum Beispiel kann E. coli unter Verwendung von pBR322 transformiert werden, einem Plasmid, das aus einer E. coli-Spezies abgeleitet ist (Bolivar et al., 1977). pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und stellt somit ein einfaches Mittel zum Identifizieren transformierter Zellen zur Verfügung. Das pBR-Plasmid oder andere mikrobielle Plasmide oder Phagen müssen auch Promotoren, die von dem mikrobiellen Organismus zur Expression seiner eigenen Polypeptide verwendet werden können, enthalten oder modifiziert werden, um sie zu enthalten.

[0098] Solche Promotoren, die am häufigsten bei rekombinanter DNA-Konstruktion verwendet werden, schließen ein die β-Lactamase-(Penicillinase)- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979; Goeddel et al., 1980) und ein Tryptophan-(TRP)-Promotorsystem (EPA Anm. Veröffentl. Nr. 0036776; Siebwenlist, et al., 1980). Während diese die am häufigsten Verwendeten sind, wurden andere mikrobielle Promotoren entdeckt und verwendet und die Details, die ihre Nukleotidsequenzen betreffen, wurden veröffentlicht, wodurch ein Fachmann in die Lage versetzt wird, funktionelle Promotoren in Plasmidvektoren einzuführen (Siebwenlist et al., 1980).

[0099] Zusätzlich zu Prokaryoten können auch eukaryotische Mikroben wie zum Beispiel Hefe verwendet werden. Saccharomyces cerevisiae oder die gemeine Bäckerhefe ist der am häufigsten verwendete eukaryotischen Mikroorganismen, obwohl auch eine Anzahl anderer Stämme allgemein erhältlich ist. Zur Expression in Saccharomyces wird zum Beispiel im Allgemeinen das Plasmid YRp7 verwendet (Stinchcomb et al., 1979; Kingsman et al., 1979; Tschemper et al., 1980). Dieses Plasmid enthält bereits das trpl-Gen, das einen Selektionsmarker für einen mutierten Stamm der Hefe bereitstellt, dem die Fähigkeit fehlt, in Tryptophan zu wachsen, zum Beispiel ATCC NR. 44076 oder PEP4-1 (Jones, 1977). Die Gegenwart der trpl-Läsion als Eigenschaft des Hefe-Wirtszellgenoms stellt dann eine wirksame Umgebung zum Nachweisen der Transformation durch Wachsen in Abwesenheit von Tryptophan dar.

[0100] Geeignete Promotorsequenzen in Hefevektoren schließen ein die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., 1980) oder anderer glycolytischer Enzyme (Hess et al., 1968; Holland et al., 1978), wie zum Beispiel Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase. Beim Konstruieren geeigneter Expressionsplasmide werden auch Terminationssequenzen, die mit diesen Genen verbunden sind, in den Expressionsvektor stromabwärts von den Sequenzen, die exprimiert werden sollen, eingefügt, um Polyadenylierung der mRNA und Termination bereitzustellen. Andere Promotoren, die den zusätzlichen Vorteil einer durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription haben, sind die Promotorregion für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, und

die zuvor genannte Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für die Verwendung von Maltose und Galactose verantwortlich sind. Jeder Plasmidvektor, der einen hefekompatiblen Promotor, Replikationsursprung und Terminationssequenzen enthält, ist geeignet.

[0101] Zusätzlich zu Mikroorganismen können auch Zellkulturen als Wirt verwendet werden, die aus multizellulären Organismen stammen. Im Prinzip funktioniert eine jede solche Zellkultur, egal ob aus Vertebraten- oder Evertebratenkultur. Dennoch war das Interesse an Vertebratenzellen am größten und die Vermehrung von Vertebratenzellen in Kultur (Gewebekultur) ist eine Routineverfahrensweise in den letzten Jahren geworden (Kruse und Peterson, 1973). Beispiele solcher verwendbarer Wirtszelllinien sind AtT-20-, VERO- und HeLa-Zellen, Chinesische-Hamster-Ovarien-(CHO)-Zelllinien und W138-, BHK-, COSM6-, COS-7-, 293- und MDCK-Zelllinien. Die Expressionsvektoren für solche Zellen schließen für gewöhnlich (falls nötig) einen Replikationsursprung, einen stromaufwärts des zu exprimierenden Gens gelegenen Promotor zusammen mit allen notwendigen Ribosomen-Bindungsstellen, RNA-Spleissstellen, Polyadenylierungsstellen und Transkriptionsterminatorsequenzen ein.

[0102] Zur Verwendung in Säugerzellen stammen die Kontrollfunktionen auf Expressionsvektoren häufig aus viralem Material. Zum Beispiel stammen die häufig verwendeten Promotoren aus Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus und am häufigsten aus Simian Virus 40 (SV 40). Die frühen und späten Promotoren des SV40-Virus sind besonders geeignet, da beide einfach aus dem Virus als ein Fragment erhalten werden, das auch den viralen SV40-Replikationsursprung enthält (Fiers, et al. 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können auch verwendet werden, vorausgesetzt, dass die ungefähr 250 bp Sequenz, die von der HindIII-Schnittstelle bis zur BglI-Schnittstelle reicht, die im viralen Replikationsursprung sitzt, eingeschlossen ist. Darüber hinaus ist es auch möglich und oft wünschenswert, Promotor- oder Kontrollsequenzen zu verwenden, die normalerweise mit der gewünschten Gensequenz assoziiert sind, vorausgesetzt, dass solche Kontrollsequenzen mit den Wirtszellsystemen kompatibel sind.

[0103] Ein Replikationsursprung kann durch Konstruktion des Vektors bereitgestellt werden, um einen exogenen Ursprung einzuschließen, wie der, der aus SV40 oder anderen viralen (z. B. Polyoma, Adeno, VSV, BPV, CMV) Quellen stammt, oder er kann durch den chromosomalen Replikationsmechanismus der Wirtszelle zur Verfügung gestellt werden. Wenn der Vektor in das Wirtszellchromosom integriert ist, ist das Letztere oft ausreichend.

VI. Herstellen von gewünschten rekombinanten Polypeptiden, die nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) sind und die den programmierten Zelltod von Vertebraten beeinflussen

[0104] In noch einer anderen Ausführungsform erwägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten beeinflusst, welches umfasst Transfizieren von Zellen mit einem Polynukleotid, das dieses Polypeptid kodiert, um eine transformierte Wirtszelle herzustellen; und Halten der transformierten Wirtszelle unter biologischen Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids ausreichen. Vorzugsweise ist die transformierte Wirtszelle eine eukaryotische Zelle. Alternativ ist die Wirtszelle eine prokaryotische Zelle. Bevorzugte prokaryotische Zellen sind Bakterienzellen des DH5α-Stamms von Escherichia coli. Sogar mehr bevorzugt umfasst das in die transformierten Zellen transfizierte Polynukleotid die Nukleotidbasensequenz von SEQ ID NRN: 1 und 3 (**Fig.** 1). Am meisten bevorzugt wird die Transfektion unter Verwendung eines hierin zuvor offenbarten Expressionsvektors ausgeführt.

[0105] Eine in diesem Verfahren verwendete Wirtszelle ist in der Lage, ein funktionelles Polypeptid der vorliegenden Erfindung zu exprimieren. Eine bevorzugte Wirtszelle ist eine Ovarienzelle aus dem chinesischen Hamster. Allerdings ist eine Vielzahl von Zellen einem erfindungsgemäßen Verfahren zugänglich, zum Beispiel Hefezellen, humane Zelllinien und andere eukaryotische Zelllinien, die dem Fachmann gut bekannt sind.

[0106] Nach der Transfektion wird die Zelle unter Kulturbedingungen für eine ausreichende Zeitdauer zur Expression des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, gehalten. Kulturbedingungen sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen ionische Zusammensetzung und Konzentration, Temperatur, pH und ähnliche ein. Typischerweise werden transfizierte Zellen unter Kulturbedingungen in einem Kulturmedium gehalten. Geeignete Medien für verschiedene Zelltypen sind im Stand der Technik gut bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Temperatur zwischen ungefähr 20°C und 50°C, weiter bevorzugt zwischen ungefähr 30°C und ungefähr 40°C, und sogar noch mehr bevorzugt ungefähr 37°C.

[0107] Der pH ist vorzugsweise etwa zwischen einem Wert von 6,0 bis einem Wert von etwa 8,0, mehr bevorzugt von einem Wert von ungefähr 6,8 bis einem Wert von ungefähr 7,8 und am meisten bevorzugt ungefähr 7,4. Die Osmolalität ist vorzugsweise zwischen ungefähr 200 Milliosmol pro Liter (mosm/L) bis ungefähr 400 mosm/L und mehr bevorzugt von ungefähr 290 mosm/L bis ungefähr 310 mosm/L. Andere biologische Bedingungen, die für Transfektion und Expression eines kodierten Proteins benötigt werden, sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0108] Transfizierte Zellen werden für eine ausreichende Zeitdauer zur Expression eines Polypeptids, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, gehalten. Eine geeignete Zeit hängt unter anderem vom verwendeten Zelltyp ab und kann von einem Fachmann einfach bestimmt werden. Tyischerweise beträgt die Dauer der Haltung von ungefähr 2 bis ungefähr 14 Tagen.
[0109] Das rekombinante Polypeptid wird entweder aus den transfizierten Zellen oder dem Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, gewonnen oder gesammelt. Die Gewinnung umfasst Isolieren und Reinigen des Polypeptids. Isolations- und Reinigungstechniken für Polypeptide sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen solche Verfahrensschritte wie Präzipitation, Filtration, Chromatographie, Elektrophorese und ähnliche ein.

VII. Antikörper

[0110] In einer noch weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen mit einem Polypeptid der vorliegenden Erfindung immunreaktiven Antikörper bereit. Vorzugsweise ist ein erfindungsgemäßer Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Mittel zum Herstellen und Charakterisieren von Antikörpern sind im Stand der Technik gut bekannt (siehe z. B. Antibodies „A Laboratory Manual, E. Howell und D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
[0111] Kurz zusammengefasst wird ein polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Tieres mit einem Immunogen, das ein Polypeptid oder Polynukleotid der vorliegenden Erfindung umfasst, und durch Sammeln der Antiseren aus diesem immunisierten Tier hergestellt. Eine große Vielzahl von Tierspezies kann für die Herstellung von Antiseren verwendet werden. Typischerweise ist ein Tier, das für die Herstellung von Anti-Antiseren verwendet wird, ein Kaninchen, eine Maus, eine Ratte, ein Hamster oder ein Meerschweinchen. Wegen des relativ großen Blutvolumens von Kaninchen ist ein Kaninchen eine bevorzugte Wahl für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern.
[0112] Wie im Stand der Technik gut bekannt, kann ein gegebenes Polypeptid oder Polynukleotid in seiner Immunogenität variieren. Es ist daher häufig notwendig, das Immunogen (z. B. ein Polypeptid oder Polynukleotid) der vorliegenden Erfindung mit einem Träger zu koppeln. Beispielhafte und bevorzugte Träger sind Keyhole-Limpet-Hämozyanin (KLH) und bovines Serumalbumin (BSA). Andere Albumine, wie zum Beispiel Ovalbumin, Mausserumalbumin oder Kaninchenserumalbumin, können auch als Träger verwendet werden.
[0113] Mittel zum Konjugieren eines Polypeptids oder eines Polynukleotids an ein Trägerprotein sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen Glutaraldehyd, m-Maleimidobencoyl-N-Hydroxysuccinimidester, Carbodiimid und bisbiazotisiertes Benzidin ein.
[0114] Wie im Stand der Technik gut bekannt, kann die Immunogenität gegen ein bestimmtes Immunogen durch die Verwendung nicht-spezifischer Stimulatoren der Immunantwort, die als Adjuvantien bekannt sind, gesteigert werden. Beispielhafte und bevorzugte Adjuvantien schließen ein komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplette Freundsche Adjuvantien und Aluminiumhydroxid-Adjuvans.
[0115] Die Menge an Immunogen, die zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet wird, variiert unter anderem in Abhängigkeit von der Natur des Immunogens wie auch dem zur Immunisierung verwendeten Tier. Eine Vielzahl von Wegen kann zur Verabreichung des Immunogens verwendet werden (subkutan, intramuskulär, intradermal, intravenös und intraperitoneal). Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern wird durch Entnahme von Blut als Proben des immunisierten Tiers zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung beobachtet. Wenn ein gewünschtes Niveau an Immunisierung erhalten wurde, kann das immunisierte Tier ausgeblutet werden und das Serum isoliert und gelagert werden.
[0116] Insbesondere schließt die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zum Herstellen eines immunreaktiven Antikörpers mit einem Polypeptid ein, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, welches die Schritte umfasst (a) Transfizieren von rekombinanten Wirtszellen mit einem Polynukleotid, das dieses Polypeptid kodiert; (b) Kultivieren der Wirtszellen unter Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids ausreichen; (c) Gewinnen des Polypeptids; und (d) Herstellen von Antikörpern gegen das Polypeptid. Sogar weiter bevorzugt sind Antikörper offenbart, die nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt wurden.
[0117] Ein monoklonaler Antikörper der vorliegenden Erfindung kann einfach durch die Verwendung von gut bekannten Techniken hergestellt werden, wie jene, die in US-Pat. Nr. 4,196,265, was hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, beispielhaft erläutert sind. Typischerweise bezieht eine Technik zuerst das Immunisieren eines geeigneten Tiers mit einem ausgewählten Antigen (z. B. einem Polypeptid oder Polynukleotid der vorliegenden Erfindung) in einer Weise ein, die ausreicht, um eine Immunantwort bereitzustellen. Nager, wie zum Beispiel Mäuse und Ratten, sind bevorzugte Tiere. Milzzellen aus dem immunisierten Tier werden dann mit Zellen einer immortalisierten Myelomzelle fusioniert. Wenn das immunisierte Tier eine Maus ist, ist die bevorzugte Myelomzelle eine murine NS-1-Myelomzelle.
[0118] Die fusionierten Milz/Myelomzellen werden in einem selektiven Medium kultiviert, um die fusionierten Milz/Myelomzellen von den Parental-Zellen zu selektionieren. Die fusionierten Zellen werden aus dem Ge-

misch von nicht fusionierten Parental-Zellen, zum Beispiel durch Zugabe von Agenzien, die die de-novo-Synthese von Nukleotiden im Gewebekulturmedium blockieren, getrennt. Beispielhafte und bevorzugte Agenzien sind Aminopterin, Methotrexat und Azaserin. Aminopterin und Methotrexat blockieren die de-novo-Synthese von sowohl Purinen als auch Pyrimidinen, wohingegen Azaserin nur die Purinsynthese blockiert. Wenn Aminopterin oder Methotrexat verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin als Nukleotidquelle supplementiert. Wenn Azaserin verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin supplementiert.

[0119] Diese Kultivierung stellt eine Population von Hybridomen bereit, aus welchen spezifische Hybridome ausgewählt werden. Typischerweise wird die Selektion der Hybridome durch Kultivieren der Zellen durch Einzelklonverdünnung in Mikrotiterplatten, gefolgt von einem Testen der einzelnen klonalen Überstände auf Reaktivität mit einem Antigen-Polypeptid durchgeführt. Die selektierten Klone können dann zur Bereitzustellung des monoklonalen Antikörpers unbegrenzt vermehrt werden.

[0120] In einem spezifischen Beispiel zur Herstellung eines Antikörpers der vorliegenden Erfindung wird Mäusen intraperitoneal zwischen ungefähr 1–200 µg eines Antigens injiziert, das ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung umfasst. Zellen von B-Lymphozyten werden durch Injektion des Antigens in Verbindung mit einem Adjuvans wie zum Beispiel komplettes Freundsches Adjuvans (einem nicht-spezifischen Stimulator der Immunantwort enthaltend abgetötete Mycobacterium tuberculosis) zum Wachstum stimuliert. Einige Zeit (z. B. mindestens zwei Wochen) nach der ersten Injektion werden die Mäuse durch Injektion mit einer zweiten Dosis des Antigens, gemischt mit dem inkompletten Freundschen Adjuvans, geboostet.

[0121] Einige Wochen nach der zweiten Injektion wird den Mäusen am Schwanz Blut entnommen und die Seren werden durch Immunpräzipitation mit radioaktiv markiertem Antigen titriert. Vorzugsweise wird das Verfahren des Boostens und Titrierens wiederholt, bis ein geeigneter Titer erreicht wird. Die Milz der Mäuse mit dem höchsten Titer wird entfernt und die Milzlymphozyten durch Homogenisieren der Milz mit einer Spritze erhalten. Typischerweise enthält eine Milz aus einer immunisierten Maus ungefähr 5×10^7 bis 2×10^8 Lymphozyten.

[0122] Mutierte Lymphozytenzellen, die als Myelomzellen bekannt sind, werden aus Versuchstieren erhalten, in welche Zellen eingeführt wurden, um durch eine Vielzahl bekannter Verfahren zu wachsen. Myelomzellen fehlt der Ausweich-Stoffwechselweg („Salvage Pathway") der Nukleotidbiosynthese. Da Myelomzellen Tumorzellen sind, können sie in Gewebekultur unbegrenzt vermehrt werden und sie werden daher als unsterblich bezeichnet. Eine Vielzahl von kultivierten Zelllinien von Myelomzellen aus Mäusen und Ratten, wie zum Beispiel murine NS-1-Myelomzellen, wurden etabliert.

[0123] Myelomzellen werden unter Bedingungen kombiniert, die eine Förderung der Fusion mit normalen Antikörper-produzierenden Zellen aus der Milz von der Maus oder Ratte, der das Antigen/Polypeptid der vorliegenden Erfindung injiziert wurde, zugelassen. Die Fusionsbedingungen schließen zum Beispiel die Gegenwart von Polyethylenglycol ein. Die resultierenden fusionierten Zellen sind Hybridomzellen. Wie Myelomzellen wachsen Hybridomzellen unbegrenzt in Kultur.

[0124] Die Hybridomzellen werden von unfusionierten Myelomzellen durch Kultivieren in einem Selektionsmedium, wie zum Beispiel einem HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) getrennt. Unfusionierten Myelomzellen fehlen die Enzyme, die zur Synthese von Nukleotiden aus dem Ausweich-Stoffwechselweg notwendig sind, da sie in Gegenwart von Aminopterin, Methotrexat oder Azaserin abgetötet werden. Unfusionierte Lymphozyten fahren auch nicht fort, in Gewebekultur zu wachsen. Daher können nur Zellen, die erfolgreich fusioniert wurden (Hybridomzellen), in dem Selektionsmedium wachsen.

[0125] Jede der überlebenden Hybridomzellen produziert einen einzelnen Antikörper. Diese Zellen werden dann auf die Herstellung des spezifischen Antikörpers, der mit einem Antigen/Polypeptid der vorliegenden Erfindung immunreaktiv ist, gescreent. Einzelzellhybridome werden durch begrenzende Verdünnungen der Hybridome isoliert. Die Hybridome werden viele Male in Verdünnungsreihen verdünnt und, nachdem den Verdünnungen erlaubt wurde zu wachsen, die Überstände auf die Gegenwart des monoklonalen Antikörpers getestet. Die Klone, die diesen Antikörper herstellen, werden dann in großen Mengen kultiviert, um einen Antikörper der vorliegenden Erfindung in zweckmäßigen Mengen herzustellen.

[0126] Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße spezifische Polypeptide und Polynukleotide als Antigene erkannt und somit identifiziert werden. Nach Identifizierung können diese Polypeptide und Polynukleotide durch Techniken wie zum Beispiel Antikörper Affinitätschromatografie isoliert und gereinigt werden. In der Antikörper-Affinitätschromatografie wird ein monoklonaler Antikörper an ein Festphasensubstrat gebunden und einer Lösung ausgesetzt, die das gewünschte Antigen enthält. Das Antigen wird aus der Lösung durch immunspezifische Reaktion mit dem gebundenen Antikörper entfernt. Das Polypeptid oder Polynukleotid wird dann einfach aus dem Substrat entfernt und gereinigt.

VIII. Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0127] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die ein Polypeptid oder Polynukleotid der vorliegenden Erfindung und einen physiologisch

geeigneten Träger umfassen. Genauer gesagt umfasst eine pharmazeutische Zusammensetzung das Polypeptid BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) oder ein Polynukleotid, das diese Polypeptide kodiert.

[0128] Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird typischerweise parenteral in Dosiseinheitsformulierungen enthaltend nach Wunsch gut bekannte, nicht-toxische, physiologisch geeignete Standardträger, -adjuvanzien und -vehikel verabreicht. Der Ausdruck parenteral, wie er hierin verwendet wird, schließt intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle Injektions- oder Infusionstechniken ein.

[0129] Injizierbare Zubereitungen, zum Beispiel sterile injizierbare wässerige oder fettige Suspensionen, sind gemäß dem Stand der Technik unter Verwendung geeigneter Dispersions- oder Feuchthaltemittel und Suspensionsmittel formuliert. Die sterile injizierbare Zubereitung kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem nicht-toxischen, parenteral geeigneten Verdünner oder Lösungsmittel sein, zum Beispiel als eine Lösung in 1,3-Butandiol.

[0130] Unter den geeigneten Trägern und Lösungsmitteln, die eingesetzt werden können, befinden sich Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Zusätzlich werden für gewöhnlich sterile Fettöle als ein Lösungsmittel oder Suspensionsmedium eingesetzt. Zu diesem Zweck kann jedes farblose Fettöl eingesetzt werden, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride. Zusätzlich finden Fettsäuren wie zum Beispiel Ölsäure bei der Herstellung von Injektionen Verwendung.

[0131] Bevorzugte Träger schließen neutrale saline Lösungen, die mit Phosphat, Laktat, Tris und ähnlichen gepuffert sind, ein. Natürlich reinigt man den Vektor ausreichend auf, um ihn im Wesentlichen frei von unerwünschten Kontaminanten, wie z. B. unbrauchbaren, störenden Adenoviruspartikeln oder Endotoxinen oder anderen Pyrogenen, zu machen, sodass keine unpassenden Reaktion bei dem Individuum verursacht werden, welches das Vektorkonstrukt erhält. Ein bevorzugtes Mittel zum Reinigen des Vektors bezieht die Verwendung von Schwebe-Dichte-Gradienten, wie zum Beispiel Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation, ein.

[0132] Ein Träger kann auch ein Liposom sein. Mittel zur Verwendung von Liposomen als Verabreichungsträger sind im Stand der Technik gut bekannt [siehe z. B. Gabizon et al., 1990; Ferruti et al., 1986; und Ranade, V. V., 1989].

[0133] Eine transfizierte Zelle kann ebenfalls als Träger dienen. Beispielsweise kann eine Leberzelle aus einem Organismus entfernt, mit einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung unter Verwendung der oben ausgeführten Verfahren transfiziert und dann die transfizierte Zelle zurück in den Organismus (z. B. intravaskulär injiziert) überführt werden.

IX. Nachweisen eines Polynukleotids oder eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung

[0134] Alternativ stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung bereit, wobei das Verfahren umfasst Immunreagieren des Polypeptids mit Antikörpern, die nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt wurden, um Antikörper-Polypeptid-Konjugate zu bilden, und Nachweisen der Konjugate.

[0135] In einer noch anderen Ausführungsform zieht. die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen von Messenger-RNA-Transkripten, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren, in Betracht, wobei das Verfahren umfasst (a) Hybridisieren der Messenger-RNA-Transkripte mit Polynukleotidsequenzen, die das Polypeptid kodieren, um Duplizes zu bilden; und (b) Nachweisen der Duplex. Auch beschrieben ist ein Verfahren zum Nachweisen von DNA-Molekülen, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren, wobei das Verfahren umfasst (a) Hybridisieren von DNA-Molekülen mit einem Polynukleotid, das dieses Polypeptid kodiert, um Duplizes zu bilden; und (b) Nachweisen der Duplizes.

