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

(10) **DE 602 20 621 T2** 2008.03.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 310 552 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 20 621.9**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 257 796.9**
(96) Europäischer Anmeldetag: **11.11.2002**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.05.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.03.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/00*** (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

345846 P	**09.11.2001**	**US**
364530 P	**15.03.2002**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:
Proteologics, Inc., Orangeburg, N.Y., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Alroy, Iris, 74065 Nes Ziona, IL; Tuvia, Shmuel, 42490 Netanya, IL; Greener, Tsvika, Ness-Ziona, IL; Ben-Avraham, Danny, Ness-Ziona, IL

(54) Bezeichnung: **Posh Nukleinsäure, Polypeptide und darauf bezogene Verfahren**

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

STAND DER TECHNIK

[0001] Bewertung möglicher Arzneistoffziele umfasst die Bestimmung ob ein DNA-, RNA- oder Proteinmolekül mit einem Erkrankungsprozess in Verbindung gebracht wird und daher ein geeignetes Ziel für die Entwicklung von neuen therapeutischen Arzneistoffen ist. Arzneistoff-Entdeckung, der Prozess bei dem bioaktive Verbindungen identifiziert und charakterisiert werden ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung von neuen Behandlungen für menschliche Krankheiten. Das Umfeld der Arzneistoff-Entdeckung hat sich aufgrund der Genomics-Revolution dramatisch verändert. DNA- und Proteinsequenzen ergeben eine Menge an neuen Arzneistoffzielen und eine enorme Menge an damit in Zusammenhang stehender Information.

[0002] Die Identifizierung von Genen und Proteinen, die an verschiedenen Krankheitsstadien oder entscheidenden biologischen Prozesse beteiligt sind, wie zum Beispiel Entzündung oder Immunantwort, ist ein entscheidender Teil der Arzneistoffentwicklung. Viele Krankheiten und Störungen könnten durch die Expression von einem oder mehreren Genen, die in der molekularen Ätiologie des Zustandes beteiligt sind, behandelt oder verhindert werden, wenn das geeignete molekulare Ziel identifiziert und geeignete Antagonisten entwickelt werden könnten. Krebs zum Beispiel, in dem ein oder mehrere zelluläre Oncogene aktiviert werden und in der ungehinderten Progression von Zellzyklusprozessen resultieren, könnte durch Antagonisieren von geeigneten Zellzyklus-Kontrollgenen behandelt werden. Darüber hinaus resultieren viele menschliche genetische Erkrankungen, wie zum Beispiel Huntington Krankheit und bestimmte Prionen-Zustände, die sowohl durch genetische als auch durch epigenetische Faktoren beeinflusst werden, im Gegensatz zu einem völligen Funktionsverlust, aus der unangemessenen Aktivität eines Polypeptids. Demgemäß würde das Bekämpfen der abweichenden Funktion solcher Mutantengene eine Maßnahme zur Behandlung bereitstellen. Außerdem sind infektiöse Krankheiten wie zum Beispiel HIV erfolgreich mit molekularen Antagonisten behandelt worden, die auf spezielle wesentliche retrovirale Proteine wie zum Beispiel HIV-Protease oder Reverse Transkriptase abzielen. Arzneistoff-Therapie-Strategien zur Behandlung von solchen Krankheiten und Störungen haben oft molekulare Antagonisten eingesetzt, welche auf das Polypeptidprodukt des (der) Krankheitsgen(e) abzielen. Die Entdeckung von relevanten Gen- oder Proteinzielen ist oft schwierig und zeitintensiv.

[0003] Ein Gebiet von besonderem Interesse ist die Identifizierung von Wirtsgenen und Proteinen, die von Viren während des viralen Lebenszyklus hinzugewählt werden. Die ernsthafte und unheilbare Natur von vielen viralen Krankheiten, gekoppelt mit der hohen Mutationsrate, die in vielen Viren festgestellt wird, führt dazu, dass die Identifizierung von antiviralen Mitteln hohe Priorität bei der Verbesserung der Weltgesundheit genießt. Gene und Proteine, die am viralen Lebenszyklus beteiligt sind, sind auch als ein Gegenstand für die Untersuchung attraktiv, da solche Gene und Proteine üblicherweise zusätzliche Aktivitäten in der Wirtszelle haben und eine Rolle in anderen nicht-viralen Krankheitszuständen spielen können.

[0004] Virale Reifung benötigt die proteolytische Prozessierung der Gag-Proteine und die Aktivität des Wirtsproteins. Es wird angenommen, dass zelluläre Maschinerien für Exo/Endocytose und für Ubiquitinkonjugation an der Reifung beteiligt sein können. Insbesondere hängt das Zusammenfügen, die Sprossung und anschließende Freisetzung der retroiden Viren und RNA-Viren, wie zum Beispiel von verschiedenen Retroviren, Rhabdoviren, Lentiviren und Filoviren vom Gag-Polyprotein ab. Nach seiner Synthese zielt Gag auf die Plasmamembran ab, wo es die Sprossung von im Entstehen begriffenen Viruspartikeln induziert.

[0005] Auf die Rolle von Ubiquitin im Zusammenfügen des Virus wurde von Dunigan et al. (1988, Virology 165, 310; Meyers et al. 1991, Virology 180, 602) hingewiesen, die beobachtet haben, dass reife Viruspartikel in nicht-konjugiertem Ubiquitin angereichert wurden. Vor kurzem ist gezeigt worden, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von HIV-1, HIV-2 und Virus-ähnlichen Partikeln unterdrücken, die von SIV- und RSV-Gag stammen. Inhibitoren beeinflussen auch die Gag-Prozessierung und Reifung in infektiöse Partikel (Schubert et al. 2000, PNAS 97, 13057, Harty et al. 2000, PNAS 97, 13871, Strack et al. 2000, PNAS 97, 13063, Patnaik et al. 2000, PNAS 97, 13069).

[0006] Es ist im Fachgebiet gut bekannt, dass Ubiquitin-vermittelte Proteolyse der Hauptweg für den selektiven kontrollierten Abbau von intrazellulären Proteinen in eukaryontischen Zellen ist. Ubiquitin-Modifikation von einer Vielzahl an Proteinzielen innerhalb der Zelle scheint in etlichen grundlegenden zellulären Funktionen, wie zum Beispiel Regulation der Genexpression, Regulation des Zellzyklus, Modifikation der Zelloberflächenrezeptoren, Biogenese von Ribosomen und DNA-Reparatur wichtig zu sein. Eine Hauptfunktion des von Ubiquitin vermittelten Systems ist es die Halbwertszeit von zellulären Proteinen zu kontrollieren. Die Halbwertszeit von unterschiedlichen Proteinen kann von wenigen Minuten bis zu mehreren Tagen reichen und kann, abhängig

vom Zelltyp, Ernährungszustand und Umweltbedingungen sowie dem Stadium des Zellzyklus, erheblich variieren.

[0007] Ausgewählte Proteine, die, wahrscheinlich durch die Wirkungen eines Ubiquitin-abhängigen Proteasoms, selektiven Abbau durchmachen, sind durch die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycyl-Rest von Ubiquitin und einem spezifischen Lysyl-Rest im Substratprotein kovalent mit Ubiquitin markiert. Dieser Prozess wird durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) und ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) katalysiert und kann in manchen Fällen auch zusätzliche Substrat-Erkennungsproteine (E3s) benötigen. Nach dem Verbinden der ersten Ubiquitin-Kette, können zusätzliche Ubiquitinmoleküle an die Lysin-Seitenketten des vorher konjugierten Restes angeheftet werden, um verzweigte mehrfache Ubiquitin-Ketten zu bilden.