X. Screening Tests

[0136] In einem noch weiteren Aspekt erwägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screenen von Substanzen auf ihre Fähigkeit, den programmierten Zelltod von Vertebraten zu beeinflussen, umfassend die Schritte des Bereitstellens einer Zelle, die ein funktionelles Polypeptid der vorliegenden Erfindung umfasst und des Testens der Fähigkeit von ausgewählten Substanzen, den programmierten Vertebraten-Zelltod dieser Zelle zu beeinflussen, wie dies beansprucht wurde.

[0137] Unter Verwendung der Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können Screening-Tests zum Testen von Kandidatensubstanzen erhalten werden. Eine Kandidatensubstanz ist eine Substanz, die potenziell den programmierten Zelltod von Vertebraten durch Bindung oder anderweitige intramolekulare Wechselwirkung mit dem gewünschten Polypeptid fördern oder hemmen kann, das nicht BCL-2 ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt.

[0138] Ein Screening-Test der vorliegenden Erfindung schließt im Allgemeinen das Bestimmen der Fähigkeit einer Kandidatensubstanz ein, die Überlebensfähigkeit einer Zielzelle (Empfänglichkeit für programmierten Zelltod von Vertebraten) zu beeinflussen, wie zum Beispiel das Screenen von Kandidatensubstanzen, um die-

jenigen zu identifizieren, die den programmierten Zelltod von Vertebraten hemmen oder fördern. Zielzellen können entweder natürlich vorkommende Zellen, von denen bekannt ist, dass sie ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung enthalten, oder transformierte Zellen, die gemäß einem hierin zuvor ausgeführten Verfahren der Transformation hergestellt wurden, sein.

[0139] Wie aus dem Stand der Technik bekannt ist, stellt ein Screening-Test eine Zelle unter Bedingungen bereit, die geeignet sind zum Testen des programmierten Zelltods von Vertebraten. Diese Bedingungen schließen ein, ohne hierauf begrenzt zu sein, pH, Temperatur, Tonizität, die Gegenwart von relevanten Faktoren, die mit dem programmierten Zelltod von Vertebraten zu tun haben (z. B. Wachstumsfaktor, IL-3) und relevante Modifikationen des Polypeptids, wie zum Beispiel Glycosylierung und Prenylierung. Es wird erwogen, dass ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung in einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle exprimiert und verwendet werden kann. Die Wirtszelle kann auch in subzellulare Fraktionen fraktioniert werden, in denen der Rezeptor gefunden werden kann. Zum Beispiel können Zellen, die das Polypeptid exprimieren, in die Nuklei, das endoplasmatische Retikulum, Vesikel oder die Membranoberflächen der Zellen fraktioniert werden.

[0140] Der pH-Wert ist vorzugsweise von ungefähr einem Wert von 6,0 bis einem Wert von ungefähr 8,0, weiter bevorzugt von ungefähr einem Wert von ungefähr 6,8 bis einem Wert von ungefähr 7,8 und am meisten bevorzugt ungefähr 7,4. In einer bevorzugten Ausführungsfom ist die Temperatur von ungefähr 20°C bis ungefähr 50°C, mehr bevorzugt von etwa 30°C bis ungefähr 40°C, und sogar mehr bevorzugt ungefähr 37°C. Die Osmolalität ist vorzugsweise von ungefähr 5 Milliosmol pro Liter (mosm/L) bis ungefähr 400 mosm/L und mehr bevorzugt von ungefähr 200 Milliosmol pro Liter bis ungefähr 400 mosm/L und sogar weiter bevorzugt von ungefähr 290 mosm/L bis ungefähr 310 mosm/L. Die Gegenwart der Faktoren kann für ein ordnungsgemäßes Testen des programmierten Zelltods von Vertebraten in spezifischen Zellen notwendig sein. Solche Faktoren schließen zum Beispiel ein die Gegenwart und Abwesenheit (Entzug) von Wachstumsfaktor, Interleukinen oder Kolonie-stimulierenden Faktoren.

[0141] In einer Ausführungsform wird der Screening-Test so entwickelt, dass er in der Lage ist, zwischen Kandidatensubstanzen mit selektiver Fähigkeit zur Wechselwirkung mit einem oder mehreren der Polypeptide der vorliegenden Erfindung zu unterscheiden, wobei aber die Polypeptide ohne eine im Wesentlichen überlappende Aktivität mit anderen Polypeptiden sind, die hierin identifiziert wurden.

A. Screening-Tests für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung

[0142] Auch beschrieben ist ein Verfahren zum Screenen einer biologischen Probe auf die Anwesenheit des gewünschten Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt. Eine biologische Probe, die gescreent werden soll, kann eine biologische Flüssigkeit, wie zum Beispiel extrazelluläre oder intrazelluläre Flüssigkeit, oder eine Zelle oder Gewebeextrakt oder Homogenat sein. Eine biologische Probe kann auch eine isolierte Zelle (z. B. in Kultur) oder eine Sammlung von Zellen, wie zum Beispiel in einer Gewebeprobe oder histologischen Probe, sein. Eine Gewebeprobe kann in einem flüssigen Medium suspendiert oder auf einem festen Träger wie einem Objektträger befestigt sein.

[0143] Gemäß einem Screening-Testverfahren wird eine biologische Probe einem Antikörper ausgesetzt, der immunreaktiv mit dem Polypeptid ist, auf dessen Gegenwart getestet wird. Typischerweise ist die Exposition von der Bildung einer Beimischung in einem flüssigen Medium begleitet, das sowohl den Antikörper als auch das Kandiadtenpolypeptid enthält. Entweder der Antikörper oder die Probe mit dem Polypeptid kann an einen festen Träger (z. B. eine Säule oder eine Mikrotiterplatte) befestigt sein.

[0144] Die biologische Probe wird dem Antikörper unter biologischen Reaktionsbedingungen und für eine Zeitdauer, die zur Bildung von Antikörper-Polypeptidkonjugaten ausreicht, ausgesetzt. Biologische Reaktionsbedingungen schließen die ionische Zusammensetzung und Konzentration, Temperatur, pH und ähnliches ein.

[0145] Die ionische Zusammensetzung und Konzentration kann von der von destilliertem Wasser bis zu einer 2-molalen Lösung von NaCl variieren. Vorzugsweise ist die Osmolalität von ungefähr 100 Milliosmol/L bis ungefähr 400 mosmol/L und weiter bevorzugt von ungefähr 200 mosmol/L bis ungefähr 300 mosmol/L. Die Temperatur ist vorzugsweise von ungefähr 4°C bis ungefähr 100°C, weiter bevorzugt von ungefähr 15°C bis ungefähr 50°C und noch weiter bevorzugt von ungefähr 25°C bis ungefähr 40°C. Der pH ist vorzugsweise von ungefähr einem Wert von 4,0 bis einem Wert von ungefähr 9,0, weiter bevorzugt von ungefähr einem Wert von 6,5 bis einem Wert von ungefähr 8,5 und sogar noch mehr bevorzugt von ungefähr einem Wert von 7,0 bis einem Wert von ungefähr 7,5. Die einzige Begrenzung der biologischen Reaktionsbedingungen ist die, dass die ausgewählten Bedingungen die Bildung eines Antikörper-Polypeptidkonjugats erlauben und dass die Bedingungen keine negativen Wirkungen auf sowohl den Antikörper als auch das Polypeptid haben.

[0146] Die Expositionszeit wird unter anderem in Abhängigkeit von den verwendeten biologischen Bedingungen, der Konzentration des Antikörpers und des Polypeptids und der Natur der Probe (z. B. Flüssig- oder Gewebeprobe) variieren. Mittel zur Bestimmung der Expositionszeit sind dem Fachmann gut bekannt. Typischerweise beträgt die Expositionszeit von ungefähr 10 Minuten bis ungefähr 200 Minuten, wenn die Probe flüssig ist und die Konzentration des Polypeptids in der Probe ungefähr 10^{-10} M beträgt.

[0147] Die Gegenwart von Polypeptid in der Probe wird durch Nachweis der Bildung und Gegenwart von Antikörper-Polypeptidkonjugaten nachgewiesen. Mittel zum Nachweisen solcher Antikörper-Antigen-(z. B. Rezeptorpolypeptid)-Konjugate und -Komplexe sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen solche Verfahrensschritte wie Zentrifugation, Affinitätschromatographie und ähnliche, Bindung eines sekundären Antikörpers an den Antikörper-Kandidat-Rezeptorkomplex ein.
[0148] In einer Ausführungsform wird der Nachweis durch das Nachweisen eines an den Antikörper gebundenen Indikators erreicht. Solche beispielhaften und gut bekannten Indikatoren schließen radioaktive Marker (z. B. ^{32}P, ^{125}I, ^{14}C), einen Zweitantikörper oder ein Enzym, wie z. B. Meerrettichperoxidase, ein. Mittel zum Anhängen von Indikatoren an Antikörper sind im Stand der Technik gut bekannt. Kommerzielle Kits sind erhältlich.

B. Screening-Test für Anti-Polypeptidantikörper

[0149] Ebenfalls beschrieben ist ein Verfahren zum Screenen einer biologischen Probe auf die Gegenwart von Antikörpern, die immunreaktiv mit dem gewünschten Polypeptid sind, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt (z. B. BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Gemäß einem solchen Verfahren wird eine biologische Probe dem gewünschten Polypeptid, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, unter biologischen Bedingungen und für eine Zeitdauer, die für die Bildung von Antikörper-Polypeptidkonjugaten ausreicht, ausgesetzt und die gebildeten Konjugate werden nachgewiesen.

C. Screening-Test für Polynukleotid das das gewünschte Polypeptid kodiert das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt

[0150] Ein DNA-Molekül und insbesondere ein Sondenmolekül kann zum Hybridisieren als eine Oligonukleotidsonde gegen eine DNA-Quelle, von der angenommen wird, dass sie ein Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten fördert oder hemmt, verwendet werden. Die Sondierung wird gewöhnlich durch Hybridisieren des Oligonukleotids an eine DNA-Quelle, von der angenommen wird, dass sie ein Apoptosegen enthält, ausgeführt. In einigen Fällen bilden die Sonden nur eine einzelne Sonde und in anderen bilden die Sonden eine Sammlung von Sonden auf Basis von einer bestimmten Aminosäuresequenz oder Sequenzen des Polypeptids und tragen in ihrer Unterschiedlichkeit der dem genetischen Code innewohnenden Redundanz Rechnung.
[0151] Eine geeignete DNA-Quelle zum Sondieren auf diese Weise ist in der Lage, ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung zu exprimieren und sie kann eine genomische Bibliothek einer Zelllinie von Interesse sein. Alternativ kann eine DNA-Quelle die gesamte DNA aus einer Zelllinie des Interesses einschließen. Nachdem das erfindungsgemäße Hybridisierungsverfahren einen Kandidaten-DNA-Abschnitt identifiziert hat, bestätigt man, dass man einen positiven Klon erhalten hat, durch weitere Hybridisierung, Restriktionsenzymmapping, Sequenzieren und/oder Expression und Testen.
[0152] Alternativ können solche DNA-Moleküle in einer Anzahl von Techniken verwendet werden, einschließlich sowohl ihrer Verwendung als: (1) diagnostische Werkzeuge zum Nachweisen von normalen und abnormalen DNA-Sequenzen in aus Patientenzellen stammender DNA; (2) Mittel zum Nachweisen und Isolieren anderer Mitglieder der Polypeptidfamilie und verwandter Polypeptide aus einer DNA-Bibliothek, die potenziell solche Sequenzen enthält; (3) Primer zum Hybridisieren an verwandte Sequenzen zum Zweck des Amplifizierens jener Sequenzen; (4) Primer zum Verändern nativer Apoptose-DNA-Sequenzen; als auch anderer Techniken, die auf der Ähnlichkeit der DNA-Sequenzen mit solchen DNA-Abschnitten beruhen, die hierin offenbart sind.
[0153] Wie oben ausgeführt, erlaubt die durch die Erfindung zur Verfügung gestellte DNA-Sequenzinformation in bestimmten Aspekten die Herstellung von relativ kurzen DNA- (oder RNA-) -Sequenzen (z. B. Sonden), die spezifisch an die kodierenden Sequenzen eines ausgewählten Apoptosegens hybridisieren. In diesen Aspekten werden die Nukleinsäuresonden einer geeigneten Länge auf Basis von Überlegungen hinsichtlich der kodierenden Sequenz für ein erfindungsgemäßes Polypeptid hergestellt. Die Fähigkeit solcher Nukleinsäuresonden, spezifisch an andere kodierende Sequenzen zu hybridisieren, verleiht ihnen besondere Nützlichkeit in einer Vielzahl von Ausführungsformen. Am wichtigsten ist, dass die Sonden in einer Vielzahl von Tests zum Nachweisen des Vorhandenseins von komplementären Sequenzen in einer gegebenen Probe verwendet werden können. Dennoch werden Verwendungen vorhergesehen, einschließlich der Verwendung von Sequenzinformationen zur Herstellung von mutierten Speziesprimem und Primern für die Verwendung in der Herstellung anderer genetischer Konstruktionen.
[0154] Um bestimmte Vorteile gemäß der Erfindung bereitzustellen, schließt eine bevorzugte Nukleinsäuresequenz, die zu Hybridisierungsstudien oder -tests verwendet wird, Sondensequenzen ein, die komplementär zu mindestens einem etwa 14 bis 40 langen Nukleotidstück einer Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung sind, wie sie in **Fig.** 1 gezeigt ist. Die Größe von mindestens 14 Nukleotiden in der Länge hilft sicher-

zustellen, dass das Fragment von ausreichender Länge ist, um ein Duplexmolekül zu bilden, das sowohl stabil als auch selektiv ist. Moleküle mit komplementären Sequenzen über ein Stück von mehr als 14 Basen in der Länge sind jedoch im Allgemeinen bevorzugt, um die Stabilität und Selektivität des Hybrids zu erhöhen und hierdurch die Qualität und den Grad an erhaltenen spezifischen Hybridmolekülen zu verbessern. Man wird allgemein bevorzugen, Nukleinsäuremoleküle mit genkomplementären Stücken von 14 bis 20 Nukleotiden, oder wo gewünscht sogar länger, zu entwickeln. Solche Fragmente können einfach hergestellt werden, zum Beispiel durch direktes Synthetisieren der Fragmente mittels chemischer Verfahren, durch die Anwendung von Nukleinsäurereproduktionstechnologie, wie zum Beispiel der PCR-Technologie des US-Patents 4,603,102, welches hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, oder durch Einführen ausgewählter Sequenzen in rekombinante Vektoren zur rekombinanten Herstellung.

[0155] Folglich kann eine Nukleotidsequenz der vorliegenden Erfindung aufgrund ihrer Fähigkeit, selektiv Duplexmoleküle mit komplementären Stücken des Gens zu bilden, verwendet werden. In Abhängigkeit von der vorhergesehenen Anwendung verwendet man verschiedene Hybridisierungsbedingungen, um verschiedene Grade an Selektivität der Probe gegenüber der Zielsequenz zu erreichen. Für Anwendungen, die ein hohes Maß an Selektivität erfordern, verwendet man typischerweise relative stringente Bedingungen zur Bildung der Hybride. Zum Beispiel wählt man relativ niedrige Salz- und/oder hohe Temperaturbedingungen, wie sie zum Beispiel durch 0,02 M–0,15 M NaCl bei Temperaturen von 50°C bis 70°C bereitgestellt werden. Solche Bedingungen sind besonders selektiv und tolerieren wenig, wenn überhaupt, Fehlpaarungen zwischen der Sonde und dem Template oder Zielstrang.

[0156] Selbstverständlich werden für einige Anwendungen, zum Beispiel dort, wo es wünschenswert ist, Mutanten herzustellen, die einen mutierten Primerstrang einsetzen, der an das zugrunde liegende Template hybridisiert ist, oder dort, wo man versucht, ein Polypeptid zu isolieren, das Sequenzen verwandter Spezies, funktioneller Äquivalente oder ähnliches kodiert, weniger stringente Hybridisierungsbedingungen Typischerweise gebraucht, um die Bildung der Heteroduplex zu erlauben. Unter solchen Umständen verwendet man Bedingungen wie zum Beispiel 0,15 M–09 M Salz, bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 55°C. Kreuzhybridisierende Spezies können hierdurch einfach als positiv hybridisierende Signale im Hinblick auf die Kontrollhybridisierungen identifiziert werden. Auf jeden Fall kann allgemein vorhergesagt werden, dass Bedingungen durch Zugabe von steigenden Mengen von Formamid, welches zur Destabilisierung von Hybridduplex in gleicher Weise wie erhöhte Temperatur beiträgt, stringenter gemacht werden. Folglich können die Hybridisierungsbedingungen einfach manipuliert werden und sie werden so allgemein ein in Abhängigkeit von den gewünschten Ergebnissen gewähltes Verfahren sein.

[0157] In bestimmten Ausführungsformen ist es vorteilhaft, eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem geeigneten Mittel, wie zum Beispiel einem Marker, zur Bestimmung der Hybridisierung einzusetzen. Eine große Vielzahl von geeigneten Indikatormitteln ist im Stand der Technik bekannt, einschließlich radioaktiver, enzymatischer oder anderer Liganden, wie zum Beispiel Avidin/Biotin, welche in der Lage sind, ein nachweisbares Signal zu ergeben. In bevorzugten Ausführungsformen verwendet man wahrscheinlich ein Enzym-Tag wie zum Beispiel eine Urease, alkalische Phosphatase oder Peroxidase anstelle von radioaktiven oder anderen umweltunverträglichen Reagenzien. Im Falle von Enzym-Tags sind kolorimetrische Indikatorsubstrate bekannt, die eingesetzt werden können, um ein dem menschlichen Auge oder spektrophotometrisch sichtbares Mittel bereitzustellen, um eine spezifische Hybridisierung mit komplementärer Nukleinsäure enthaltenden Proben zu identifizieren.

[0158] Im Allgemeinen wird vorhergesehen, dass die hierin beschriebenen Hybridisierungssonden sowohl als Reagenzien in Lösungshybridisierung als auch in Ausführungsformen, die eine feste Phase einsetzen, verwendbar sind. In Ausführungsformen, die eine feste Phase einbeziehen, wird die die Test-DNA (oder -RNA) enthaltende Probe adsorbiert oder anderweitig auf einer ausgewählten Matrix oder Oberfläche fixiert. Diese fixierte, einzelsträngige Nukleinsäure wird dann einer spezifischer Hybridisierung mit ausgewählten Sonden unter den gewünschten Bedingungen unterzogen. Die ausgewählten Bedingungen hängen unter anderem von den bes anderen Umständen ab, die auf den bestimmten Kriterien, die benötigt werden, (abhängig von, zum Beispiel, dem G + C-Gehalt, dem Typ der Zielnukleinsäure, der Quelle der Nukleinsäure, der Größe der Hybridisierungssonde usw.) basieren. Nach einem Waschen der hybridisierten Oberfläche, um nicht spezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wird die spezifische Hybridisierung mit Hilfe des Markers nachgewiesen oder sogar quantifiziert.

XI. Test Kits

[0159] In einem anderen Aspekt sind diagnostische Test-Kits zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung in einer biologischen Probe erwogen, wobei die Kits ein erstes Behältnis umfassen, enthaltend einen Erstantikörper, der zur Immunreaktion mit dem Polypeptid in der Lage ist, wobei der Erstantikörper in einer ausreichenden Menge vorhanden ist, um zumindest einen Test durchzuführen. Vorzugsweise umfassen die Test-Kits ein zweites Behältnis, enthaltend einen Zweitantikörper, der mit dem Er-

stantikörper immunreagiert. Weiter bevorzugt sind die in diesen Test-Kits verwendeten Antikörper monoklonale Antikörper. Noch weiter bevorzugt ist der Erstantikörper an einen festen Träger gebunden. Noch weiter bevorzugt umfassen die Erst- und Zweitantikörper einen Indikator und vorzugsweise ist der Indikator ein radioaktiver Marker oder ein Enzym.

[0160] Auch in Erwägung gezogen ist ein diagnostischer Kit zum Screenen von Agenzien. Solch ein Kit kann ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung enthalten. Der Kit kann Reagenzien zum Nachweisen einer Wechselwirkung zwischen einem Agenz und einem Rezeptor der vorliegenden Erfindung enthalten. Das zur Verfügung gestellte Reagenz kann radioaktiv markiert sein. Der Kit kann ein bekanntes radioaktiv markiertes Mittel enthalten, das in der Lage ist, einen Rezeptor der vorliegenden Erfindung zu binden oder mit diesen zu interagieren.

[0161] In einen alternativen Aspekt wird ein diagnostischer Test-Kit zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Polynukleotids, das ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, in einer biologischen Probe in Erwägung gezogen, wobei der Kit ein erstes Behältnis umfasst, das ein zweites Polynukleotid enthält, das identisch oder komplementär zu einem Abschnitt von mindestens 14 aufeinander folgenden Nukleotidbasen von SEQ ID NR: 1 und 3 ist.

[0162] In einer weitern Ausführungsform werden diagnostische Kits zum Nachweisen des Vorhandenseins von Antikörpern, die mit den Polypeptid der vorliegenden Erfindung immunreaktiv sind, in einer biologischen Probe in Erwägung gezogen, wobei der Kit ein erstes Behältnis umfasst, das ein Polypeptid enthält, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist, das den programmierten Zelltod von Vertebraten hemmt oder fördert und das mit dem Antikörper immunreagiert, wobei das Polypeptid in einer Menge vorhanden ist, die zur Durchführung mindestens einer Tests ausreichend ist. Die Reagenzien des Kits können in einer flüssigen Lösung, angeheftet an einen festen Träger oder als trockenes Pulver zur Verfügung gestellt werden. Wenn das Reagenz in einer flüssigen Lösung zur Verfügung gestellt wird, ist die flüssige Lösung vorzugsweise eine wässrige Lösung. Wenn das Reagenz an einen festen Träger angeheftet zur Verfügung gestellt wird, kann der feste Träger vorzugsweise ein Chromatographie-Medium oder ein Objektträger sein. Wenn das Reagenz ein trocknes Pulver ist, kann das Pulver durch Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels rekonstituiert werden. Das Lösungsmittel kann bereitgestellt werden.

XII. Behandlung des programmierten Zelltods (Apoptose) mit Gentherapie

[0163] In diesem Beispiel wird die auf die Vorbeugung und Behandlung von Apoptose gerichtete bcl-x_L- (SEQ ID NR: 6), bcl-x_S- (SEQ ID NR: 8) oder bcl-x_1- (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) -Gentherapie beschrieben. Diese Zellen schließen, ohne darauf begrenzt zu sein, neuronale Zellen, Zellen des Immunsystems und krebsartige oder tumorartige Zellen ein.

[0164] In einem noch weiteren Aspekt erwägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Verändern des programmierten Zelltods in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

(a) Verabreichen einer wirksamen Menge eines DNA-Moleküls umfassend ein Polynukleotid, das das gewünschte Polypeptid kodiert, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR: 5) ist und das den programmierten Zelltod von Vertebraten hemmt oder fördert, an eine Zelle; und

(b) Halten der Zelle unter Bedingungen, die zur Expression dieses Polypeptids ausreichen.