[0008] Die Konjugation von Ubiquitin an Proteinsubstrate ist ein mehrstufiger Prozess. In einem anfänglichen Schritt, der ATP benötigt, wird ein Thioester zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und einem internen Cysteinrest eines E1-Enzyms gebildet. Aktiviertes Ubiquitin wird dann zu einem spezifischen Cystein auf einem von mehreren E2-Enzymen übertragen. Schließlich spenden diese E2-Enzyme Ubiquitin an Proteinsubstrate. Substrate werden entweder direkt durch Ubiquitin-konjugierte Enzyme oder durch assoziierte Substrat-Erkennungsproteine, die E3-Proteine, erkannt, die auch als Ubiquitin-Ligasen bekannt sind.

[0009] Es ist auch bekannt, dass das Ubiquitinsystem bei einer großen Auswahl an zellulären Prozessen eine Rolle spielt, einschließlich Zellzyklus-Progression, Apoptose und Umsatz von vielen Membranrezeptoren. In viralen Infektionen ist das Ubiquitinsystem nicht nur am Zusammenfügen, der Sprossung und Freisetzung beteiligt, sondern auch an der Repression von Wirtsproteinen wie zum Beispiel p53, die zu einem viral-induzierten Neoplasma führen können. Das HIV- Vpu-Protein interagiert mit einem E3-Protein, das den IκB-Abbau reguliert und von dem angenommen wird, dass es Apoptose von infizierten Zellen durch direkte Hemmung der NF-κB-Aktivität fördert (Bour et al. (2001) J Exp Med 194:1299–311; U.S. Patentnummer 5.932.425).

[0010] Die vesikulären Trafficking-Systeme sind die Hauptwege für die Verteilung von Proteinen zwischen Zellorganellen, der Plasmamembran und dem extrazellulären Medium. Die vesikulären Trafficking-Systeme können direkt oder indirekt an einer Vielzahl von Krankheitsstadien beteiligt sein. Die bedeutendsten Vesikel-Traffickingsysteme in eukaryontischen Zellen umfassen jene Systeme, die durch Clathrin-beschichtete Vesikel und Coatomer-beschichtete Vesikel vermittelt werden. Clathrin-beschichtete Vesikel sind im Allgemeinen am Transport beteiligt, wie zum Beispiel im Falle von Rezeptor-vermittelter Endozytose zwischen der Plasmamembran und den frühen Endosomen, sowie vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen. Coatomer-beschichtete Vesikel umfassen mit Hüllenprotein I (COP-I) beschichtete Vesikel und COP-II beschichtete Vesikel, wobei beide die Tendenz haben den Transport von einer Vielzahl an Molekülen zwischen dem ER und den Golgi-Zisternen zu vermitteln. In jedem Fall wird ein Vesikel durch Sprossung aus einem Teil der Membran geformt, die mit Hüllenproteinen beschichtet ist und die Vesikel werfen ihre Hülle ab bevor sie mit der Zielmembran verschmelzen.

[0011] Clathrin-Hüllen fügen sich an der cytoplasmatischen Oberfläche der Membran zusammen indem sie Gruben bilden, die sich dann letztendlich abschnüren und zu Vesikeln werden. Clathrin selbst setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Die schwere und die leichte Kette von Clathrin, die das Clathrin-Triskelion bilden. Clathrine verbinden sich mit einer Reihe anderer Proteine, einschließlich dem Assembly-Protein AP180, den Adaptorkomlexen (AP1, AP2, AP3 und AP4), Beta-Arrestin, Arrestin 3, Auxilin, Epsin, Eps15, v-SNAREs, Amphiphysine, Dynamin, Synaptojanin und Endophilin. Die Adaptorkomplexe fördern die Clathrin-Gehäusebildung und helfen Clathrin sich mit der Membran, Menbranproteinen und vielen anderen der vorhergehenden Komponenten zu verbinden. AP1 verbindet sich mit Clathrin-beschichteten Vesikeln, die aus dem Trans-Golgi-Netzwerk stammen und enthält γ-, β1-, μ1- und σ1-Polypeptidketten. AP2 verbindet sich mit endocytischen Clathrin-beschichteten Vesikeln und enthält α-, β2-, μ2- und σ2-Polypeptide. Interaktionen zwischen dem Calthrinkomplex und anderen Proteinen werden durch eine Vielzahl an Domänen vermittelt, die sich in den Komplexproteinen finden, wie zum Beispiel SH3 (Src Homologie 3)-Domänen, PH (Pleckstrin Homologie)-Domänen, EH- und NPF-Damänen. (Marsh et al. (1999) Science 285:215–20; Pearse et al. (2000) Curr Opin Struct Biol 10(2):220–8).

[0012] Coatomer-beschichtete Vesikelbildung wird durch Rekrutierung einer kleinen GTPase (z.B. ARF oder SAR) durch seinen verwandten Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor initiiert (z.B. SEC12, GEA1, GEA2) erkannt. Der anfängliche Komplex wird durch einen Hüllen-Proteinkomplex (COPI oder COPII) erkannt. Die Hülle wächst dann über die Membran und verschiedene Cargo-Proteine werden im wachsenden Netzwerk eingeschlossen. Die Membran wölbt sich schlussendlich und wird zu einem Vesikel. Die Hüllenproteine stimulieren

die GTPase-Aktivität der GTPase und nach der Hydrolyse des GTPs werden die Hüllenproteine von dem Komplex freigesetzt, wobei das Vesikel enthüllt wird. Andere Proteine, die mit Coatomer-beschichteten Vesikeln in Zusammenhang gebracht werden umfassen v-SNAREs, Rab-GTPasen und verschiedene Rezeptoren, die helfen die geeigneten Cargo-Proteine zu rekrutieren. (Springer et al. (1999) Cell 97:145–48).

ZUSAMMENFASSUNG

[0013] Zu diesem Zweck stellt die Anmeldung eine neue Ubiquitinligase bereit, POSH (Plenty Of SH3 Domains) Nucleinsäuresequenzen und Proteine, die dadurch codiert sind. In bestimmten Ausführungsformen spielen POSH-Proteine eine Rolle bei der viralen Reifung. Wahlweise hat POSH beim Zusammenfügen oder Trafficking von Komplexen eine Wirkung, die die virale Freisetzung vermitteln. In einer Ausführungsform können POSH-Polypeptide die Ubiquitinierung von bestimmten Proteinen stimulieren oder die Membranfusion der beiden stimulieren. Wie ein Fachmann leicht verstehen wird, kann ein POSH-Protein vielfache unterschiedliche Komplexe zu unterschiedlichen Zeiten bilden. In bestimmten Ausführungsformen wirkt ein POSH-Polypeptid beim vesikulären Trafficking. In weiteren Ausführungsformen reguliert ein POSH-Polypeptid einen Rac-Signalweg. In noch einer anderen Ausführungsform reguliert ein POSH-Polypeptid einen JNK-Weg. In einer zusätzlichen Ausführungsform reguliert ein POSH-Polypeptid NF-κB. In einer anderen Ausführungsform reguliert ein POSH-Polypeptid Apoptose.

[0014] In manchen Aspekten stellt die Erfindung Nucleinsäuresequenzen und Proteine bereit, die dadurch codiert werden, sowie auch Oligonucleotide, die aus den Nucleinsäuresequenzen stammen, Antikörper die gegen die codierten Proteine gerichtet sind, Screeningtests zur Identifikation von Mitteln, die POSH modulieren und diagnostische Verfahren zum Nachweisen von Zellen, die mit einem Virus infiziert sind, vorzugsweise Virus mit einer Hülle, RNA-Virus und insbesondere ein Retrovirus.

[0015] In einem Aspekt stellt die Erfindung eine isolierte Nucleinsäure bereit, umfassend die Nucleotidsequenz, bestehend aus SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3.