[0165] Genauer gesagt, ist das Polypeptid BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Die Verabreichung wird vorzugsweise durch Injizieren des DNA-Moleküls in die Zelle erreicht. Wenn sich die Zelle in einem Subjekt befindet, ist das Verabreichen vorzugsweise ein Verabreichen des DNA-Moleküls in das Kreislaufsystem des Subjekts. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verabreichen die Schritte:

(a) Bereitstellen eines Vehikels, das das DNA-Molekül enthält; und

(b) Verabreichen des Vehikels an ein Subjekt.

[0166] Ein Vehikel ist vorzugsweise eine Zelle, die mit dem DNA-Molekül transformiert oder transfiziert wurde, oder eine transfizierte Zelle, die aus einer solchen transformierten oder transfizierten Zelle abgeleitet ist. Eine beispielhafte und bevorzugte transformierte oder transfizierte Zelle ist ein Leukozyt, wie zum Beispiel ein Tumor-infintrierende Lymphozyt oder eine T-Zelle oder eine Tumorzelle aus einem Tumor, der behandelt wird. Mittel zum Transformieren oder Transfizieren einer Zelle mit einem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung sind oben ausgeführt.

[0167] Humane Lymphozyten können auch mit strahlungsinduzierbaren Plasmidkonstrukten unter Verwendung bestehender Technologie einschließlich retroviral vermitteltem Gentransfer (Overell, et al., 1991; Fauser, 1991) transfiziert werden. In einer beispielhaften Ausführungsform können gegen Zieltumore LAK-Zellen verwendet werden, die dazu tendieren, sich in der fraglichen Tumorstelle mit einem gewissen Maß an Präferenz einzunisten, obwohl sie sich selbst auch im Körper auf andere Orte verteilen werden, wie wohl bekannt ist. In

der Tat ist einer der wichtigsten Vorteile des strahlungsinduzierbaren Systems, dass nur jene LAK-Zellen, die im Bestrahlungsfeld liegen, aktiviert werden und ihre exogen eingeführten Lymphokingene aktiviert haben werden. Folglich gibt es im Fall der LAK-Zeller keinen besonderen Bedarf für ein weiteres Targeting.

[0168] Alternativ ist das Vehikel ein Virus oder ein Antikörper, das/der spezifisch infiziert oder mit einem Antigen des Tumor immunreagiert. Retroviren, die zur Verabreichung der Konstrukte an Wirtszielgewebe verwendet werden, sind im Allgemeinen Viren, in denen die 3'-LTR (linear transfer region) inaktiviert wurde. Das heißt, sie sind Enhancer-lose 3'-LTRs, die oft als SIN (self-inactivating viruses) bezeichnet werden, da nach produktiver Infektion in die Wirtszelle das 3'-LTR auf das 5'-Ende übertragen wird und beide viralen LTRs im Hinblick auf die transkriptionale Aktivität inaktiv sind. Eine Verwendung dieser Viren, die dem Fachmann gut bekannt sind, ist es, Gene zu klonieren, für welche die regulatorischen Elemente des geklonten Gens in den Raum zwischen die beiden LTRs insertiert werden. Ein Vorteil eines viralen Infektionssystems ist, dass es ein sehr hohes Infektionsniveau in einer geeigneten Empfängerzelle, z. B. LAK-Zellen, erlaubt.

[0169] Die viralen Konstrukte werden an einen Wirt durch ein beliebiges Verfahren verabreicht, das bewirkt, dass die Konstrukte die Zellen des Zielgewebes erreichen, wobei die Pigenschaften des in dieser Erfindung verwendeten Konstrukts erhalten bleiben. Beispielsweise zeigte eine Rattengliomzelllinie, C6-BU-1, unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), es bestanden nämlich alle bisher getesteten HSV-1-Stämme in dieser Zelllinie fort, aber die HSV-2-Stämme taten dies nicht (Sakihama, et al., 1991). C6-BU-1-Zellen bestehen aus Subpopulationen, die unterschiedlich empfänglich für HSV-1 sind, was möglicherweise austauschbar ist. Weiterhin konnte das Wachstum von Tumoren, die aus C6-abgeleiteten Zellen hergestellt sind, die das HSV-1 tk-Gen tragen, aber nicht das der ursprünglichen C6-Zellen, durch intraperitoneale Verabreichung von Ganciclovir inhibiert werden (Ezzeddine, et al., 1991). Diese Arbeit zeigt die Wirksamkeit der Thymidinkinase, die von dem HSV-1 tk-Gen exprimiert wird, beim Sensibilisieren von Gehirntumorzellen gegenüber toxischen Wirkungen von Nukleosidanalogen. Retrovirusvektoren sollten sich daher als nützlich bei der selektiven Verabreichung dieses Killergens an sich teilende Tumorzellen im Nervensystem erweisen, wobei die meisten endogenen Zellen sich nicht teilen. Die Bestrahlung wird verwendet werden, um die Spezifizität der Verabreichung oder Aktivierung der Transkription des tk-Gens nur in bestrahlten Bereichen zu verstärken.

[0170] Antikörper wurden verwendet, um DNA-Moleküle auf ein Ziel zu richten und zu verabreichen. Ein N-terminal modifiziertes Poly-L-Lysin-(NPLL)-Antikörperkonjugat bildet leicht einen Komplex mit Plasmid-DNA (Trubetskoy et al., 1992). Ein Komplex von monoklonalen Antikörpern gegen ein Zelloberflächenthrombomodulin welches mit NPLL konjugiert war, wurde verwendet, um eine fremde Plasmid-DNA gegen eine Antigen-exprimierende Mauslungenendothel-Zelllinie und Mauslunge zu richten. Diese als Ziel identifizierten Endothelzellen exprimierten das Produkt, das von der fremden DNA kodiert wurde.

[0171] Zielzellen für Gentherapie können normale Zellen sein oder Zellen, die nicht unter einer korrekten Kontrolle ihrer konstitutiven Gene sind. Zum Beispiel sterben viele Zellen während der normalen Entwicklung und Selbsterhaltung. Krebsartige oder tumorartige Gewebe entwickeln sich, wenn Zellen nicht richtig absterben. Weiterhin wurden neurodegenerative Krankheiten mit vorzeitigem neuronalem Zelltod in Verbindung gebracht. Zusätzlich wurde der vorzeitige Tod von Zellen des Immunsystems mit Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht.

[0172] Eine bevorzugte neuronale Zelle ist jede Zelle des zentralen Nervensystems. Dieser neuronale Zelltyp kann ein normales Neuron oder ein Neuron sein, das im Begriff ist, Apoptose zu durchlaufen. Insbesondere werden neuronale Zellen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (wie z. B. Parkinsonsche Krankheit, amyotrophische laterale Sklerose und Multiple Sklerose) in Erwägung gezogen.

[0173] Eine bevorzugte Immunzelle ist jede Zelle des Immunsystems. Diese Zelle kann eine normale Zelle des Immunsystems oder eine Zelle sein, die im Begriff ist, Apoptose zu durchlaufen. Es wird erwogen, dass diese Zelle B- und T-Lymphozyten, Leukozyten und Thymozyten einschließt, aber nicht darauf begrenzt ist.

[0174] Eine bevorzugte krebsartige oder tumorartige Zelle ist jede beliebige krebsartige oder tumorartige Zelle. Dieser Zelltyp kann jede Zelle sein, die keine Apoptose durchläuft. Es wird erwogen, dass krebsartige Zellen Zellen aus Prostatakrebs, Brustkrebs, Krebsen des Immunsystems, Knochenkrebs und Tumoren des zentralen Nervensystems einschließen, aber nicht darauf begrenzt sind.

[0175] Ein Expressionsvektor, der bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) oder bcl-x_1 (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) enthält, kann in neuronale Zellen, krebsartige Zellen, Zellen des Immunsystems oder andere Zellen, in welchen die Behandlung der Apoptose gewünscht wird, eingeführt werden. Ein Fachmann kann einen geeigneten Vektor für den Zielzelltyp auswählen.

[0176] Beispielsweise kann ein mutierter HSV-1-Virus als Vektor zum Einführen des Gens in neuronale Zellen verwendet werden. Es kann auch vorhergesehen werden, dass diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von alternativen viralen oder Phagen-Vektoren, einschließlich retroviralen Vektoren und Vaccinia-Viren, deren Genom in alternativer Weise manipuliert wurde, um das Virus nicht-pathogen zu machen, ausgeführt werden kann. Verfahren zur Bildung einer solchen viralen Mutation sind im Detail im US-Patent Nr. 4,769,331, welches hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird, ausgeführt. Es wird auch erwogen,

dass multipotente neuronale Zelllinien zum Verabreichen des bcl-x_L- oder bcl-x_S-Gens an das ZNS verwendet werden können. Diese Verfahrensschritte beziehen ein das Verwenden von Zellen aus einer fötalen oder postnatalen ZNS-Quelle, Immortalisieren und Transformieren dieser in vitro und Zurücktransplantieren der Zellen in das Maushirn. Diese Zellen folgen nach Verpflanzung dem Migrationsmuster und Umweltsignal normaler Gehirnzellentwicklung und differenzieren in einer nicht tumorigenen, zytoarchitektonisch korrekten Weise. Diese Arbeit wurde beispielhaft in einigen Artikeln erläutert, vor allem Snyder et al., Cell, 68: 33–51, 1992, und Ranfranz et al., Cell, 66: 713–729, 1991. Unter Verwendung geeigneter modifizierter Techniken ist es möglich, das bcl-x_L- oder bcl-x_S-Gen alleine oder in Kombination mit anderen interessierenden Genen in die Zellen einzuführen und zu verpflanzen. Solch ein Verfahrensschritt erlaubt die Verabreichung der Gene an ihre natürliche Stelle. Die richtige Expression des bcl-x_L-, bcl-x_S- oder bcl-x_1-Gens in diesen Neuronen sollte in der Verhinderung des Zelltods bei Neurodegeneration und dem Erhalten von Zellen, die diese fremden, zur Gentherapie geeigneten Gene tragen, resultieren.

XIII. Behandlung von programmiertem Zelltod (Apoptose) mit einem Polypeptid der vorliegenden Erfindung.

[0177] Als eine Alternative zu den Gentherapieverfahren, die für die exemplarische Zwecke in Beispiel 2 und 3 beschrieben sind, können neuronale Zellen, den programmierten Zelltod durchlaufen oder im Begriff sind, dies zu tun, mit dem Protein behandelt werden, das von dem bcl-x_L-, bcl-x_S- oder bcl-x_1-Gen exprimiert wird, d. h. BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4). Alternativ könnte ein biologisches funktionelles äquivalentes Protein in einer solchen Behandlung verwendet werden.
[0178] Zum Beispiel wird BCL-X_L (SEQ ID NR: 7), BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) aus Zellen isoliert, die das Protein exprimieren, und unter Verwendung konventioneller Chromatographiereinigung und Immunaffinitätsreinigungsverfahren gereinigt, die von Ackerman et al. beschrieben wurden (J. Virol. 58: 843–850, 1986, welches hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird). Das gereinigte Protein wird als nächstes mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger kombiniert, wie zum Beispiel gepufferter Salzlösung oder gereinigtem destilliertem Wasser. Zur Verabreichung kann die pharmazeutische Zusammensetzung je nach Eignung auf eine von mehreren Arten injiziert werden: (i) intraspinale Injektion; (ii) intraventrikuläre Injektion; (iii) direkte Injektion in den Bereich, der die Neuronen enthält, die den programmierten Zelltod durchlaufen oder im Begriff sind, dieses zu tun, oder durch andere geeignete Verfahren zur Verabreichung, die vom Fachmann verstanden werden. Eine solche Behandlung würde insbesondere bei der chirurgischen Behandlung von durchtrennten peripheren Nerven geeignet sein, und die Verwendung von Proteinen als Therapeutika liegt im Lichte der vorliegenden Beschreibung im gegenwärtigen Bereich des Können des medizinischen Fachmanns.
[0179] Die folgenden Beispiele wurden eingeschlossen, um bevorzugte Arten der Erfindung zu illustrieren. Bestimmte Aspekte der folgenden Beispiele sind hinsichtlich der Techniken und Verfahrensweisen beschrieben, von denen die gegenwärtigen Erfinder gefunden oder erwogen haben, dass sie in der Praxis der Erfindung gut funktionieren. Diese Beispiele werden durch die Verwendung von Standardlaborpraktiken der Erfinder beispielhaft erläutert. Im Licht der vorliegenden Offenbarung und des allgemeinen Niveaus des Standes der Technik wird der Fachmann anerkennen, dass die folgenden Beispiele nur als Beispiele beabsichtigt sind und dass eine Vielzahl von Veränderungen, Modifikationen und Abänderungen verwendet werden kann, ohne den Geist und Umfang der Erfindung zu verlassen.

BEISPIEL I: Klonierung von bcl-x

[0180] Lymphozyten von Vögeln entwickeln sich in zwei verschiedenen Organen, der Bursa Fabricius und dem Thymus. B- und T-Zellen, die sich in diesen Organen entwickeln, teilen eine gemeinsame Eigenschaft dahingehend, dass Zellen aus beiden Orten eine schnelle Induktion des programmierten Zelltods nach Entfernung von Stroma-Komponenten des jeweiligen Organs durchmachen (Cooper et al., 1991; Neiman et al., 1991). Die Erfinder verwendeten eine murine bcl-2 cDNA-Sonde, um bcl-x aus Vögeln zu klonieren. Die Nukleotidsequenz von bcl-x (SEQ ID NRN: 1 und 3) zeigte einen geringen Grad an Sequenzidentität (56%) mit bcl-2 und enthielt einen offenen Leserahmen, der signifikante Ähnlichkeit mit dem offenen Leserahmen zeigte, der in dem ungespleissten bcl-2b-Transkript gefunden wurde, welches aus dem bcl-2-Gen sowohl im Menschen als auch Mäusen stammte (**Fig.** 1A und B). Ein Sequenzieren eines genomischen Fragments, das bcl-x enthielt, zeigte, dass die 1,3 kb cDNA auch aus einer linearen genomischen Sequenz in Abwesenheit von Spleissen entsprungen war. Dieses Merkmal der Sequenzen erhöhte die Möglichkeit, dass die bcl-x cDNA aus einem unprozessierten Pseudogen entsprungen sein könnte, das im Vogelgenom vorhanden ist.

BEISPIEL II: bcl-x ist in vielen Geweben exprimiert und in der Vertebratenevolution hoch konserviert

[0181] Northern-Blot-Analyse von verschiedenen Gewebe-RNA-Proben, die aus frisch geschlüpften Hühnern isoliert wurden, ergab, dass eine bcl-x-spezifische Sonde mit einer 2,7 kb mRNA-Spezies hybridisierte, die mit

höchsten Spiegeln im Thymus und zentralen Nervensystem vorhanden war (**Fig.** 2). Im Gegensatz dazu erkannte eine murine bcl-2-spezifische Sonde eine mRNA-Spezies von ungefähr 6,5 kb, die mit etwa gleichen Spiegeln in allen getesteten Geweben vorhanden war.

[0182] bcl-x ist in dem Huhn-, Maus- und humanem Genom hoch konserviert. Huhn-bcl-x und Maus-bcl-2-Sonden hybridisierten wirksam an DNA aus allen drei Spezies. Dennoch banden die bcl-x- und bcl-2-Sonden an unterschiedliche Abschnitte der genomischen DNA, was anzeigt, dass sie unabhängige Sequenzen erkannten, welche beide während der Vertebratenevolution hoch konserviert sind (**Fig.** 3).

BEISPIEL III: Identifikation von zwei distinkten humanen bcl-x-cDNAs

[0183] Die Erfinder klonierten als nächstes humane Homologe von bcl-x. Sie identifizierten zwei separate Typen von humanen bcl-x-cDNAs, die unterschiedliche offene Leserahmen enthielt, die von identischen 5'- und 3'-untranslatierten Sequenzen flankiert waren. Der größere Typ an cDNA, bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), enthielt einen offenen Leserahmen (SEQ ID NR: 7) mit mehr 76% Nukleotid- und 74% Aminosäureidentität (85% Aminosäureähnlichkeit) zu Huhn-bcl-x (SEQ ID NR: 2). Dennoch weicht die humane bcl-x_L- (SEQ ID NR: 6) -cDNA von der Huhn-bcl-x- (SEQ ID NRN: 1 und 3) -Sequenz an einer Position ab entsprechend der Stelle, an der die zwei kodierenden Exons von bcl-2 verbunden sind, um das bcl-2a-Transkript zu bilden, und an der bcl-2a von bcl-2b abweicht. Es ist das bcl-2a-Transkript, das die funktionelle Aktivität, die zuvor dem bcl-2-Gen zugeschrieben wurden, kodiert. Von dem Punkt seiner Divergenz zu der Huhn-bcl-x-Sequenz erstreckt sich der humane bcl-x_L offene Leserahmen (SEQ ID NR: 7) weitere 45 Aminosäuren, bevor ein Terminationskodon erreicht wird. Die ersten 7 der 8 dieser neuen Aminosäuren waren identisch zu den Aminosäuren, die durch das zweite kodierende Exon von bcl-2 kodiert wurden und in den bcl-2a-, aber nicht in den bcl-2b-mRNAs, von sowohl dem Menschen als auch Mäusen vorhanden waren (**Fig.** 4a; Tsujimoto et al., 1986; Negrini et al., 1987). Die letzten 36 Aminosäuren, die von bcl-x_L kodiert werden, zeigten auch signifikante Sequenzähnlichkeit zu der hydrophoben Domäne von bcl-2a, von der angenommen wird, dass sie eine Rolle bei dem Einführen des bcl-2-Proteins in zytoplasmatische Membranen spielt (Chen-Levy et al., 1989; Chen-Levy und Cleary, 1990). Konsistent mit der Hinzufügung dieser neuen bcl-x_L-Sequenzen als Ergebnis des mRNA-Prozessierens wurde die genomische Sequenz, die die letzten 45 Aminosäuren von bcl-x_L kodiert, auf einem von dem Exon, das den Rest des offenen Leserahmens kodiert, getrennten Exon gefunden.

[0184] Der zweite identifizierte Typ humaner bcl-x-abgeleiteter cDNA (**Fig.** 4b), bcl-x_S (SEQ ID NR: 8), unterscheidet sich von bcl-x_L (SEQ ID NR: 6), da ihm die Sequenz fehlt, die einen Abschnitt von 63 Aminosäuren kodiert, der innerhalb des offenen Leserahmens von bcl-x_L (SEQ ID NR: 7) (dieser Bereich wird als BCL-X_1 (SEQ ID NR: 4) in **Fig.** 4c angezeigt) vorhanden ist. Diese Deletion tritt als ein Ergebnis des Spleissens des zweiten kodierenden Exons auf, das in bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) beobachtet wird, an einen proximaleren 5'-Spleiss-Donor innerhalb des ersten kodierenden Exons. Die Zufügung der 45 Aminosäuren, die aus dem zweiten kodierenden Exon stammen, beginnt präzise an der Position einer potenziellen Spleiss-Donor-Stelle, AG/GT, die innerhalb des offenen Leserahmens von bcl-x_L gelegen ist. Die Verwendung dieser Spleiss-Donor-Stelle bei der Bildung der bcl-x_S-cDNA resultiert in der Deletion der 63 Aminosäurensequenz, die die größte Ähnlichkeit zwischen bcl-2 und bcl-x zeigt. Diese Aminosäuresequenz, die für BCL-X_S (SEQ ID NR: 9) kodiert, zeigt 73% Identität mit der gleichen Region im humanen BCL-2 (SEQ ID NR: 5). Diese Region von BCL-2 ist auch die höchst konservierte Region zwischen Huhn-, Maus- und humanem BCL-2 (Cazals-Hatem et al., 1992; Eguchi et al., 1992).

[0185] bcl-x_L und bcl-x_S wurden in RNA transkribiert und dann einer in-vitro-Translation unterzogen. Wie man in **Fig.** 5 sieht, resultieren sowohl bcl-x_L- als auch bcl-x_S-cDNAs in Translationsprodukten von ungefähr der durch den offenen Leserahmen vorhergesagten Größe.

BEISPIEL IV: bcl-x_L kann als ein Inhibitor des apoptotischen Zelltods dienen

[0186] Die murine IL-3-abhängige prolymphozytische Zelllinie FL5.12 wurde mit der humanen bcl-x_L-cDNA (SEQ ID NR: 6) transfiziert, welche in die EcoRI-Klonierungsstelle des Expressionsplasmids pSFFV-Neo insertiert war. Die Zellen wurden auf Neomycinresistenz für 10 Tage selektioniert und dann als eine polyklonale Population verwendet, um ihre Resistenz gegen Apoptose nach Entfernen von IL-3 zu testen. bcl-x_L-transfizierte Zellen hatten ähnliche Wachstumskinetiken im Vergleich zu sowohl Ausgangs-Zelllinien als auch zu Neomycintransfizierten Kontrollzellen. Zum Vergleich wurden auch Zellen mit dem humanen bcl-2a offenen Leserahmen transfiziert, der in EcoRI-Klonierungsstellen von pSFFV-Neo insertiert war. Neomycin-resistente Zellen wurden dann einer IL-3-Deprivation unterzogen, und die Zahl der überlebenden Zellen beginnend mit dem Zeitpunkt der IL-3-Deprivation in Triplikaten berechnet.

[0187] Wie in **Fig.** 6 zu sehen ist, machten die mit dem Neomycin-Konstrukt alleine transfizierten FL5.12-Zellen einen schnellen Zelltod nach Entfernen des Wachstumsfaktors durch. Aufeinander folgende Untersuchungen ergaben, dass diese Zellen Apoptose durchmachten, was sich durch Blasenbildung in der Plasmamemb-

ran (plasma membrane blebbing), Verlust an Zellvolumen, Kernkondensation und Abbau von Kern-DNA in nukleosomalen Intervallen, wie bereits zuvor beschrieben (Hockenbery et al., 1990: Nuñez et al., 1990), äußerte. Im Gegensatz dazu zeigten bcl-2-transfizierte Zellen eine signifikante Resistenz gegen den Zelltod und sie konnten einfach veranlasst werden, wieder in den Zellzyklus nach Wiederzugabe von IL-3 einzutreten. Die Expression von bcl-2 in mehr als 95% der transfizierten Hauptzellen wurde durch spezifisches Färben mit einem bcl-2-spezifischen monoklonalen Antikörper gezeigt.

[0188] Wenn stabile bcl-x_L-Transfektanten einer IL-3-Deprivation unterzogen wurden, zeigten sie eine dramatische Resistenz gegenüber Zelltod mit im Wesentlichen keinen Verlust der Zelllebensfähigkeit über die 8-tägige Kulturdauer. Diese Resistenz gegenüber Zelltod war signifikant größer als die Resistenz der bcl-2-transfizierten Zellen, in welchen es einen reproduzierbaren 50%-igen Abfall der Zahl der überlebenden Zellen über eine ähnliche Zeitdauer gab (**Fig.** 6). Die Kotransfektion von bcl-2 und bcl-x_L verbesserte das Zellüberleben nicht über das Maß der Transfektion mit bcl-x_L alleine hinaus. Das dramatische Überleben von bcl-x_L-transfizierten Zellen war keine Folge einer anhaltenden Zellproliferation als Ergebnis der Transformation oder der Induktion von Wachstumsfaktorunabhängiger Zellproliferation. Nach IL-3-Deprivation nahmen die Zellen schnell einen ruhenden Phänotyp an, der in einer G0/G1-Phase des Zellzyklus arretierte, was durch die Zellgröße und den DNA-Gehalt gemessen wurde, und sie traten nicht wieder in den Zellzyklus ein, bis IL-3 wieder zugegeben wurde. Die Wiederzugabe von IL-3 führte zu einer schnellen Blastentransformation und einem Fortschreiten des Zellzyklus. Diese Daten zeigen, dass die Expression von bcl-x_L zu einer signifikanten Resistenz gegen apoptotischen Zelltod führen kann, die mindestens so groß ist wie die durch bcl-2 verliehene. Diese Eigenschaft der bcl-x_L-transfizierten Zellen scheint nicht ein Ergebnis aus zellulärer Transformation zu sein, die in einem IL-3-unabhängigen Zellwachstum resultiert.