[0016] In anderen Ausführungsformen stellt die Erfindung eine Nucleinsäure bereit, ferner umfassend eine transkriptionelle regulatorische Sequenz, die mit der Nucleotidsequenz funktionsfähig verbunden ist, um die Nucleotidsequenz für die Verwendung als einen Expressionsvektor geeignet zu machen. In einer anderen Ausführungsform kann die Nucleinsäure in einen Expressionsvektor aufgenommen werden, der im Stande ist in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle zu replizieren. Die Erfindung stellt daher einen Expressionsvektor bereit, umfassend die Nucleinsäure der Erfindung. In einer verwandten Ausführungsform stellt die Erfindung eine Wirtszelle bereit, die mit dem Expressionsvektor transfiziert ist.

[0017] In einem Aspekt stellt die Erfindung eine siRNA bereit, die zwischen 15 und 30 aufeinander folgende Nucleotide einer Nucleinsäuresequenz aufweist, die auf dem RNA-Niveau zu einer Sequenz von SEQ ID NO: 1 und/oder NO: 3 identisch ist und die, wenn sie in eine Zelle eingeführt wird, die Menge an menschlicher POSH-mRNA und/oder eines menschlichen POSH-Polypeptids vermindert und im Stande ist die Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln in der Zelle zu hemmen, wobei diese siRNA eine Sequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus irgendeiner der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25. In einer verwandten Ausführungsform der Erfindung ist die siRNA ein Duplex, der zwischen SEQ ID NOs: 15 und 16; SEQ ID NOs: 18 und 19; SEQ ID NOs: 21 und 22; oder SEQ ID NOs: 24 und 25 gebildet wird.

[0018] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Polypeptide bereit. In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein gereinigtes rekombinantes menschliches POSH-Polypeptid von SEQ ID NO: 2, das durch die Wirtszelle der Erfindung exprimiert wird.

[0019] Die Erfindung stellt auch ein isoliertes Polypeptid bereit, bestehend aus einer Aminosäuresequenz die nicht identisch zu SEQ ID NO: 2 ist.

[0020] Die betreffenden Proteine können auch als chimäre Moleküle bereitgestellt werden, wie zum Beispiel in Form von Fusionsproteinen. Zum Beispiel kann das POSH-Polypeptid als ein rekombinantes Fusionsprotein bereitgestellt werden, das einen zweiten Polypeptidteil umfasst, z.B. ein zweites Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit POSH nicht verwandt ist (heterolog) z.B. ist der zweite Polypeptidteil Glutathion-S-Transferase, z.B. ist der zweite Polypeptidteil eine enzymatische Aktivität wie zum Beispiel alkalische Phosphatase, z.B. ist der zweite Polypeptidteil ein Epitop, Tag, usw.

[0021] In bestimmten Ausführungsformen werden die betreffenden POSH-Nucleinsäuren eine transkriptionel-

le regulatorische Sequenz umfassen, z.B. mindestens einen Transkriptionspromotor oder eine transkriptionelle Enhancer-Sequenz, deren regulatorische Sequenz funktionsfähig mit der POSH-Sequenz verbunden ist. Solche regulatorischen Sequenzen können verwendet werden, um die POSH-Sequenz brauchbar für die Verwendung als einen Expressionsvektor zu machen.

[0022] In noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Test für das Screening von Testbedingungen für Inhibitoren einer Interaktion zwischen einem POSH-Polypeptid und einem mit POSH assoziierten Protein (POSH-AP) bereit, wie zum Beispiel eine späte Domänenregion eines RNA-Virus, wie zum Beispiel eines Retrovirus. Ein exemplarisches Verfahren umfasst die Schritte von (i) Verbinden von POSH-AP, einem POSH-Polypeptid und einer Testverbindung, z.B. unter Bedingungen worin das POSH-Polypeptid und POSH-AP nur wegen der Testkomponente interagieren können; und (ii) Nachweis der Bildung eines Komplexes, der das POSH-Polypeptid und ein POSH-AP enthält. Eine statistisch signifikante Veränderung, wie zum Beispiel eine Verminderung in der Bildung des Komplexes in der Anwesenheit der Testverbindung (relativ dazu, was in der Abwesenheit der Testkomponente beobachtet wird) deutet auf eine Modulation hin, z.B. Hemmung der Interaktion zwischen dem POSH-Polypeptid und POSH-AP.

[0023] In einem zusätzlichen Aspekt stellt die Erfindung eine Nucleinsäure für Therapien zur Manipulation von POSH bereit. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine Zusammensetzung bereit, umfassend eine siRNA, die zwischen 15 und 30 aufeinander folgende Nucleotide von einer Nucleinsäuresequenz aufweist, die auf dem RNA-Niveau identisch mit einer Sequenz von SEQ ID NO: 1 und/oder 3 ist und die, wenn sie in eine Zelle eingeführt wird, die Menge an menschlicher POSH-mRNA und/oder von einem menschlichen POSH-Polypeptid vermindert und im Stande ist die Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in der Zelle zur Verwendung in der Medizin zu hemmen. Bevorzugt umfasst siRNA eine Sequenz, die aus irgendeiner der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25 ausgewählt wird.

[0024] Die Erfindung zeichnet sich auch durch transgene, nicht-menschliche Tiere, z.B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Ziegen, Schafe, Hunde, Katzen, Kühe oder nicht-menschliche Primaten aus, die ein Transgen aufweisen, z.B. Tiere die eine heterologe Form des hierin beschriebenen POSH-Gens umfassen (und vorzugsweise exprimieren). Ein solches transgenes Tier kann als ein Tiermodell zum Studium viraler Infektionen dienen, wie zum Beispiel HIV-Infektion, oder zur Verwendung im Arzneistoff-Screening für virale Infektionen.

[0025] In weiteren Aspekten stellt die Erfindung Zusammensetzungen für die Verabreichung einer Nucleinsäuretherapie bereit, wie zum Beispiel Zusammensetzungen, umfassend ein Liposom und/oder einen pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoff oder Träger.

[0026] Die Anwendung der vorliegenden Erfindung wird, wenn nicht anderes angezeigt, herkömmliche Techniken der Zellbiologie, Zellkultur, Molekularbiologie, transgenen Biologie, Mikrobiologie, rekombinanten DNA und Immunologie einsetzen, die innerhalb des Fachwissens liegen. Solche Techniken werden in der Literatur vollständig erklärt. Siehe zum Beispiel Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2. Auflage, herausgegeben von Sambrook, Fritsch und Maniatis (Cold Spring Harbor Laborstory Press; 1989); DNA Cloning, Band I und II (D. N. Glover Hg., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, Hg., 1984); Mullis et al. U.S. Patentnummer 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins Hrsg. 1984); Transcription And Translation (B. D. Harnes & S. J. Higgins Hrsg., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); die Abhandlung, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller und M.P. Calos Hrsg., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Bd. 154 und 155 (Wu et al. Hrsg.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer und Walker, Hrsg., Academic Press, London, 1987); Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir und C. C. Blackwell, Hrsg., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

[0027] Andere Besonderheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden genauen Beschreibung und aus den Ansprüchen offensichtlich werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0028] Fig. 1: Menschliche POSH-Codierungssequenz (SEQ ID NO: 1)

[0029] Fig. 2: Menschliche POSH-Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2)

[0030] Fig. 3: Menschliche POSH cDNA-Sequenz (SEQ ID NO: 3)

[0031] Fig. 4: 5' cDNA-Fragment von menschlichem POSH (öffentliche gi:10432611; SEQ ID NO: 4)

[0032] Fig. 5: N-terminales Proteinfragment von hPOSH (öffentliche gi:10432612; SEQ IDNO: 5)