[0189] Die stabile Transfektion von bcl-x_L verhindert den apoptotischen Zelltod nach Wachstumsfaktordeprivation einer IL-3-abhängigen Zelllinie in einem noch größeren Ausmaß als die Überexpression von bcl-2. Die Kombination der zwei Vektoren war nicht besser beim Verhindern des apoptotischen Zelltodes als bcl-x_L-alleine. Dies zeigt, dass bcl-x_L eine Hauptrolle bei der Regulation der Abhängigkeit der Zellen von kontinuierlichen exogenen Signalen beim Verhindern des Zelltods spielt.

BEISPIEL V: bcl-x_S kann die Fähigkeit von bcl-2 hemmen, den apoptotischen Zelltod zu verhindern

[0190] Die bcl-x_S-Isoform von bcl-x spielt eine Rolle bei der Regulation des apoptotischen Zelltods. FL5.12-Zellen wurden stabil mit einem humanen bcl-x_S-Expressionsplasmid (**Fig.** 7) transfiziert. Die stabilen Transfektanten wurden leicht isoliert und ihre Expression der bcl-x_S-mRNA durch Northern-Blot-Analyse bestätigt (**Fig.** 7C). In Anwesenheit von IL-3 erschienen diese Zellen morphologisch normal und zeigten Wachstumseigenschaften, die von denen der Ausgangs-Zellen oder der Neomycin-transifzierten Kontrollen nicht unterscheidbar waren. Weiterhin starben die Zellen nach Deprivation von IL-3 mit Kinetiken, die von den Neomycin-transfizierten Kontrollzellen nicht unterscheidbar waren. bcl-2-transfizierte Zellen zeigten eine charakteristische Resistenz gegen apoptotischen Zelltod nach Entfernen von IL-3. Bemerkenswerter Weise erhielten die Zellen aber dennoch ihre Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktorentzug wieder, wenn bcl-x_S mit bcl-2 kotransfiziert und stabile Transfektanten isoliert wurden, da sie apoptotischen Zelltod nach IL-3-Deprivation durchmachten. Dennoch gab es eine signifikante Verzögerung beim Einsetzen des Zelltods innerhalb dieser polyklonalen Population. Die Sensitivität gegen IL-3-Deprivation der mit bcl-2 und bcl-x_S kotransfizierten Zellen war nicht das Ergebnis einer reduzierten bcl-2-Expression, da sowohl die Hauptpopulationen von bcl-2- und bcl-2 + bcl-x_S-transfizierten Zellen in etwa die gleichen Spiegel an bcl-2-Protein zeigten. Die Größe der Fähigkeit von bcl-x_S, die bcl-2-Funktion zu inhibieren, wurde in einer Reihe von Subklonen, die aus der kotransfizierten Population der Zellen isoliert wurde, untersucht. Alle diese Zellen exprimierten hohe Spiegel des transfizierten bcl-2 und alle zeigten eine reduzierte Resistenz gegen apoptotischen Zelltod nach Wachstumsfaktorentzug, wobei einige Klone eine fast vollständige Aufhebung der bcl-2-Funktion in Gegenwart der bcl-x_S-Expression zeigten (**Fig.** 7b). Weiterhin zeigte die DNA aus mit bcl-2 und bcl-x_S kotransfizierten Zellen ein klares nukleosomales Muster an Abbau, wenn sie 24 und 48 Stunden nach IL-3-Deprivation untersucht wurden, wohingegen DNA aus nur mit bcl-2 oder nur mit bcl-x_L transfizierten Zellen dies nicht tat. Obwohl es eine Korrelation zwischen der Inhibition der bcl-2-Funktion und den bcl-x_S-mRNA-Spiegeln gab, die von den Zellen exprimiert wurde, wurde keine präzise Stoichiometrie zwischen bcl-x_S-Expression und bcl-2-Funktionsinhibition bestimmt. In Subklonen, die sowohl bcl-2 als auch bcl-x_S exprimierten, gab es eine signifikante Inhibition der bcl-2-induzierten Resistenz gegenüber Apoptose durch Koexpression von bcl-x_S. Das mittlere Überleben der bcl-2-transfizierten Zellen 96 Stunden nach IL-3-Entzug betrug 79 + 14% (Mittelwert + 1 S.D., n = 3), wohingegen das mittlere Überleben von Subklonen, die bcl-2 und bcl-x_S exprimierten, 8 + 8% (Mittelwert + 1 S.D., n = 6) betrug.

[0191] Diese Induktion des apoptotischen Zelltods erforderte, dass das bcl-x_S-Konstrukt in der Sense-Orientierung exprimiert ist, da die stabile Einführung eines pSFFV-Neo-Plasmids, enthaltend bcl-x_S, das in Antisense-Orientierung kloniert war, keine Wirkung auf die Fähigkeit von bcl-2 hatte, den apoptotischen Zelltod nach Wachstumsfaktordeprivation zu verhindern (**Fig.** 8). Die stabile Expression von bcl-x_S hatte keine Wirkung auf

das Zellwachstum in Gegenwart von Wachstumsfaktor oder auf die Rate des apoptotischen Zelltods nach Wachstumsfaktorentfernung. Dennoch konnte bcl-x_S die Fähigkeit der stabilen bcl-2-Expression, den apoptotischen Zelltod nach Wachstumsfaktorentfernung zu inhibieren, verhindern.

[0192] Diese Daten zeigen, dass die Expression der bcl-x_S-Isoform des bcl-x-Gens wahrscheinlich eine dominante Rolle bei der Regulation der Fähigkeit von anderen Wachstumsüberlebensgenen, wie zum Beispiel bcl-2, bei der Verhinderung des apoptotischen Zelltods spielt. Die bcl-x_S-Expression erhöhte die Abhängigkeit der Zellen von exogenen Signalen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, zur aktiven Verhinderung des Zelltods.

BEISPIEL VI: Expression von bcl-x während der T-Zellentwicklung und -aktivierung.

[0193] Der höchste Spiegel an mRNA für bcl-x in Hühnern wurde in den Organen beobachtet, in denen die lymphoide Entwicklung stattfindet. Wie in **Fig.** 9 zu sehen ist, kann bcl-x-mRNA einfach in humanen Thymozyten nachgewiesen werden. Nach Fraktionierung der humanen Thymozyten in unreife und reife Populationen ist die bcl-x-Expression in Abwesenheit von Mitogenstimulation auf unreife „doppelt-positive" Thymozyten beschränkt, die sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren. bcl-x-mRNA wurde in unstimulierten reifen „einfach positiven" (CD4 + CD8– und CD4 – CD8+) Thymozyten oder in T-Zellen des peripheren Bluts nicht nachgewiesen.

[0194] Im Thymus war bcl-x in unreifen doppelt-positiven Thymozyten exprimiert, aber es wurde nicht in frisch isolierten einfach-positiven Thymozyten oder T-Zellen des peripheren Blutes beobachtet. Die bcl-x-mRNA-Spezies, die in den doppelt-positiven Thymozyten gefunden wurde, war fast ausschließlich die der bcl-x_S-Form. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass bcl-2 die negative Selektion nicht inhibiert, die normalerweise im doppelt-positiven Stadium der Thymozytenentwicklung auftritt (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991a). Die stabile Expression von bcl-x_S in diesem Stadium der Entwicklung stellt eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung zur Verfügung. Dennoch wurde gezeigt, dass bcl-2 manche Formen der Apoptose verhindern kann, die in doppelt-positiven Thymozyten auftreten (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991a; Seigel et al., 1991). Dies zeigt, dass der Einfluss von bcl-2 im Verhältnis zu bcl-x_S bei der Regulation der zentralen Ereignisse, die in den apoptotischen Zelltod verwickelt sind, in Abhängigkeit vom Signalweg, der die Zelltodantwort auslöst, variieren kann. Alternativ könnte die Down-Regulation der bcl-x-Expression auf mRNA- oder Proteinebene es den Wirkungen von bcl-2 erlauben vorzuherrschen. Unter diesen Umständen kann es für die Überexpression von bcl-2 möglich sein, dass sie den apoptotischen Zelltod verhindert.

[0195] Obwohl einfach-positive Thymozyten und reife T-Zellen des peripheren Bluts bcl-x-mRNA nicht exprimieren, kann bei beiden Populationen schnell die Expression hoher Spiegel an bcl-x-mRNA nach mitogener Aktivierung induziert werden. Wiederum kodiert die beobachtete dominante mRNA-Spezies bcl-x_S (SEQ ID NR: 8). Dies zeigt, dass die T-Zell-Aktivierung die Expression von bcl-x_S induziert, um die Abhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren, die in ihrer lokalen Umgebung zur Verfügung gestellt werden, zu erhöhen. Die Aktivierung von peripheren T-Zellen kann sie für Apoptose empfänglich machen (Kawabe und Ochi, 1991; Webb et al., 1990), eine Beobachtung, die zuvor im Widerspruch zu der Hochregulation der bcl-2-Expression stand, die nach T-Zell-Aktivierung beobachtet wurde (Graninger et al., 1987; Reed et al., 1987). Die induzierbare Expression von bcl-x_S in diesen Populationen könnte dazu dienen, die Amplifikation von T-Zellen zu regulieren, die in eine Immunantwort verwickelt sind, indem sie höchst abhängig von kontinuierlichen exogenen Signalen, um ihre Zerstörung durch Apoptose zu verhindern, gemacht werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass die differenzielle Regulation von bcl-x während der T-Zellentwicklung und T-Zellaktivierung eine zentrale Rolle in der Regulation zweier wichtiger Formen von Apoptose spielen kann, die in der Zelle dieser Entwicklungslinie auftritt, von denen zuvor berichtet worden war, dass sie unabhängig von bcl-2 reguliert werden. Die bcl-x_S-Expression spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von sowohl dem durch die Entwicklung als auch durch Aktivierung induzierten Zelltod.

[0196] Zusätzlich gibt es einen signifikanten Unterschied in diesen Populationen, wenn diese isolierten Zellpopulationen mit der mitogenen Kombination von PMA und Ionomycin stimuliert werden. Eine sechsstündige Stimulation mit PMA und Ionomycin hatte keine Wirkung auf die bcl-x-mRNA-Expression in doppeltpositiven Thymozytenpopulationen, aber sie induzierte einen dramatischen Anstieg der bcl-x-mRNA-Expression sowohl in einfach-positiven Thymozyten als auch in T-Zellen des peripheren Blutes. Daher ist es wahrscheinlich, dass die bcl-x-mRNA in T-Zellen mit unreifen Phänotypen, die sich in dem Prozess der andauernden Selektion während der Entwicklung befinden, konstitutiv exprimiert ist. Zellen, die vollständig in Bezug auf die Entwicklung selektioniert sind, regulieren die Expression von bcl-x herunter, aber die bcl-x-Expression kann schnell durch T-Zellaktivierung induziert werden.

[0197] Von bcl-2 wurde auch berichtet, dass es durch T-Zellaktivierung induziert wird (Graninger et al., 1987; Reed et al., 1987). Die Kinetiken der bcl-x- und bcl-2-Induktion in T-Zellen des peripheren Bluts unterschieden sich dramatisch. T-Zellen des peripheren Bluts wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung mit einer mitogenen Kombination von PMA und Ionomycin isoliert (**Fig.** 10). bcl-x wurde schnell nach der Aktivierung

induzier, wobei innerhalb der ersten 6 Stunden nach Stimulation eine mit nachweisbare mRNA erschien. Danach wurde bcl-x-mRNA auf einem relativ konstanten Niveau exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde bcl-2-mRNA zuerst zwischen 6 und 12 Stunden nach Aktivierung nachgewiesen und es macht eine progressive Akkumulation über die ersten 24 Stunden in Kultur nach mitogener Aktivierung durch. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Antigen-Rezeptor-Vernetzung beobachtet. Da die zwei zum Nachweis von bcl-x und bcl-2 verwendeten Sonden von ähnlicher/m Größe und GC-Gehalt waren, waren die Erfinder in der Lage, die Unterschiede in den Steady-state-mRNA-Niveaus zwischen bcl-x und bcl-2 abzuschätzen. Es gibt ungefähr einen 50-fachen Unterschied bei der Steady-state-Akkumulation von bcl-x- und bcl-2-mRNA sogar nach 24 Stunden der Zellaktivierung. Daher tritt die bcl-x-mRNA-Akkumulation schneller und auf ein höheres Steady-state-Niveau auf, als die Induktion der bcl-2-mRNA nach T-Zellaktivierung dies tut.

BEISPIEL VII: Gewebespezifische Expression von bcl-x_L und bcl-x_S

[0198] Die gegenwärtigen Erfinder verwendeten die Polymerasekettenreaktion (PCR), um die relative Menge von bcl-x_L- und bcl-x_S-mRNAs in einer Reihe von RNA-Proben, die während der T-Zellentwicklung und -aktivierung erhalten wurden, zu quantifizieren (**Fig.** 11) (PATENT NR. 4,603,102, DURCH BEZUGNAHME HIERIN AUFGENOMMEN). PCR-Primer, die an Sequenzen binden, die von bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) und bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) geteilt werden und die die Region flankieren, die in bcl-x_S deletiert ist (Position 510 bis 698 von SEQ ID NR: 6) wurden als Primer zur mRNA-Amplifizierung nach reverser Transkription verwendet. Diese zwei Primer sind auf separaten kodierenden Exons lokalisiert und daher wird das Produkt jeder kontaminierenden genomischen DNA deutlich größer sein als die Produkte der interessierenden RNA-Spezies. Unter den Bedingungen der PCR-Reaktionen kann das relative Verhältnis der beiden bcl-x-mRNA-Spezies gemessen werden, wie dies in der Kontrollstudie, die in **Fig.** 11B dargestellt ist, gezeigt wurde. Die Erfinder bestimmten die Expression der bcl-x-mRNA-Spezies in unfraktionierten Thymozyten und in T-Zellen des peripheren Bluts, die nur in Medium oder stimuliert für 6 Stunden mit PMA und Ionomycin kultiviert wurden. Wie durch Northern-Blot-Analysen gezeigt wurde, exprimieren ruhende T-Zellen keine bcl-x-Transkripte, die durch PCR identifiziert werden können. Im Gegensatz hierzu exprimieren aktivierte T-Zellen ein einfach nachweisbares PCR-Produkt, das hauptsächlich von der bcl-x_S-Form umfasst wird. Unfraktionierte Thymozyten exprimieren auch fast ausschließlich bcl-x_S-mRNA. Diese Daten zeigen, dass sowohl aktivierte T-Zellen als auch doppelt-positive Thymozyten selektiv die Form von bcl-x exprimieren, die die Abhängigkeit der Zelle von exogenen Signalen zur Verhinderung der Apoptose erhöht. Dieser Befund ist konsistent mit sowohl der Unfähigkeit der Überexpression von bcl-2, die negative Selektion während der Entwicklung von doppelt-positiven Thymozyten zu überwinden, wie auch dem Unvermögen der bcl-2-Überexpression, die Zahl der T-Zellen während der peripheren T-Zell-Antwort signifikant zu erhöhen.

[0199] Das andere Hauptgewebe in Hühnern, das ein relativ hohes Niveau an bcl-x-Expression durch Northern-Blot-Analysen zeigte, war das zentrale Nervensystem. PCR-Analysen von adulter humaner Gehirn-mRNA zeigt ausschließlich Expression der bcl-x_L-mRNA-Spezies (**Fig.** 11A).

[0200] Folglich korreliert die Expression von bcl-x_L mit der Fähigkeit adulten neuronalen Gewebes, eine postmitotische Langzeit-Zelllebensfähigkeit zu erhalten. Daher scheint es, dass verschiedene Gewebe sowohl die Expression als auch das Spleissen von bcl-x unterschiedlich regulieren können und daher die funktionellen Eigenschaften dieses Gens anpassen, um ihre relative Sensitivität gegenüber potenziellen Mediatoren des apoptotischen Zelltods zu regulieren.

BEISPIEL VIII: Klonierung und Konstruktion von Plamiden

[0201] cDNA-Bibliotheken aus Hühnerbursa, -milz und -thymus und eine genomische Bibliothek, die aus roten Blutzellen hergestellt war, wurden mit einer murinen bcl-2 cDNA bei niedrig stringenten Bedingungen gescreent. Die Filter wurden in Starkscher Lösung (50% Formamid, 5 × SSC [1 × entspricht 0,15 M NaCl und 0,015 Natriumcitrat], 1 × Denhardtsche Lösung, 24 mM Natriumphosphat, pH 6,5, 250 mg RNA pro ml) mit 10% Dextransulfat bei 42°C über Nacht hybridisiert. Die endgültigen Waschbedingungen waren 20 Minuten bei 42°C in 0,1 × SSC. Die Inserts positiver Klone wurden in pGEM7 (Promega) subkloniert und durch ein Didesoxy-Abbruchverfahren sequenziert.

[0202] Das humane bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) wurde aus einer Thymus-cDNA-Bibliothek unter Verwendung eines BamHI/SphI-Fragments des Hühner-bcl-x mit den oben beschriebenen Hybridisierungs- und Waschbedingungen kloniert. Das Insert wurde dann aus Plaque-gereinigten Phagen durch PCR unter Verwendung von lgt11-Primern mit XbaI-Linkerstellen und pfu-Polymerase amplifiziert. Das amplifizierte 0,84 kb Fragment wurde dann in pBluescript-SK+ (Stratagene) zur Sequenzanalyse subkloniert.

[0203] Um die bcl-x_L-cDNA (SEQ ID NRN: 1 und 3) zu klonieren und um die bcl-x_S-cDNA (SEQ ID NR: 8) in eine Form, die in funktionalen Analysen verwendet werden sollte, umzuklonieren, wurden PCR-Primer entsprechend den Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3' (5'-Ende der

SEQ ID NR: 8)) und der 3' untranslatierten Region (5'-GTAGAGTGGATGGTCAGTG-3' (3'-Ende der SEQ ID NR: 8)) der bcl-x_S-cDNA synthetisiert. Die Primer enthielten EcoRI-Linker zum Subklonieren und wurden verwendet, um Klone aus cDNA-Bibliotheken zu amplifizieren, die aus humanen T-Zellen, der T-Zelllinie Jurkat und humanem Gehirn hergestellt waren. Der Phage (10^7 pfu) wurde 5 Minuten in 25 ml Wasser vor den PCR-Reaktionen (1,25 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 56°C, 3 Minuten bei 72°C × 35 Zyklus) gekocht. Banden geeigneter Größe (0,8 kb für bcl-x_L und 0,6 kb für bcl-x_S), die mit der bcl-x_S-cDNA (SEQ ID NR: 8) hybridisieren konnten, wurden in die EcoRI-Schnittstelle von pBluescript-SK+ zur Sequenzanalyse und Herstellung von Invitro-Transkriptions- und Translationsprodukten subkloniert. Zur Transfektion und anschließenden funktionalen Tests wurden die bcl-x_L- (SEQ ID NR: 6) und bcl-x_S- (SEQ ID NR: 8) -Inserts aus pBluescript-SK+ ausgeschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle von pSFFV-Neo subkloniert (Neo; Fuhlbrigge et al., 1988). Die Orientierung der Inserts wurde durch Restriktionsenzymmapping bestimmt und Plasmide mit Inserts in der richtigen Orientierung wurden als pSFFV-Neo-bcl-x_L (bcl-x_L) und pSFFV-Neo-bcl-x_S (bcl-x_S) bezeichnet, wohingegen Plasmide mit Inserts in der umgekehrten Orientierung pSFFV-Neo-bcl-$x_L$rev (bcl-$x_L$rev) und pSFFV-Neo-bcl-$x_S$rev (bcl-$x_S$rev) genannt wurden.

[0204] Sequenzvergleiche und Peptidanalysen wurden mit den „University of Wisconsin Genetics Computer Group"-Programmen FASTA, TFASTA, PILEUP, PEPTIDESTRUCTURE und GAP durchgeführt. Die Nukleotidsequenzen von Huhn-bcl-x (SEQ ID NRN: 1 und 3), humanem bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) und humanem bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) wurden an die GenBank-Datenbank geschickt.

Beispiel IX: Southern-Blot-Analyse

[0205] Genomische DNA aus Huhn, Maus und humanen Lymphoidzellen wurde durch Standardverfahren, wie zuvor beschrieben (Thompson und Neiman, 1987), isoliert. Die DNA wurde quantifiziert und 10 mg wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen über Nacht verdaut. Die verdaute DNA wurde über ein 1% Agarosegel getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Blots wurden wie oben beschrieben entweder mit einem SphI/BamHI-Fragment des Huhn-bcl-x (SEQ ID NRN: 1 und 3) oder einem HindIII/BamHI-Fragment aus dem ersten kodierenden Exon des Maus-bcl-2 hybridisiert. Die Waschbedingungen waren wie oben angegeben.

BEISPIEL X: Zellisolation und RNA-Analyse

[0206] Für die Northern-Blots mit Huhngewebe wurden frisch geschlüpfte Küken getötet und die RNA aus den angegebenen Geweben durch ein Guanidiniumisothiocyanat-Verfahren, gefolgt von Zentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten, wie zuvor beschrieben (Thompson et al., 1986), isoliert. Die RNA wurde hinsichtlich der 28S ribosomalen RNA ausgeglichen, auf Agarose/Formaldehydgelen getrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Die Blots wurden mit dem SphI/BamHI-Huhn-bcl-x-Fragment sondiert. Die Blots wurden dann durch Kochen getrennt und mit der HindIII/BamHI-Maus-bcl-2-Sonde hybridisiert.

[0207] Humane T-Zellen wurden aus gesunden Spendern durch Leukophorese mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation isoliert. CD28-positive T-Zellen wurden mittels eines immunmagnetischen Verfahren negativ selektiert (June et al., 1987). Die RNA wurde dann aus den T-Zellen isoliert, die entweder ruhend waren oder mit Phorbolmyristatacetat (PMA; 10 ng/ml) und Ionomycin (0,8 mg/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert wurden. Die RNA wurde ausgeglichen und durch Agarose/Formaldehyd-denaturierende Gele einer Elektrophorese unterzogen und die Gele wurden dann wie oben beschrieben geblottet. Duplikatblots wurden mit der humanen bcl-x_S-cDNA oder dem Maus-bcl-2-Exon-II-Fragment und einer humanen HLA-Klasse-I-cDNA sondiert. Die endgültigen Waschbedingungen waren 0,1 × SSC, 0,1% SDS für 20 Minuten bei 56°C.

[0208] Humane Thymozyten wurden aus chirurgischen Pathologieproben aus Kindern von einem Alter unter drei, die einen chirurgischen Cardiothorax-Eingriff hatten, isoliert. Das Thymusgewebe wurde durch ein Nylonnetz passiert, um eine Einzellsuspension zu erhalten, gefolgt von einer Trennung der mononuklearen Zellen auf einem Ficoll-Hypaque-Kissen. Die RNA wurde dann aus entweder den ruhenden oder mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen extrahiert und einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Um zu bestimmen, ob die bcl-x-Expression während der Thymozytenentwicklung reguliert wird, wurden die Thymozyten in reife („einfach positive" Zellen) und unreife („doppelt positive") Subpopulationen vor der Stimulation und RNA-Extraktion, wie zuvor beschrieben (Turka et al., 1991), getrennt. Die Thymozytenfraktionierung wurde durch negative immunmagnetische Selektion durchgeführt. Die unreifen Thymozyten wurden durch Entfernen der Zellen, die hohe Spiegel an CD28 exprimierten, hergestellt, wohingegen reife Thymozyten durch Entfernen von CD1+-Zellen ausgewählt wurden. Der Expressionsstatus der resultierenden Zellen für CD4 und CD8 bestätigte, dass mehr als 90% der unreifen Population CD4 und CD8 exprimierten, wohingegen mehr als 95% der reifen Population einfach-positive Zellen waren.

[0209] Um zu bestimmen, welche Form der bcl-x-mRNA exprimiert wurde, wurde 1 mg der gesamten Zell-RNA oder 0,1 mg von polyA+ RNA aus den verschiedenen Quellen mit AMV-reverser Transkriptase für 1 Stunde bei 42°C revers transkribiert. Zwanzig Prozent des cDNA-Produkts wurde dann einer PCR unter Ver-

wendung der oben beschriebenen 5'- und 3'-Primer und Amplifikationsbedingungen unterzogen. Da beide Primer jeweils auf getrennten kodierenden Exons lokalisiert sind, wird das Amplifikationsprodukt der kontaminierenden genomischen DNA viel größer sein als das Produkt einer der beiden RNA-Spezies, bcl-x_L und bcl-x_S. Um sicherzustellen, dass die PCR-Bedingungen nicht eine der Formen der cDNA bevorzugten, wurden die nebeneinander laufenden PCR-Reaktionen mit Plasmiden durchgeführt, die entweder bcl-x_L oder bcl-x_S alleine oder gemischt in verschiedenen Verhältnissen enthielten.

BEISPIEL XI: Zelltransfektion und funktionelle Studien

[0210] Murine FL5.12-Zellen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert (Hockenbery et al., 1990; Nuñez et al., 1990). Die Zellen wurden durch Elektroporation (200 V, 960 mF) mit dem pSFFV-Neo-Plasmid transfiziert, das entweder bcl-2a (bcl-2), bcl-x_L in beiden transkriptionalen Orientierungen (bcl-x_L und bcl-$x_L$rev) und bcl-x_S in beiden transkriptionalen Orientierungen (bcl-x_S und bcl-$x_S$rev) enthielt. Als eine Kontrolle wurden auch Transfektionen mit dem pSFFV-Neo-Plasmid ohne ein Insert (Neo) durchgeführt. Die Transfektanten wurden auf ihre Annahme der Neomycinresistenz durch Wachstum in Gegenwart von G418 (1 mg/ml) selektioniert. Die Haupttransfektanten und Einzelzellklone (hergestellt durch begrenzende Verdünnung) wurden durch Wachstum in Medium erhalten, das mit IL-3 wie zuvor beschrieben supplementiert war (Nuñez et al., 1990). Um das Zellüberleben zu beurteilen, wurden die Zellen zuerst mit 2×10^5/ml in Gegenwart einer optimalen Konzentration an Wachstumsfaktor für 20–24 Stunden wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann mit RPMI 1640-Medium drei Mal gewaschen, um alles rückständige IL-3 zu entfernen, und mit 10^5 Zellen pro Vertiefung in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in Medium, das mit 10% fötalem Kälberserum supplementiert war, ausplattiert. Das Zellüberleben wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Um zu bestätigen, dass der Zelltod durch Apoptose verursacht war, wurden transfizierte Zellen (2×10^6) 0, 8, 24 und 48 Stunden nach Wachstumsfaktorentzug isoliert und in 1,0% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA und 200 mg/ml Proteinase K für 2 Stunden bei 50°C lysiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit RNase A (20 mg/ml) für 2 Stunden bei 37°C behandelt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde dann auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

[0211] Ein BCL-2-spezifischer Antikörper kreuzreagierte nicht mit BCL-X. Die Zellen wurden gewaschen und mit 1% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, dann mit dem 6C8 monoklonalen Antikörper gefärbt, einem monoklonalen Hamster-Antikörper, der spezifisch für humanes bcl-2 ist (Hockenbery et al., 1990) oder einer Isotyp-angepassten Hamster-Antikörperkontrolle in 0,3% Saponin in PBS für 30 Minuten bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden in 0,03% Saponin/PBS gewaschen und mit biotinyliertem F(ab')2-Ziegen-Anti-Hamster-IgG für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden in 0,03% Saponin/PBS gewaschen und mit RED 670-Streptavidin inkubiert und durch Flusszytometrie analysiert. Die Analyse von bcl-x_L- und bcl-x_S-transfizierten Zellen zeigte, dass der bcl-2-spezifische Antikörper mit dem BCL-X, das in diesen Zellen exprimiert wurde, nicht kreuzreagierte. Die bcl-x-Expression wurde durch Northern-Blot-Analyse bestätigt, wobei die b-Aktin-Expression als eine Beladungskontrolle verwendet wurde.

BEISPIEL XII: In-vitro-Transkription und -Translation von bcl-x

[0212] pBluescript-SK+-Plasmide enthaltend bcl-x_L (SEQ ID NR: 6) und bcl-x_S (SEQ ID NR: 8) wurden an der 3'-multiplen Klonierungsstelle jeweils mit XbaI bzw. BamHI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase für 1 Stunde bei 37°C transkribiert. bcl-x_L wurde auch an der 5'-multiplen Klonierungsstelle mit XhoI linearisiert und mit T3-Polymerase als eine Antisense-Kontrolle transkribiert. Die resultierenden „Run-off"-Transkripte (bcl-x_L, bcl-x_S und bcl-x_S-as) wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die In-vitro-Translation wurde dann mit einem Kaninchen-Reticulozytenlysat-Kit (Promega) in Gegenwart von ^{35}S-Methionin für 1 Stunde bei 30°C durchgeführt. Fünf ml Lysat wurde zu dem SDS-Ladungspuffer zugegeben und einer SDS-PAGE (15% Gel) unterzogen. Die Gele wurden getrocknet und einem Röntgenfilm ausgesetzt.

[0213] Da erwartet wird, dass in der Praxis der vorliegenden Erfindung für den Fachmann eine Vielzahl von Modifiktionen und Variationen auftreten werden, sollten nur solche Beschränkungen hierauf angewendet werden, die in den beiliegenden Ansprüchen auftreten.

LITERATURZITATE

[0214] Die unten aufgeführten Literaturstellen wie auch die in der Beschreibung zitierten Literaturstellen werden hierin durch Bezugnahme in dem Maß aufgenommen, in dem sie die Methodologie, Techniken und/oder Zusammensetzungen, die hierin eingesetzt werden, ergänzen, erklären, einen Hintergrund dafür bereitstellen oder sie lehren.

[0215] Adelman et al. (1983) DNA 2: 183.

[0216] Allsopp et al. (1993) Cell 73: 295.

[0217] Bakhshi et al. (1985) Cell 41: 899.
[0218] Blackman et al. (1990) Science 248: 1335.
[0219] Bolivar et al. (1977) Gene, 2: 95.
[0220] Borzillo et al. (1992) Oncogene 7: 869.
[0221] Boshart et al. (1985) Cell 41: 521.
[0222] Cazals-Hatem et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1132: 109.
[0223] Chang et al. (1978) Nature, 375: 615.
[0224] Chen-Levy, Z. and Cleary, M. L. (1990) J. Biol. Chem 265: 4929.
[0225] Chen-Levy et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 701.
[0226] Cleary et al. (1986) Cell 47: 19.
[0227] Cooper et al. (1991) Adv. Immunol. 50: 87.
[0228] Cowan et al. (1984) Science 225: 1258.
[0229] Crea et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 75: 5765.
[0230] Cuende et al. (1993) EMBO J. 12: 1555.
[0231] Davies, A. M. (1987) Development 101: 185.
[0232] Eguchi et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 4187.
[0233] Ellis et al. (1991) Annu. Rev. Cell Biol. 7: 663.
[0234] Ferruti, P. und Tanzi, M. C., (1986) Cris. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2: 117–136.
[0235] Fiers et al. (1978) Nature 273: 113.
[0236] Fuhlbrigge et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5649.
[0237] Gabizon, A. et al. (1990) Cancer Res. 50: 6371–6378
[0238] Garcia et al. (1992) Science 258: 302.
[0239] Goeddel et al. (1979) Nature, 281: 544.
[0240] Goeddel et al. (1980) Nucleic Acids Res., 8: 4057.
[0241] Graninger et al. (1987) J. Clin. Invest. 80: 1512.
[0242] Hess et al. (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149.
[0243] Hitzeman et al. (1980) J. Biol. Chem. 255: 2073.
[0244] Hockenbery et al. (1990) Nature 348: 334.
[0245] Holland et al. (1978) Biochemistry 17: 4900.
[0246] Itakura et al. (1977) Science, 198: 1056.
[0247] Jones (1977) Genetics 85: 12.
[0248] June et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 4472.
[0249] Kawabe, Y. and Ochi, A. (1991) Nature 349: 245.
[0250] Kerr et al. (1972) Br. J. Cancer 26: 239.
[0251] Kingsman et al. (1979) Gene 7: 141.
[0252] Kruse und Patterson, Herg. (1973) Tissue Culture, Academic Press.
[0253] Kyte, J., und R. F. Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105.
[0254] Messing et al. Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Herausgeber A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981).
[0255] McDonnell et al. (1989) Cell 57: 79.
[0256] Murphy et al. (1990) Science 250: 1720.
[0257] Negrini et al. (1987) Cell 49: 455.
[0258] Neiman et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5857.
[0259] Nunez et al. (1990) J. Immunol. 144: 3602.
[0260] Okayam et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3: 280.
[0261] Oppenheim, R. W. (1991) Annu. Rev. Neurosci. 14: 453.
[0262] Raff, M. C. (1992) Nature 356: 397.
[0263] Ranade, V. V. (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685–694
[0264] Reed et al. (1987) Science 236: 1295.
[0265] Rothenberg, E. V. (1992) Adv. Immunol. 51: 85.
[0266] Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.).
[0267] Seeburg (1982) DNA 1: 239.
[0268] Sentman et al. (1991) Cell 67: 879.
[0269] Siebwenlist et al., (1980) Cell, 20: 269.
[0270] Siegel, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7003.
[0271] Stinchcomb et al. (1979) Nature, 282: 39.
[0272] Stratford-Perricaudet et al. (1992).
[0273] Strasser et al. (1991a) Cell 67: 889.
[0274] Strasser et al. (1991b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8661.

[0275] Thompson et al. (1986) Nature 319: 374.
[0276] Thompson, C. B. and Neiman, P. E. (1987) Cell 48: 369.
[0277] Thomsen et al. (1984) PNAS 81: 659.
[0278] Tschemper et al. (1980) Gene 10: 157.
[0279] Tsujimoto, Y. and Croce, C. M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5214.
[0280] Turka et al. (1991) J. Immunol. 146: 1428.
[0281] Vaux et al. (1988) Nature 335: 440.
[0282] Webb et al. (1990) Cell 63: 1249.
[0283] Williams, G. T. (1991) Cell 65: 1097.
[0284] Wyllie et al. (1980) Int. Rev. Cytol. 68: 251.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: ARCH DEVELOPMENT CORPORATION
(B) STRASSE: 1101 East 58th Street
(C) STADT: Chicago
(D) BUNDESSTAAT: Illinois
(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika
(F) POSTLEITZAHL (PLZ): 60637

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Vertebraten-Apoptosegen: Zusammensetzungen und Verfahren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Arnold, White & Durkee
(B) STRASSE: P.O. Box 4433
(C) STADT: Houston
(D) BUNDESSTAAT: TX
(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika
(F) PLZ: 77210

(v) MASCHINENLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS, ASCII

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN PATENTANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: UNBEKANNT
(B) ANMELDETAG: GLEICHZEITIG EINGEREICHT
(C) KLASSIFIZIERUNG: UNBEKANNT

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: 08/081.448
(B) ANMELDETAG: 22. JUNI 1993

(viii) ANGABEN ZUM ANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: PARKER, David L.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32.165
(C) REFERENZ-/LISTENNUMMER: ARCD090

(ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFON: 512-320-7200
(B) TELEFAX: 713-789-2679

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1274 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 179..751

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GGCGCCAGCA AGCTGTCGTG TTAACCGTTT CCTTGCCTCT CTTTTCCTCT CTGCCTGTCT      60

GTGCAAAGGT CGGATGTGTT CGCCGGTCAC GAGGGAGCGT GGAGCCAGGA GCTGCTAAGT     120

GTGCTCATCT GCTCGTGCAC TGGACCATGG ACTCATTGAG GGCGTCTCAG GTGTGAAA       178

ATG TCC AGC AGT AAC CGG GAG TTA GTG ATT GAC TTT GTT TCC TAC AAG        226
Met Ser Ser Ser Asn Arg Glu Leu Val Ile Asp Phe Val Ser Tyr Lys
  1               5                  10                  15

CTC TCG CAG AGG GGG CAC TGC TGG AGC GAG CTG GAG GAA GAG GAT GAG       274
Leu Ser Gln Arg Gly His Cys Trp Ser Glu Leu Glu Glu Glu Asp Glu
            20                  25                  30

AAC AGG ACT GAC ACT GCA GCT GAG GCA GAG ATG GAC AGC GTC CTC AAT       322
Asn Arg Thr Asp Thr Ala Ala Glu Ala Glu Met Asp Ser Val Leu Asn
        35                  40                  45

GGG AGC CCA TCC TGG CAC CCC CCT GCC GGC CAC GTA GTG AAC GGA GCC       370
Gly Ser Pro Ser Trp His Pro Pro Ala Gly His Val Val Asn Gly Ala
    50                  55                  60
```


DE 694 33 240 T2 2004.07.15

```
ACC GTG CAC CGG AGC AGC CTG GAA GTT CAT GAA ATT GTT CGA GCA TCC      418
Thr Val His Arg Ser Ser Leu Glu Val His Glu Ile Val Arg Ala Ser
 65                  70                  75                  80

GAC GTG AGG CAG GCG CTG AGA GAT GCG GGG GAT GAG TTT GAG CTG AGG      466
Asp Val Arg Gln Ala Leu Arg Asp Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
                 85                  90                  95

TAC CGG AGG GCT TTC AGC GAC CTC ACC TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCT      514
Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro
            100                 105                 110

GGC ACG GCG TAC CAG AGC TTT GAG CAG GTA GTG AAT GAA CTC TTC CAT      562
Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe His
        115                 120                 125

GAT GGT GTG AAC TGG GGG CGC ATC GTG GCT TTC TTC TCC TTC GGA GGG      610
Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly
    130                 135                 140

GCT TTG TGC GTG GAG AGC GTG GAC AAG GAG ATG CGG GTA CTG GTG GGA      658
Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Arg Val Leu Val Gly
145                 150                 155                 160

CGC ATT GTG TCT TGG ATG ACC ACG TAC TTG ACC GAC CAT CTA GAT CCC      706
Arg Ile Val Ser Trp Met Thr Thr Tyr Leu Thr Asp His Leu Asp Pro
                165                 170                 175

TGG ATC CAG GAG AAT GGC GGC TGG GTA AGA ACT GCT CTC CCA TAGGGATGGC   758
Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Val Arg Thr Ala Leu Pro
            180                 185                 190

TCCCTGCATC CTAGCTCAAG GCCAGCGGCG GTGCTGGCCA GATCAAGCAG CCTTCAGTGA   818
```

TTGTGCTTGT GCTTGGTCTA CACCTTGCAG GGCAATAAAT TGGTACGTGG CCCTTCCCTC 878

TTCATTCTTA ATGCTCTGCT GCAAGAGGGT CAGTCCACTG TGTTGAAACA AAGAGTTAAC 938

ATTCTGATTT GTCCTCCTGC ATCCCTTTTT CTCCTCCTTC TCCCTGGCTG TTACATAAGA 998

GACCCATTTT CCGAGAGCCT GTGGAAATGT AATGTCATCC AAGCTTGTTC TTCAAATGGG 1058

AGCCCTTGCT CTTGGGCATG TTCCTCATGT CATTTAACAG CAGGGAGTGG AGCTTCCTCC 1118

CCTCCGTGCT CAGCAGTGTT CCAGCCTGGC CCTGTGATCT GGTGGGGTAA CAGCTACTTC 1178

TTCATTCTGG AGATGGGACG ATGTCTGCCG CTGCCATCGC GTGGAGTGAA TCCTGCAGCA 1238

GCTCTCTGTG GGTAGGGCTG CTGGGACGCA TCACAG 1274

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 190 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Ser Ser Asn Arg Glu Leu Val Ile Asp Phe Val Ser Tyr Lys
1 5 10 15

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

Asn Arg Thr Asp Thr Ala Ala Glu Ala Glu Met Asp Ser Val Leu Asn
35 40 45

Gly Ser Pro Ser Trp His Pro Pro Ala Gly His Val Val Asn Gly Ala
50 55 60

Thr Val His Arg Ser Ser Leu Glu Val His Glu Ile Val Arg Ala Ser
65 70 75 80

Asp Val Arg Gln Ala Leu Arg Asp Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
85 90 95

Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro
100 105 110

Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe His
115 120 125

Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly
130 135 140

Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Arg Val Leu Val Gly
145 150 155 160

Arg Ile Val Ser Trp Met Thr Thr Tyr Leu Thr Asp His Leu Asp Pro
165 170 175

Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Val Arg Thr Ala Leu Pro
180 185 190

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGAGCGGTGC ACCCAGCGCG CAGGAATTC 29

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 63 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val
1 5 10 15

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

Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr
35 40 45

Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
50 55 60

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 205 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
1 5 10 15

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

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
35 40 45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
50 55 60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala
85 90 95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe
100 105 110

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

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
180 185 190

Gly Gly Trp Val Gly Ala Ser Gly Asp Val Ser Leu Gly
195 200 205

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 926 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(C) LAGE: 135..836

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```
GAATCTCTTT CTCTCCCTTC AGAATCTTAT CTTGGCTTTG GATCTTAGAA GAGAATCACT    60

AACCAGAGAC GAGACTCAGT GAGTGAGCAG GTGTTTTGGA CAATGGACTG GTTGAGCCCA   120

TCCCTATTAT AAAA ATG TCT CAG AGC AAC CGG GAG CTG GTG GTT GAC TTT      170
                Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe
                  1               5                  10

CTC TCC TAC AAG CTT TCC CAG AAA GGA TAC AGC TGG AGT CAG TTT AGT      218
Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser
            15                  20                  25

GAT GTG GAA GAG AAC AGG ACT GAG GCC CCA GAA GGG ACT GAA TCG GAG      266
Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu
        30                  35                  40

ATG GAG ACC CCC AGT GCC ATC AAT GGC AAC CCA TCC TGG CAC CTG GCA      314
Met Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala
    45                  50                  55                  60

GAC AGC CCC GCG GTG AAT GGA GCC ACT GGC CAC AGC AGC AGT TTG GAT      362
Asp Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp
                65                  70                  75

GCC CGG GAG GTG ATC CCC ATG GCA GCA GTA AAG CAA GCG CTG AGG GAG      410
Ala Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu
            80                  85                  90

GCA GGC GAC GAG TTT GAA CTG CGG TAC CGG CGG GCA TTC AGT GAC CTG      458
Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu
        95                  100                 105

ACA TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCA GGG ACA GCA TAT CAG AGC TTT GAA      506
Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu
```

```
110                 115                 120

CAG GTA GTG AAT GAA CTC TTC CGG GAT GGG GTA AAC TGG GGT CGC ATT      554
Gln Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile
125                 130                 135                 140

GTG GCC TTT TTC TCC TTC GGC GGG GCA CTG TGC GTG GAA AGC GTA GAC      602
Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp
                145                 150                 155

AAG GAG ATG CAG GTA TTG GTG AGT CGG ATC GCA GCT TGG ATG GCC ACT      650
Lys Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr
            160                 165                 170

TAC CTG AAT GAC CAC CTA GAG CCT TGG ATC CAG GAG AAC GGC GGC TGG      698
Tyr Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
        175                 180                 185

GAT ACT TTT GTG GAA CTC TAT GGG AAC AAT GCA GCA GCC GAG AGC CGA      746
Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg
    190                 195                 200

AAG GGC CAG GAA CGC TTC AAC CGC TGG TTC CTG ACG GGC ATG ACT GTG      794
Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val
205                 210                 215                 220

GCC GGC GTG GTT CTG CTG GGC TCA CTC TTC AGT CGG AAA TGACCAGACA       843
Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
                225                 230

CTGACCATCC ACTCTACCCT CCCACCCCCT TCTCTGCTCC ACCACATCCT CCGTCCAGCC    903

GCCATTGCCA CCAGGAGAAC CCG                                           926
```

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 233 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
20 25 30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
50 55 60

Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
65 70 75 80

Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
85 90 95

Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
100 105 110

His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn
115 120 125

DE 694 33 240 T2 2004.07.15

Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
130 135 140

Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
145 150 155 160

Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
165 170 175

His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
180 185 190

Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
195 200 205

Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
210 215 220

Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225 230

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 737 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 135.. 647

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```
GAATCTCTTT CTCTCCCTTC AGAATCTTAT CTTGGCTTTG GATCTTAGAA GAGAATCACT      60

AACCAGAGAC GAGACTCAGT GAGTGAGCAG GTGTTTTGGA CAATGGACTG GTTGAGCCCA     120

TCCCTATTAT AAAA ATG TCT CAG AGC AAC CGG GAG CTG GTG GTT GAC TTT        170
                Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe
                  1               5                  10

CTC TCC TAC AAG CTT TCC CAG AAA GGA TAC AGC TGG AGT CAG TTT AGT        218
Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser
        15                  20                  25

GAT GTG GAA GAG AAC AGG ACT GAG GCC CCA GAA GGG ACT GAA TCG GAG        266
Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu
    30                  35                  40

ATG GAG ACC CCC AGT GCC ATC AAT GGC AAC CCA TCC TGG CAC CTG GCA        314
Met Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala
45                  50                  55                  60

GAC AGC CCC GCG GTG AAT GGA GCC ACT GGC CAC AGC AGC AGT TTG GAT        362
Asp Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp
                65                  70                  75

GCC CGG GAG GTG ATC CCC ATG GCA GCA GTA AAG CAA GCG CTG AGG GAG        410
Ala Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu
            80                  85                  90

GCA GGC GAC GAG TTT GAA CTG CGG TAC CGG CGG GCA TTC AGT GAC CTG        458
Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu
```

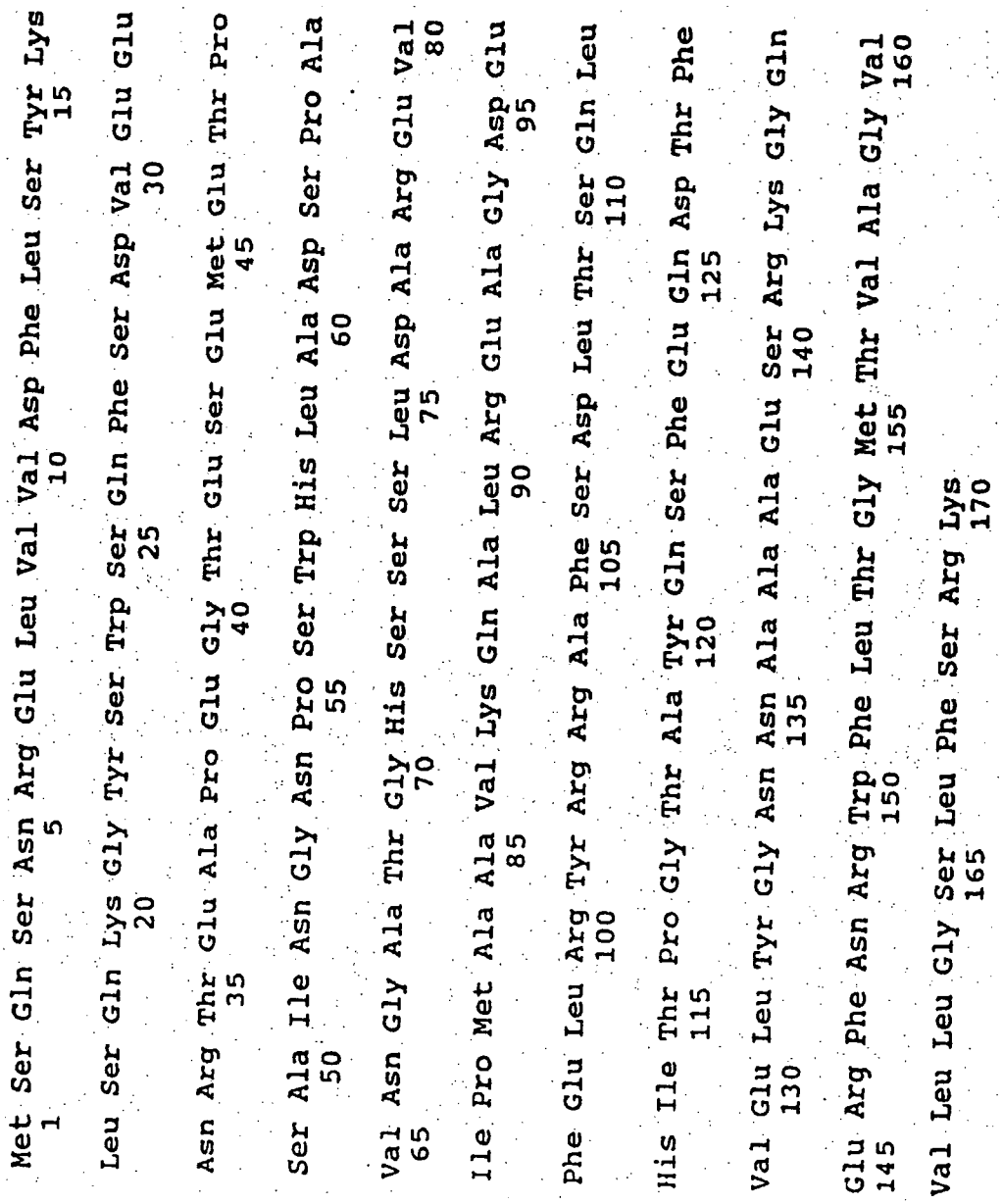
```
                95                  100                 105

ACA TCC CAG CTC CAC ATC ACC CCA GGG ACA GCA TAT CAG AGC TTT GAA      506
Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu
    110                 115                 120

CAG GAT ACT TTT GTG GAA CTC TAT GGG AAC AAT GCA GCA GCC GAG AGC      554
Gln Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser
125                 130                 135                 140

CGA AAG GGC CAG GAA CGC TTC AAC CGC TGG TTC CTG ACG GGC ATG ACT      602
Arg Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr
                145                 150                 155

GTG GCC GGC GTG GTT CTG CTG GGC TCA CTC TTC AGT CGG AAA TGACCAGACA   654
Val Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
            160                 165                 170

CTGACCATCC ACTCTACCCT CCCACCCCCT TCTCTGCTCC ACCACATCCT CCGTCCAGCC    714

GCCATTGCCA CCAGGAGAAC CCG                                            737
```

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 170 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:



Patentansprüche

1. Isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, das BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) kodiert.

2. Isoliertes und gereinigtes Polynukleotid nach Anspruch 1, wobei das Polynukleotid ein DNA-Molekül ist.

3. Isoliertes und gereinigtes Polynukleotid nach Anspruch 1, wobei das Polynukleotid die Nukleotidbasensequenz von SEQ ID NR. 1 und 3, 6 oder 8 umfasst.

4. Isoliertes und gereinigtes Polynukleotid, das eine Basensequenz umfasst, die identisch oder komplementär ist zu einem Segment von mindestens 14 zusammenhängenden Basen der SEQ ID NR. 1 und 3, SEQ ID NR. 6 oder SEQ ID NR. 8.

5. Polynukleotid nach Anspruch 4, umfassend eine Basensequenz, die identisch oder komplementär ist zu einem Segment von mindestens 17, vorzugsweise mindestens 25 zusammenhängenden Basen der SEQ ID NR. 1 und 3, SEQ ID NR. 6 oder SEQ ID NR. 8.

6. Isoliertes und gereinigtes Polypeptid, das den programmierten Wirbeltierzelltod fördert oder hemmt, wobei das Polypeptid BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) ist.

7. Expressionsvektor umfassend ein Polynukleotid, das BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) kodiert.

8. Expressionsvektor nach Anspruch 7, wobei das Polynukleotid funktionsfähig mit einem Enhancer-Promoter verknüpft ist.

9. Rekombinante Wirtszelle, die mit einem Polynukleotid transfiziert ist, das BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) kodiert.

10. Rekombinante Wirtszelle nach Anspruch 9, wobei das Polynukleotid unter der transkriptionalen Kontrolle von regulatorischen Signalen steht, die in der rekombinanten Wirtszelle funktional sind, wobei die regulatorischen Signale in geeigneter Weise die Expression des Polypeptids in einer Weise kontrollieren, um alle nötige transkriptionale und post-transkriptionale Modifikation zu ermöglichen.

11. Ein Verfahren zum Herstellen von BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4), umfassend:
(a) Transfizieren einer Zelle mit einem Polynukleotid, das das Polypeptid kodiert, um eine transformierte Wirtszelle herzustellen; und
(b) Halten der transformierten Wirtszelle unter biologischen Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids ausreichen.

12. Antikörper, der mit BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) immunreaktiv ist.

13. Verfahren zum Nachweisen eines Polypeptids, das nicht BCL-2 (SEQ ID NR. 5) ist, das den programmierten Wirbeltierzelltod fördert oder hemmt, wobei das Verfahren Immunreagieren des Polypeptids mit dem Antikörper nach Anspruch 12 unter Bildung eines Antikörper-Polypeptid-Konjugats und Nachweisen des Konjugats umfasst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Polypeptid BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) ist.

15. Verfahren zum Nachweisen eines Messenger-RNA-Transkripts, das BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) kodiert, wobei das Verfahren Hybridisieren des Messenger-RNA-Transkripts mit einer Polynukleotidsequenz, die das Polypeptid kodiert unter Bildung eines Duplexes und Nachweisen des Duplexes, umfasst.

16. Verfahren zum Rasteruntersuchen einer Substanz auf ihre Fähigkeit, den programmierten Zelltod zu verändern, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
(a) Bereitstellen einer Zelle, die mit einem Polynukleotid, das die Nukleotidbasensequenz von BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) umfasst, und Halten der Zelle unter biologischen Bedingungen, die ausreichend sind für die Expression von BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4);
(b) Testen der Fähigkeit der Substanz, den programmierten Zelltod zu verändern.

17. Ex-vivo-Verfahren zur Verändern des programmierten Zelltods in einer Zelle umfassend
(a) Liefern einer wirksamen Menge eines DNA-Moleküls umfassend ein Polynukleotid, das BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) kodiert, zu der Zelle; und
(b) Halten der Zelle unter Bedingungen, die für die Expression von BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) ausreicht.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Liefern Injizieren des DNA-Moleküls in die Zelle ist.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Zelle eine Nervenzelle ist.

20. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Zelle ein Lymphozyt ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Lymphozyt eine CD4-Zelle ist.

22. Verfahren nach Anspruch 19, weiterhin umfassend Einführen des Vektors in Nervenzellen in Kultur, die

Zelltod durch Inkubation des Vektors mit den Nervenzellen wahrscheinlich erleiden oder erleiden.

23. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verwendung in einem Verfahren zum Verändern des programmierten Zelltods.

24. Polypeptid nach Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zur Prävention oder zum Behandeln programmierten Zelltods in Nervenzellen oder in Lymphozyten.

25. Gen kodierend das Polypeptid nach Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zum Liefern des Gens zur Gentherapie.

26. Expressionsvektor nach Anspruch 7 oder 8 zur Verwendung in einem Verfahren zum Behandeln tumorerzeugender Krankheiten.

27. BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) zur Verwendung in einem Verfahren zum Verhindern oder Behandeln programmierten Zelltods in Nervenzellen oder Lymphozyten.

28. Verwendung von BCL-X_L (SEQ ID NR. 7), BCL-X_S (SEQ ID NR. 9) oder BCL-X_1 (SEQ ID NR. 4) zur Herstellung eines Medikamentes zum Verhindern oder Behandeln programmierten Zelltods in Nervenzellen oder Lymphozyten.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

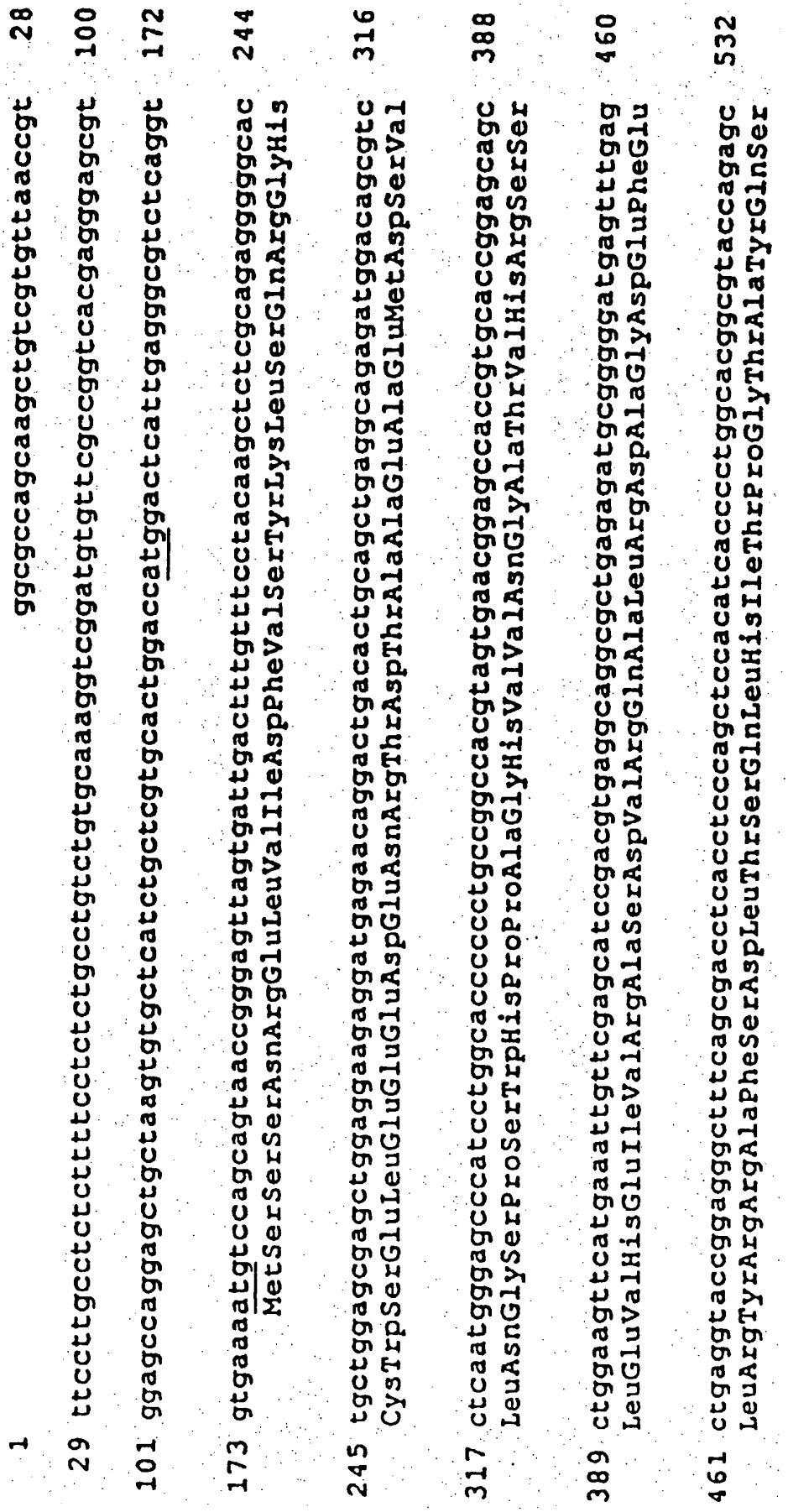

1 ggcgccagcaagctgtcgtgttaaccgt 28
29 ttccttgcctcctctttcctctgcctgtctgtgcaaaggtcggatgtgttcgccggtcacgagggagcgt 100
101 ggagccaggagctgctaagtgtgctcatctgctcgtgcactggaccatggactcattgagggcgtctcaggt 172
173 gtgaaaatgtccagcagtaaccgggagttagtgattgacttttgtttcctacaagctctcgcagaggggcac 244
MetSerSerAsnArgGluLeuValIleAspPheValSerTyrLysLeuSerGlnArgGlyHis
245 tgctggagcgagctggaggaagaggatgagaacaggactgacactgcagctgaggcagagatggacagcgtc 316
CysTrpSerGluLeuGluGluGluAspGluAsnArgThrAspThrAlaAlaGluAlaGluMetAspSerVal
317 ctcaatgggagcccatccctggcaccccccctgccggccacgtagtgaacggagccaccgtgcaccggagcagc 388
LeuAsnGlySerProSerTrpHisProProAlaGlyHisValValAsnGlyAlaThrValHisArgSerSer
389 ctggaagttcatgaaattgttcgagcatccgacgtgaggcaggcgctgagagatgcgggggatgagtttgtag 460
LeuGluValHisGluIleValArgAlaSerAspValArgGlnAlaLeuArgAspAlaGlyAspGluPheGlu
461 ctgaggtaccggagggctttcagcgacctcacctcccagctcccacatcacccctgggcacggcgtaccagagc 532
LeuArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSer

FIG. 1A-1

```
533 tttgagcaggtagtgaatgaactcttccatgatggtgtgaactgggggcgcatcgtggctttcttctccttc  604
    PheGluGlnValValAsnGluLeuPheHisAspGlyValAsnTrpGlyArgIleValAlaPhePheSerPhe
                                        ↓
605 ggaggggctttgtgcgtggagagcgtggacaaggagatgcgggtactggtgggacgcattgtgtcttggatg  676
    GlyGlyAlaLeuCysValGluSerValAspLysGluMetArgValLeuValGlyArgIleValSerTrpMet

677 accacgtacttgaccgaccatctagatccctggatccaggagaatggcggctgggtaagaactgctctccca  748
    ThrThrTyrLeuThrAspHisLeuAspProTrpIleGlnGluAsnGlyGlyTrpValArgThrAlaLeuPro

749 tagggatggctccctgcatcctagctcaaggccagcggcggtgctggccagatcaagcagccttcagtgatt  820

821 gtgcttgtgcttggtctacaccttgcagggcaataaattggtacgtggcccttccctcttcattcttaatgc  892

893 tctgctgcaagagggtcagtccactgtgttgaaacaaagagttaacattctgatttgtcctcctgcatccct  964

965 ttttctcctccttctccctggctgttacataagagacccattttccgagagcctgtggaaatgtaatgtcat 1036

1037 ccaagcttgttcttcaaatgggagcccttgctcttgggcatgttcctcatgtcatttaacagcagggagtgg 1108

1109 agcttcctcccctccgtgctcagcagtgttccagcctggccctgtgatctggtggggtaacagctacttctt 1180

1181 cattctggagatgggacgatgtctgccgctgccatcgcgtggagtgaatcctgcagcagctctctgtgggta 1252

1253 gggctgctgggacgcatcacag/.../ggagcggtgcacccagcgcgcaggaattc
```

FIG. 1A-2

```
bcl-x     1 ......MSSSNRELVIDFVSYKLSQRGHCWSELEEEDENRTDTAAEAEMD  44
                  : .|||:|:.:: |||||||. |    :.::  ...::.|. .
bcl-2β    1 MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEW....DAGDVGAAPPGAAPAP  46

                .         .         .         .         .
bcl-x    45 SVLNGSPSWHPPAGHVVNGATVHRSSLEVHEIVRASD..........VRQ  84
            :::.: |: |.| . . .::..: |.|:... . |..          |:
bcl-2β   47 GIFSSQPG.HTPHPAASRDPVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVVHL  95

                .         .         .         .         .
bcl-x    85 ALRDAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELFHDGVNWG 134
            |||:|||:|. ||| .|.::.||||:|| || ..|. ||:|||:||||||
bcl-2β   96 ALRQAGDDFSRRYRGDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWG 145

                .         .         .         .         .
bcl-x   135 RIVAFFSFGGALCVESVDKEMRVLVGRIVSWMTTYLTDHLDPWIQENGGW 184
            ||||||.|||.:|||||::||..||:.|. |||.||. ||..|||:||||
bcl-2β  146 RIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRHLHTWIQDNGGW 195

                .
bcl-x   185 VRTALP.... 190
            | .. .
bcl-2β  196 VGASGDVSLG 205
```

FIG. 1B

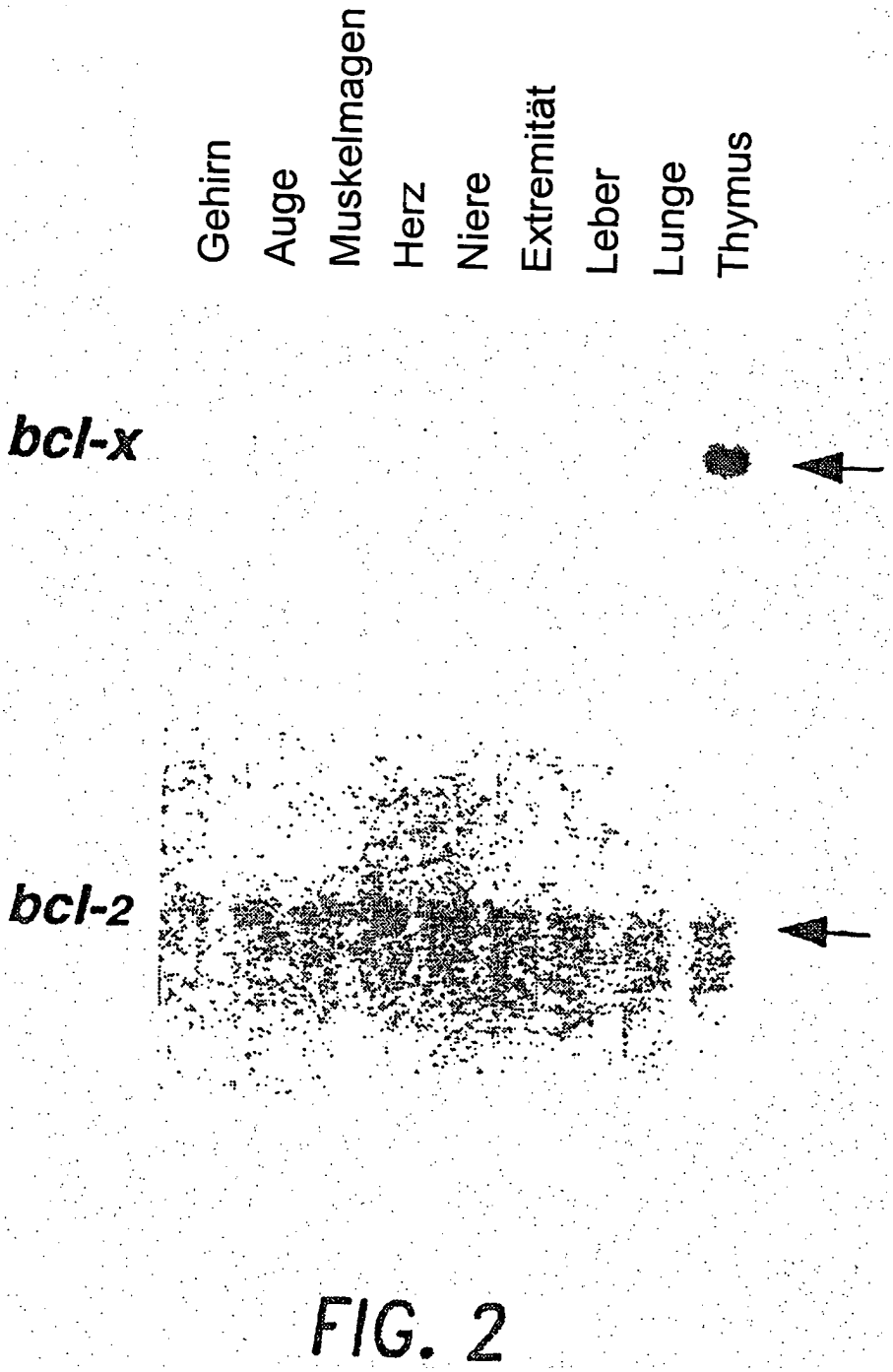

Gehirn
Auge
Muskelmagen
Herz
Niere
Extremität
Leber
Lunge
Thymus
bcl-x
bcl-2

FIG. 2

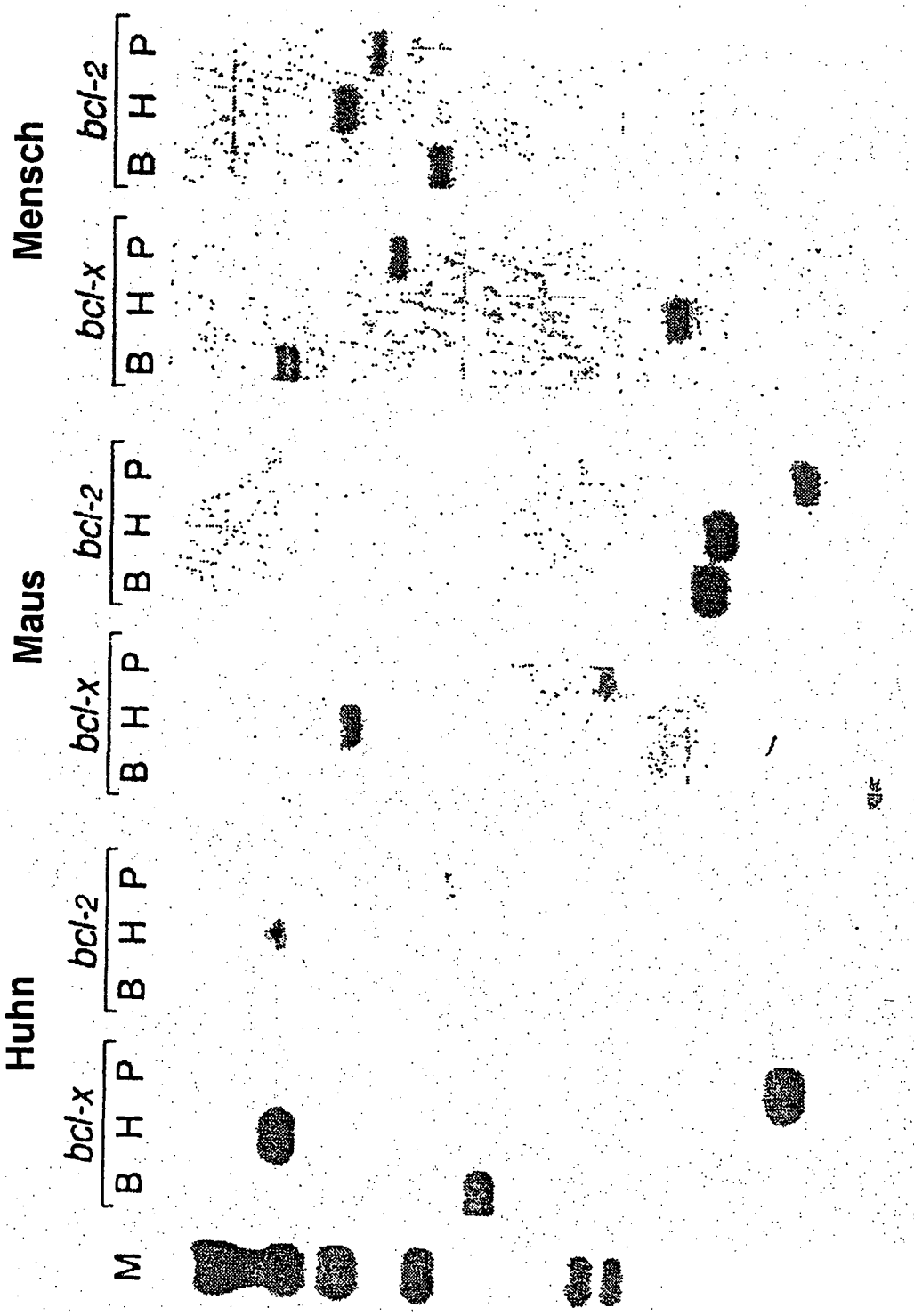


FIG. 3


1 gaatctctttctctcccttcagaatcttatcttggctttggatcttagaagagaatcactaaccagagacg 71
72 agactcagtgagtgagcaggtgttttggacaatggactggttgagcccatccctattataaaaatgtctcag 143
MetSerGln
144 agcaaccgggagctggtggttgactttctctcctacaagctttcccagaaaggatacagctggagtcagttt 215
SerAsnArgGluLeuValValAspPheLeuSerTyrLysLeuSerGlnLysGlyTyrSerTrpSerGlnPhe
216 agtgatgtggaagagaacaggactgaggccccagaagggactgaatcggagatggagacccccagtgccatc 287
SerAspValGluGluAsnArgThrGluAlaProGluGlyThrGluSerGluMetGluThrProSerAlaIle
288 aatggcaacccatcctggcacctggcagacagccccgcggtgaatggagccactggccacagcagcagtttg 359
AsnGlyAsnProSerTrpHisLeuAlaAspSerProAlaValAsnGlyAlaThrGlyHisSerSerSerLeu
360 gatgcccgggaggtgatccccatggcagcagtaaagcaagcgctgagggaggcaggcgacgagtttgaactg 431
AspAlaArgGluValIleProMetAlaAlaValLysGlnAlaLeuArgGluAlaGlyAspGluPheGluLeu
432 cggtaccggcgggcattcagtgacctgacatcccagctccacatcaccccagggacagcatatcagagcttt 503
ArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSerPhe
504 gaacaggtagtgaatgaactcttccgggatggggtaaactggggtcgcattgtggccttttctccttcggc 575
GluGlnValValAsnGluLeuPheArgAspGlyValAsnTrpGlyArgIleValAlaPhePheSerPheGly
576 ggggcactgtgcgtggaaagcgtagacaaggagatgcaggtattggtgagtcggatcgcagcttggatggcc 647
GlyAlaLeuCysValGluSerValAspLysGluMetGlnValLeuValSerArgIleAlaAlaTrpMetAla

FIG. 4A-1

```
648 acttacctgaatgaccacctagagccttggatccaggagaacggcggctgggatactttttgtggaactctat 719
    ThrTyrLeuAsnAspHisLeuGluProTrpIleGlnGluAsnGlyGlyTrpAspThrPheValGluLeuTyr

720 gggaacaatgcagcagccgagagccgaaagggccaggaacgcttcaaccgctggttccctgacgggcatgact 791
    GlyAsnAsnAlaAlaAlaGluSerArgLysGlyGlnGluArgPheAsnArgTrpPheLeuThrGlyMetThr

792 gtggccggcgtggttctgctgggctcactcttcagtcggaaatgaccagacactgaccatccactctaccct 863
    ValAlaGlyValValLeuLeuGlySerLeuPheSerArgLys

861 cccacccccttctctgctccaccacatcctccgtccagccgccattgccaccaggagaacccg 926
```

FIG. 4A-2

```
   1 gaatctctttctctcccttcagaatcttatcttggctttggatcttagaagagaatcactaaccagagacg   71

  72 agactcagtgagtgagcaggtgttttggacaatggactggttgagcccatccctattataaaaatgtctcag 143
                                                                  MetSerGln

 144 agcaaccgggagctggtggttgactttctctcctacaagctttcccagaaaggatacagctggagtcagttt 215
     SerAsnArgGluLeuValValAspPheLeuSerTyrLysLeuSerGlnLysGlyTyrSerTrpSerGlnPhe

 216 agtgatgtggaagagaacaggactgaggccccagaagggactgaatcggagatggagacccccagtgccatc 287
     SerAspValGluGluAsnArgThrGluAlaProGluGlyThrGluSerGluMetGluThrProSerAlaIle

 288 aatggcaacccatcctggcacctggcagacagccccgcggtgaatggagccactggccacagcagcagtttg 359
     AsnGlyAsnProSerTrpHisLeuAlaAspSerProAlaValAsnGlyAlaThrGlyHisSerSerSerLeu

 360 gatgcccgggaggtgatccccatggcagcagtaaagcaagcgctgagggaggcaggcgacgagtttgaactg 431
     AspAlaArgGluValIleProMetAlaAlaValLysGlnAlaLeuArgGluAlaGlyAspGluPheGluLeu

 432 cggtaccggcgggcattcagtgacctgacatcccagctccacatcaccccagggacagcatatcagagcttt 503
     ArgTyrArgArgAlaPheSerAspLeuThrSerGlnLeuHisIleThrProGlyThrAlaTyrGlnSerPhe

 504 gaacaggatactttgtggaactctatgggaacaatgcagcagccgagagccgaaagggccaggaacgcttc 575
     GluGlnAspThrPheValGluLeuTyrGlyAsnAsnAlaAlaAlaGluSerArgLysGlyGlnGluArgPhe
```

FIG. 4B-1

576 aaccgctggttcctgacgggcatgactgtggccggcgtggttctgctgggctcactcttcagtcggaaatga 647
AsnArgTrpPheLeuThrGlyMetThrValAlaGlyValValLeuLeuGlySerLeuPheSerArgLys

648 ccagacactgaccatccactctaccctcccaccccctttctgctcccaccacatcctccgtcccagccgccat 719

720 tgccaccaggagaacccg 737

FIG. 4B-2

```
bcl-xL                                                          MSQS
bcl-xS                                                          MSQS

bcl-xL NRELVVDFLS YKLSQKGYSW SQFSDVEENR TEAPEGTESE METPSAINGN
bcl-xS NRELVVDFLS YKLSQKGYSW SQFSDVEENR TEAPEGTESE METPSAINGN

bcl-xL PSWHLADSPA VNGATAHSSS LDAREVIPMA AVKQALREA  GDEFELRYRR
bcl-xS PSWHLADSPA VNGATAHSSS LDAREVIPMA AVKQALREA  GDEFELRYRR

bcl-xL AFSDLTSQLH ITPGTAYQSF EQVVNELFRD GVNWGRIVAF FSFGGALCVE
bcl-xS AFSDLTSQLH ITPGTAYQSF EQ..... ..... .....
bcl-x1                        VVNELFRD GVNWGRIVAF FSFGGALCVE

bcl-xL SVDKEMQVLV SRIAAWMATY LNDHLEPWIQ ENGGWDTFVE LYGNNAAAES
bcl-xS ..... ..... ..... .....DTFVE LYGNNAAAES
bcl-x1 SVDKEMQVLV SRIAAWMATY LNDHLEPWIQ ENGGW

bcl-xL RKGQERFNRW FLTGMTVAGV VLLGSLFSRK
bcl-xS RKGQERFNRW FLTGMTVAGV VLLGSLFSRK
                 *_____________________**
```

FIG. 4C

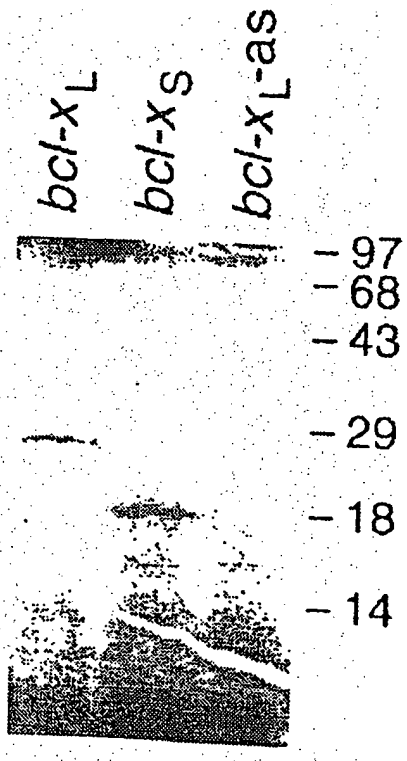


FIG. 5

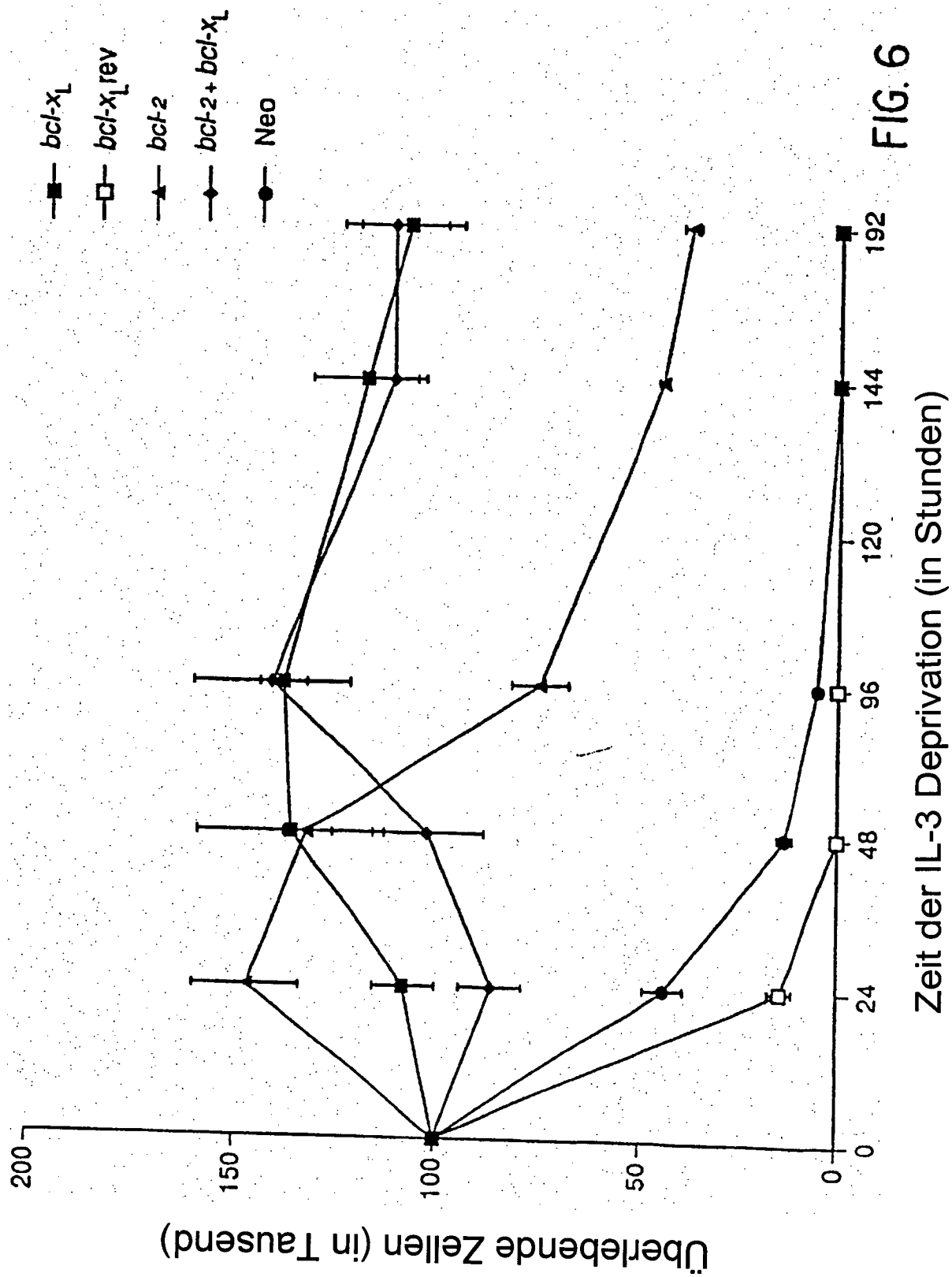

bcl-x_L
bcl-x_L rev
bcl-2
bcl-2 + bcl-x_L
Neo
Überlebende Zellen (in Tausend)
200
150
100
50
0
0
24
48
96
120
144
192
Zeit der IL-3 Deprivation (in Stunden)

FIG. 6

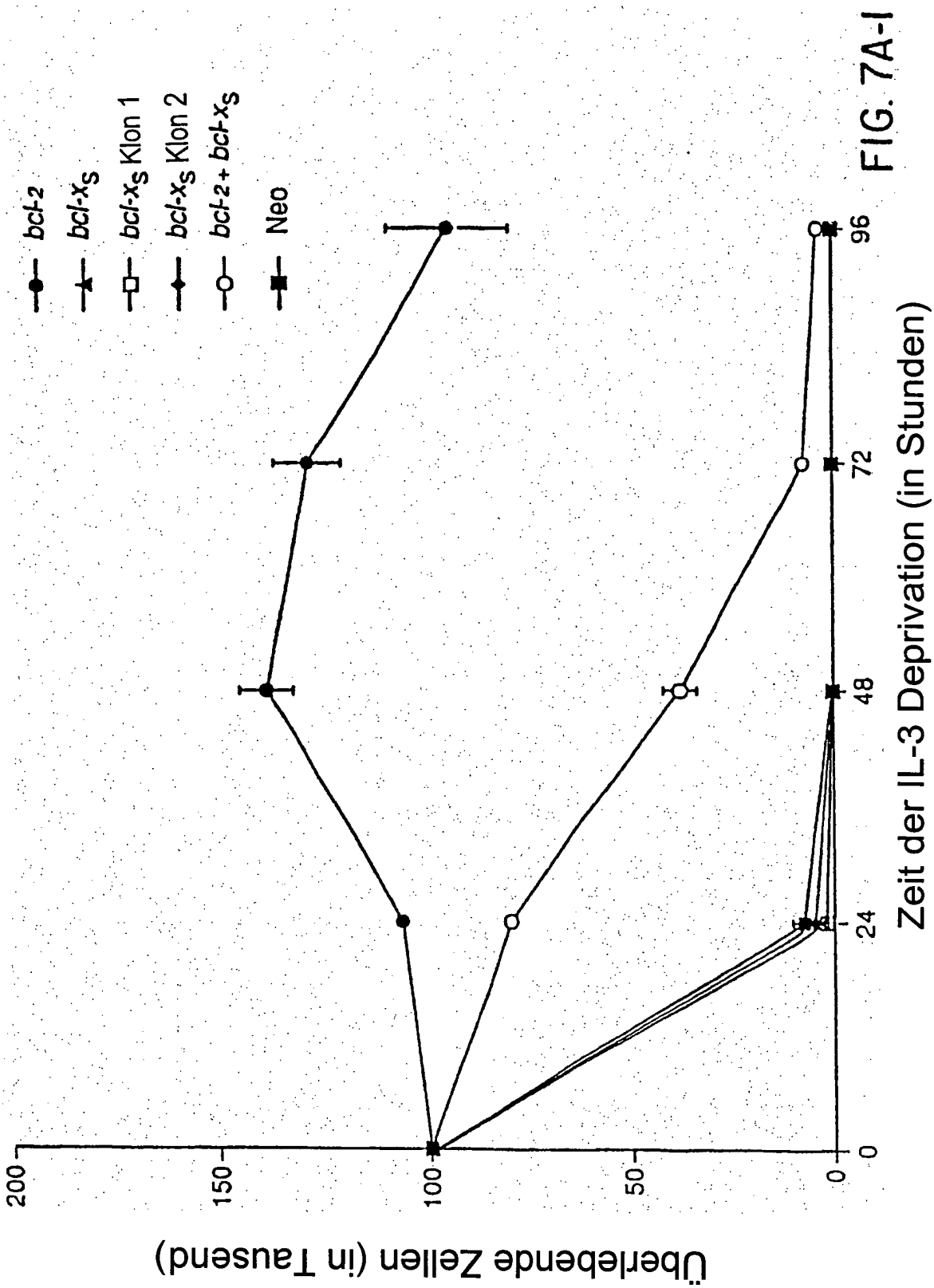

bcl-2
bcl-xS
bcl-xS Klon 1
bcl-xS Klon 2
bcl-2+ bcl-xS
Neo
Überlebende Zellen (in Tausend)
200
150
100
50
0
0
24
48
72
96
Zeit der IL-3 Deprivation (in Stunden)

FIG. 7A-I

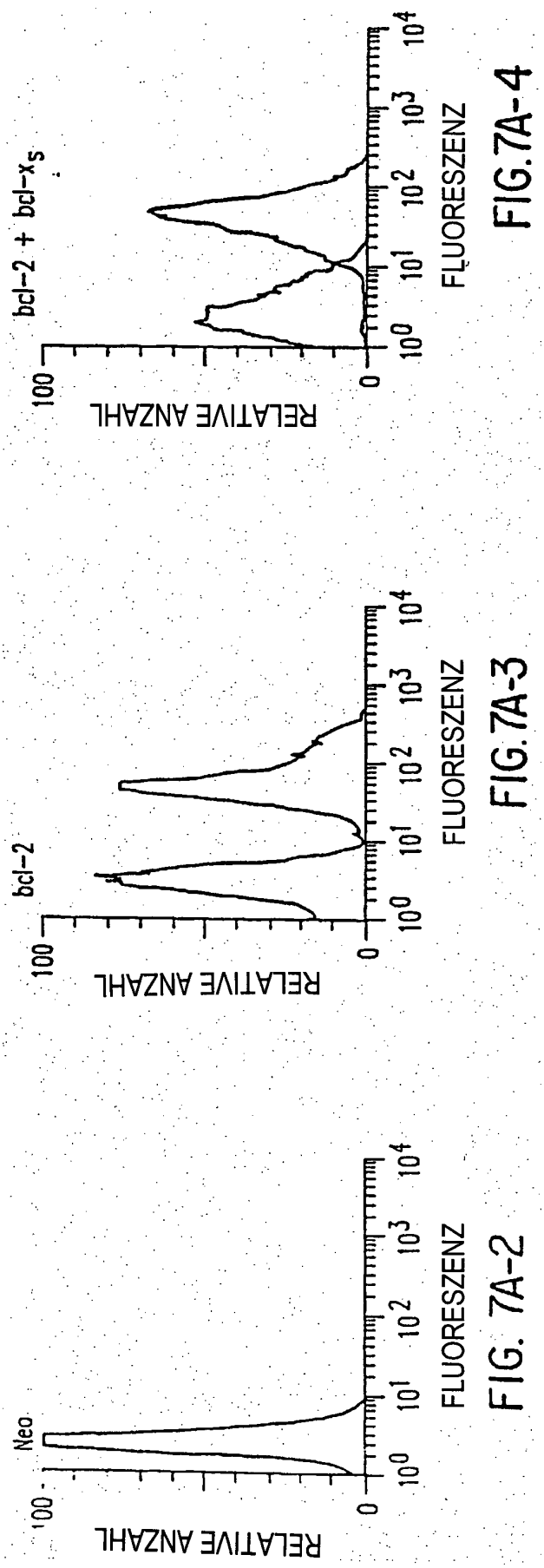


FIG. 7A-2

FIG. 7A-3

FIG. 7A-4

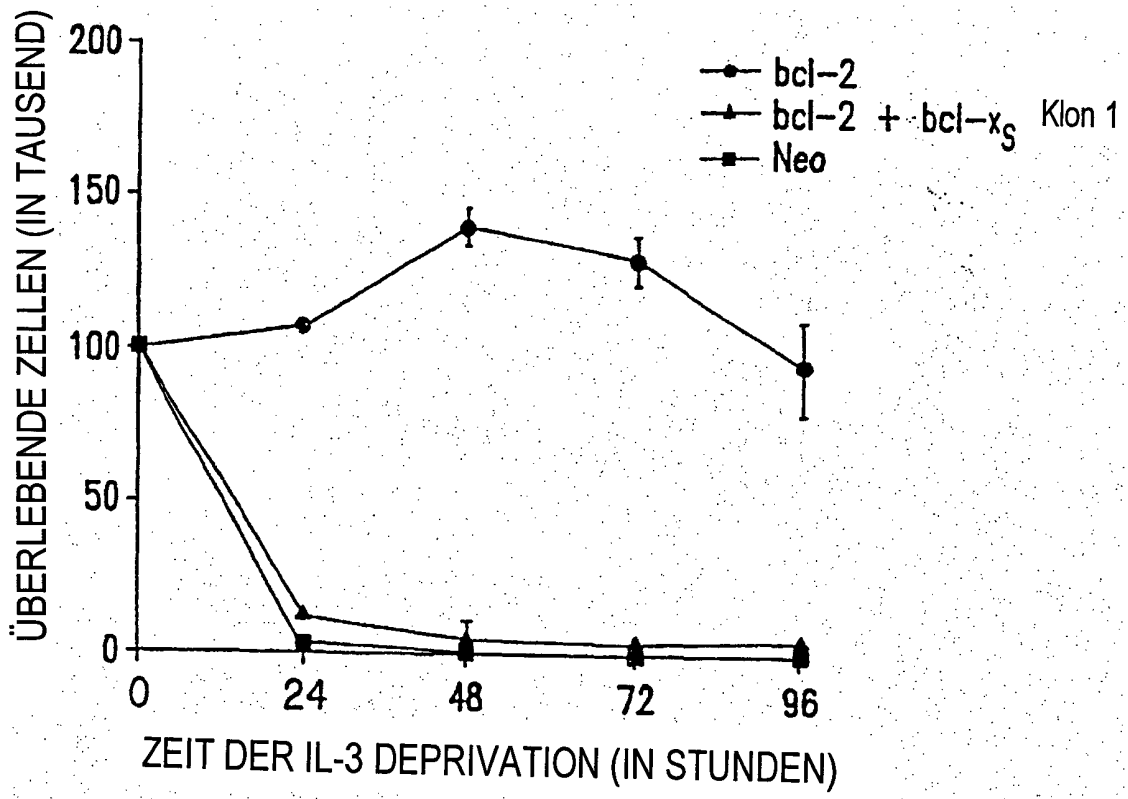


FIG. 7B-1

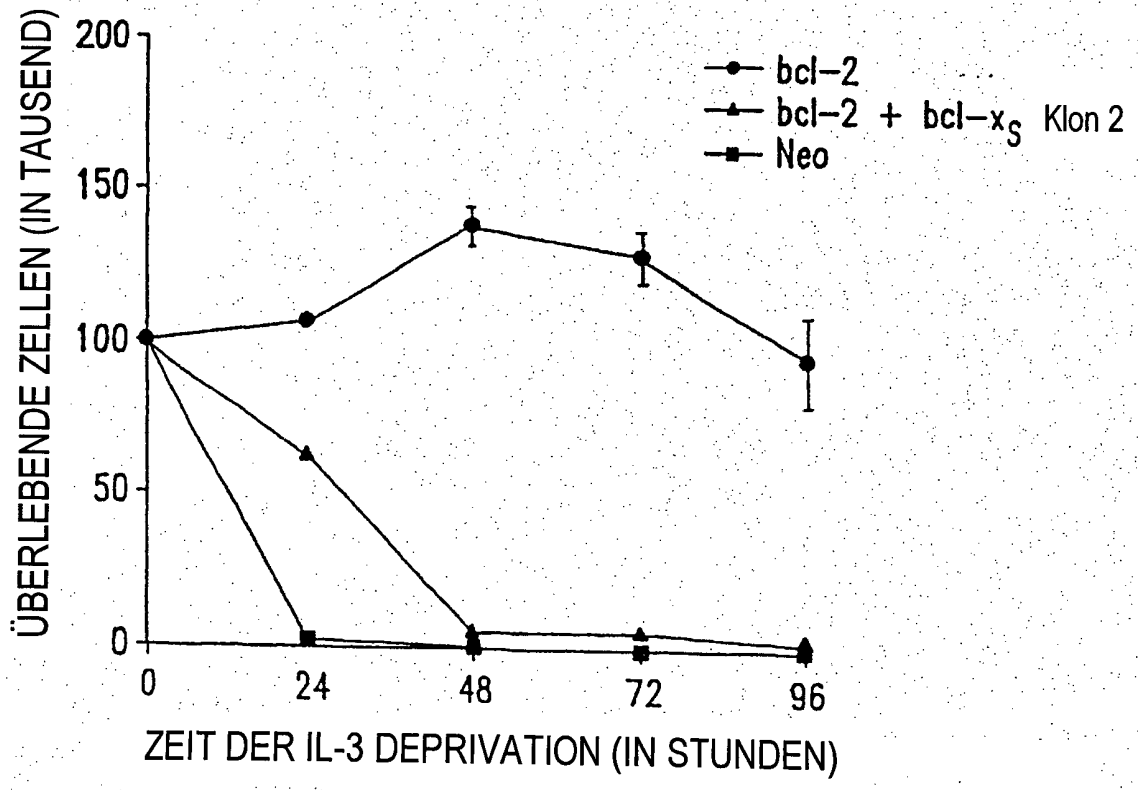


FIG. 7B-2

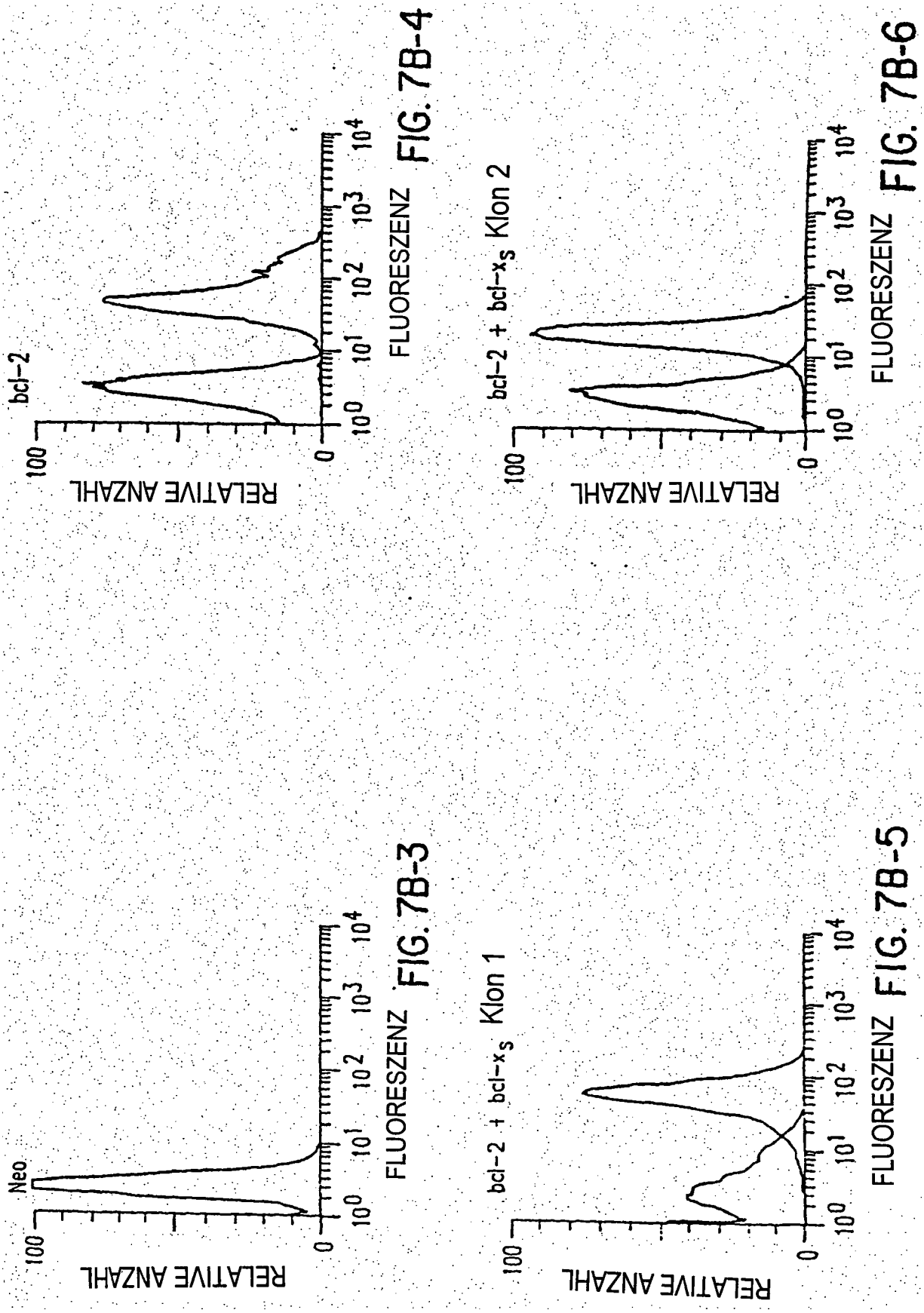


FIG. 7B-3

FIG. 7B-4

FIG. 7B-5

FIG. 7B-6

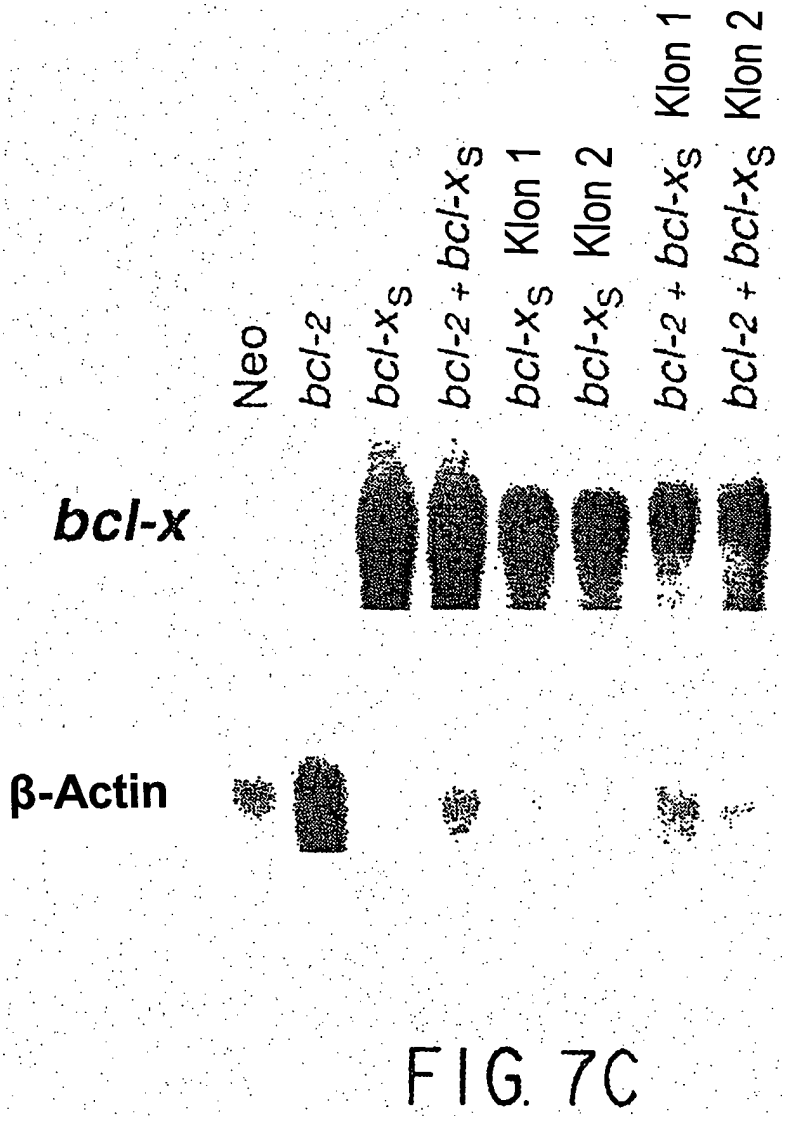

Neo
bcl-2
bcl-xS
bcl-2 + bcl-xS
bcl-xS Klon 1
bcl-xS Klon 2
bcl-2 + bcl-xS Klon 1
bcl-2 + bcl-xS Klon 2
bcl-x
β-Actin

FIG. 7C

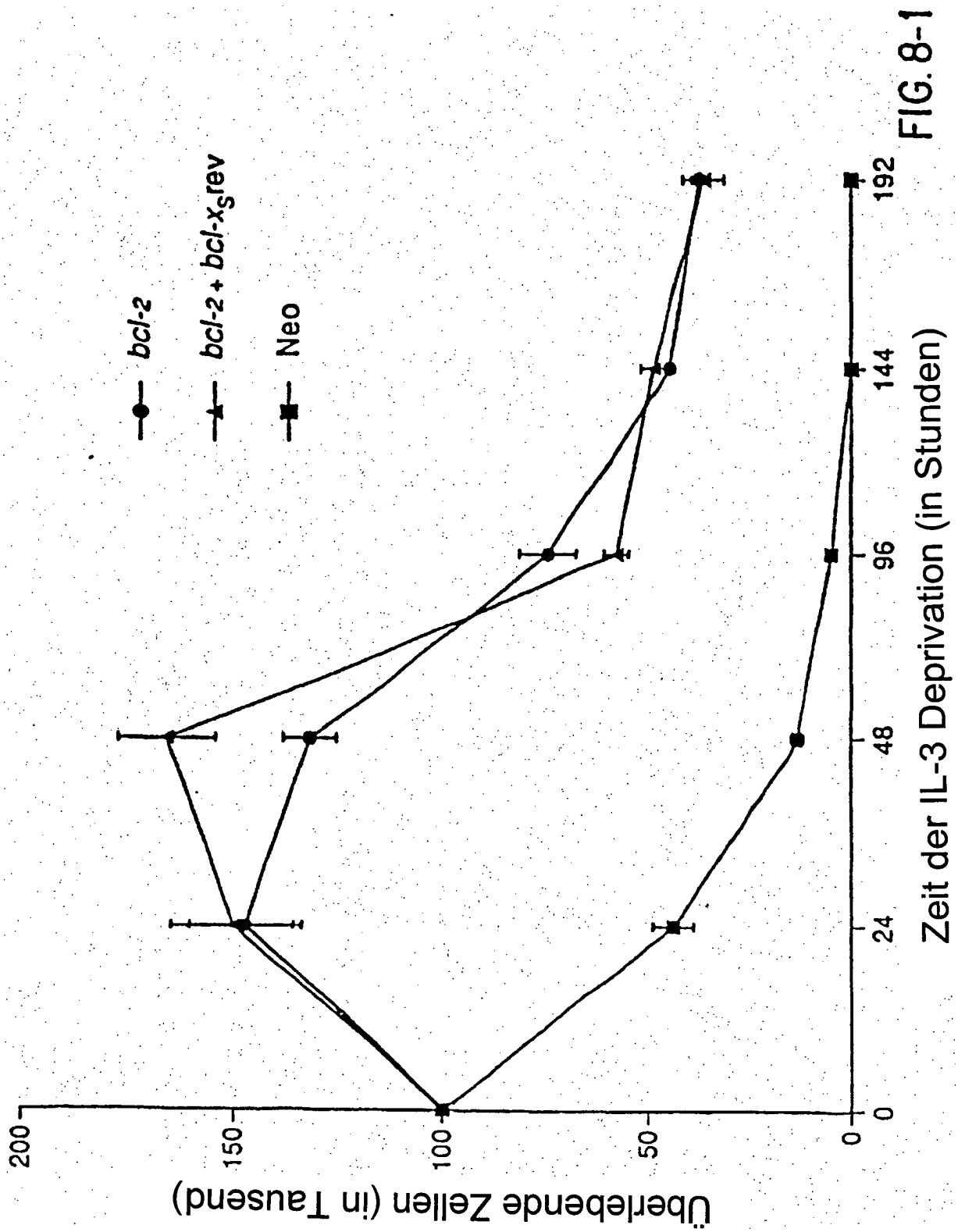

bcl-2
bcl-2 + bcl-xS rev
Neo
Überlebende Zellen (in Tausend)
200
150
100
50
0
0
24
48
96
144
192
Zeit der IL-3 Deprivation (in Stunden)

FIG. 8-1

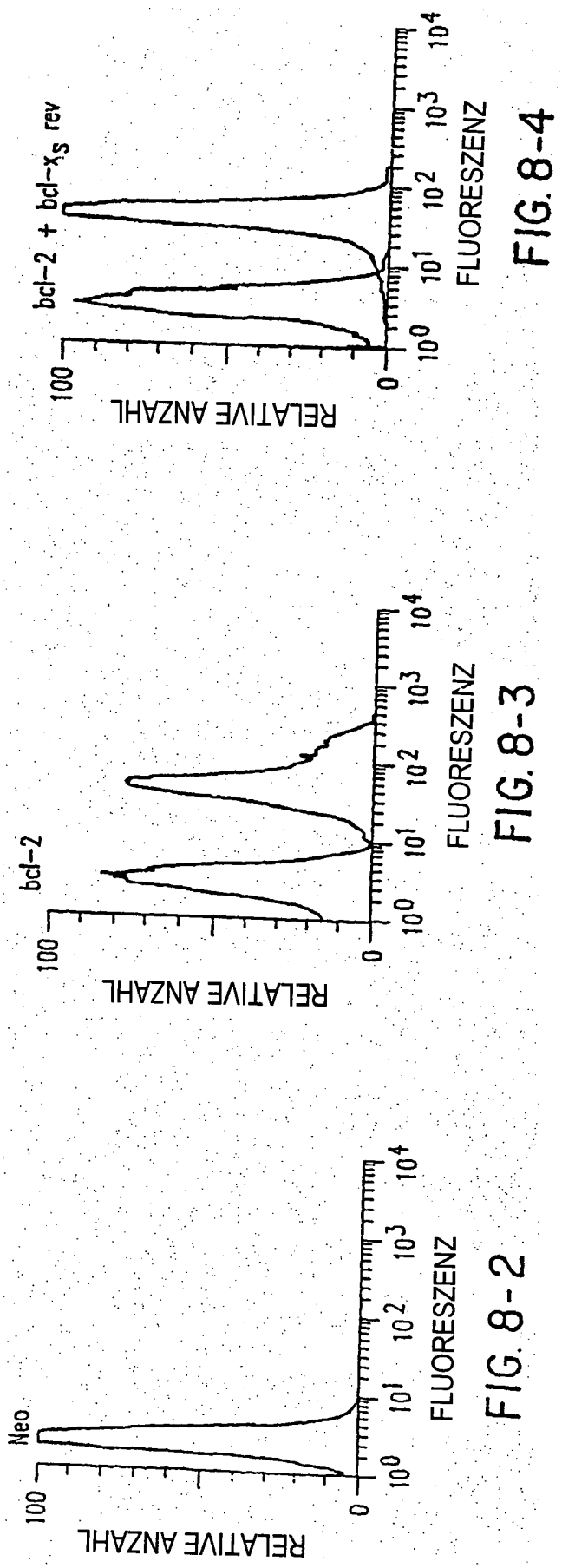


FIG. 8-2

FIG. 8-3

FIG. 8-4

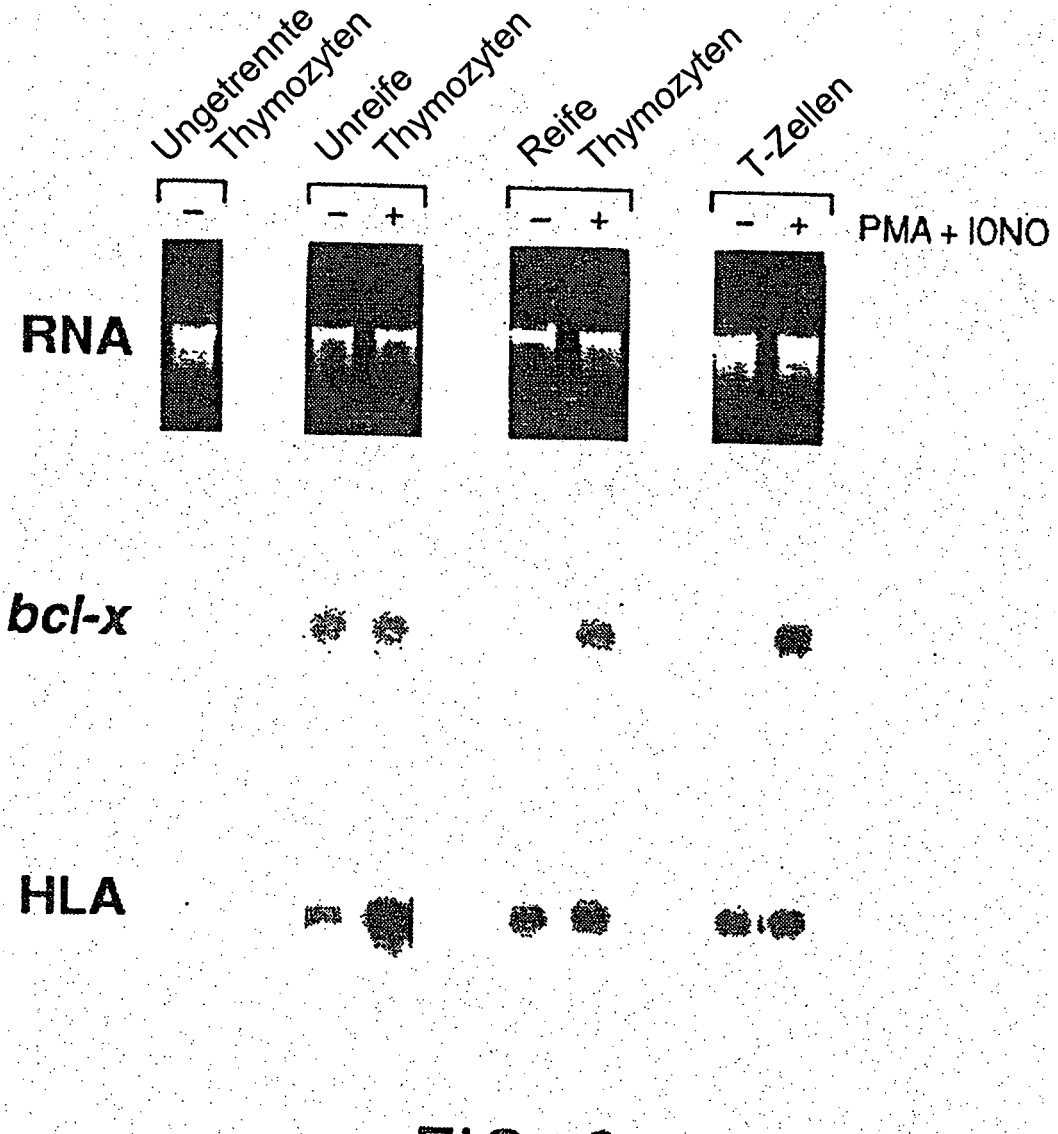

Ungetrennte Thymozyten
Unreife Thymozyten
Reife Thymozyten
T-Zellen
- + - + - +
PMA + IONO
RNA
bcl-x
HLA

FIG. 9

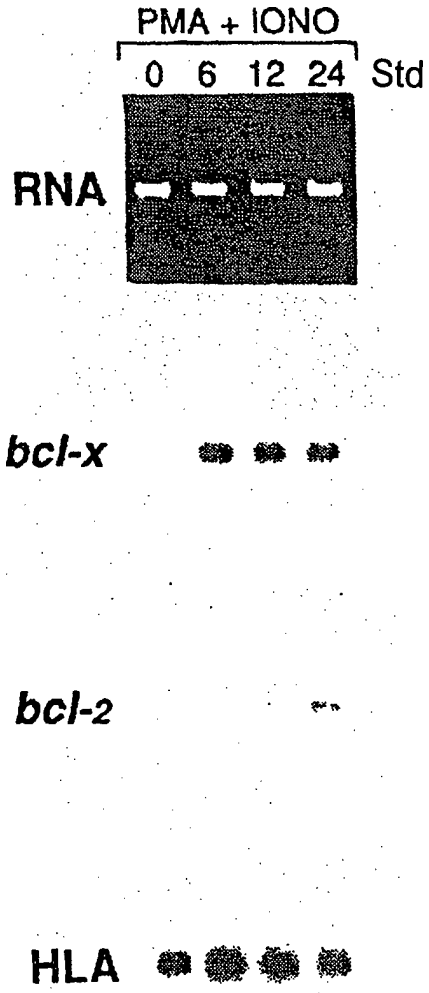


FIG. 10

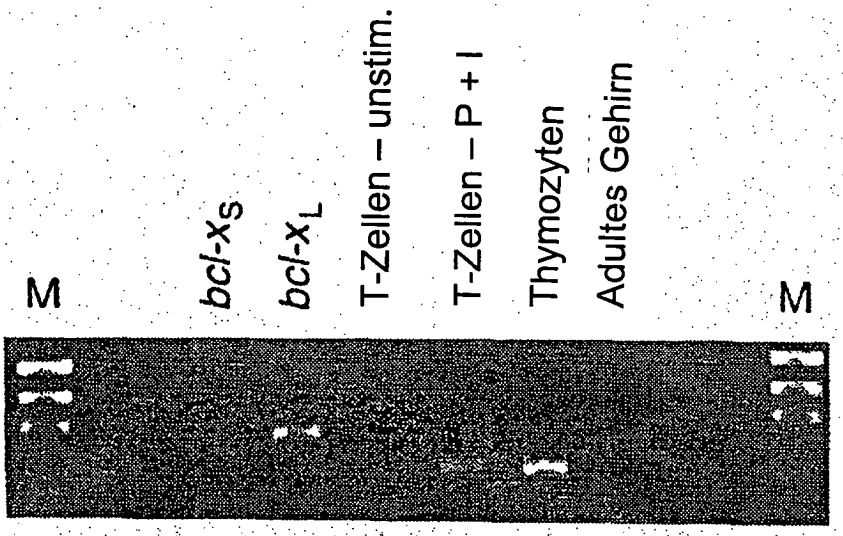


FIG. 11A

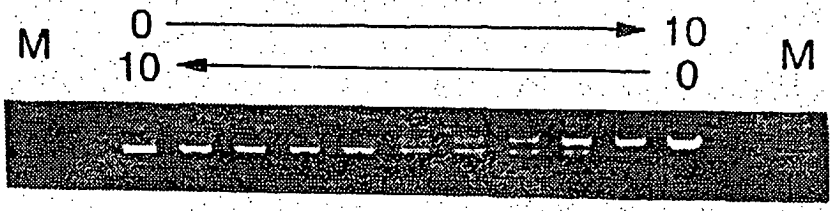


FIG. 11B