[0033] Fig. 6: 3'-mRNA-Fragment von mPOSH (öffentliche gi: 7959248; SEQ ID NO: 6)

[0034] Fig. 7: C-terminales Proteinfragment von hPOSH (öffentliche gi:7959249; SEQ ID NO: 7)

[0035] Fig. 8: Gesamte menschliche POSH mRNA, vermerkte Sequenz

[0036] Fig. 9: Domänenanalyse von menschlichem POSH

[0037] Fig. 10: Diagramm von menschlichen POSH-Nucleinsäuren. Das Diagramm zeigt das Volllängen POSH-Gen und die Position von Regionen, die durch RT-PCR amplifiziert wurden oder auf die mit der in Fig. 11 verwendeten siRNA abgezielt wurde.

[0038] Fig. 11: Knockdown von POSH-mRNA durch siRNA-Duplex. HeLa-SS-6-Zellen wurden mit siRNA gegen Lamin A/C (Spuren 1, 2) oder POSH (Spuren 3–10) transfiziert. POSH siRNA wurde gegen die Codierungsregion gerichtet (153 – Spuren 3,4; 155 – Spuren 5,6) oder die 3'UTR (157 – Spuren 7,8; 159 – Spuren 9, 10). Die Zellen wurde 24 Stunden nach der Transfektion gewonnen; RNA extrahiert und POSH mRNA-Mengen durch RT-PCR einer eigenständigen Sequenz in der Codierungsregion des POSH-Gens verglichen (siehe Fig. 10). GAPDH wird in jeder Reaktion als RT-PCR-Kontrolle verwendet.

[0039] Fig. 12: POSH beeinflusst die Freisetzung von VLP aus Zellen. A) Phosphor Abbildungen von SDS-PAGE-Gelen von Immunpräzipitationen von 35S Pulse-Chase markierten Gag Proteinen werden für zelluläre und virale Lysate aus transfizierten HeLa-Zellen präsentiert, die entweder mit POSH RNAi (50 nM für 48 Stunden) behandelt oder nicht behandelt wurden. Die Zeit während der Chase-Periode (1, 2, 3,4 und 5 Stunden nach dem Pulse) wird für jedes Bild von links nach rechts dargestellt.

[0040] Fig. 13: Freisetzung von VLP aus Zellen bei stationärem Zustand. HeLa-Zellen wurden mit einem HIV-codierenden Plasmid und siRNA transfiziert. Spuren 1, 3 und 4 wurden mit Wildtyp HIV-codierendem Plasmid transfiziert. Spur 2 wurde mit einem HIV-codierenden Plasmid transfiziert, welches eine Punktmutation in p6 (PTAP bis ATAP) enthielt. Kontroll-siRNA (Lamin A/C) wurde in Zellen in den Spuren 1 und 2 transfiziert. siRNA zu Tsg101 wurde in Spur 4 transfiziert und siRNA zu POSH in Spur 3.

[0041] Fig. 14: Maus-POSH mRNA-Sequenz (öffentliche gi:10946921; SEQ ID NO: 8)

[0042] Fig. 15: Maus-POSH-Proteinsequenz (öffentliche gi: 10949622; SEQ ID NO: 9)

[0043] Fig. 16: Drosphila melanogaster POSH-mRNA-Sequenz (öffentliche gi:17737480; SEQ ID NO: 10)

[0044] Fig. 17: Drosophila melanogaster POSH-Proteinsequenz (öffentliche gi:17737481; SEQ ID NO: 11)

[0045] Fig. 18: POSH-Domänenanalyse

[0046] Fig. 19: teilweiser Knockdown von menschlichem POSH resultiert in der Reduktion von 4-Logs der HIV-Infektiosität. Die Ergebnisse vom Infektiositätstest werden im Diagramm präsentiert. Die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz von infizierten Zielzellen und die horizontale Achse zeigt die wie vielfache Verdünnung der Virus- Stammlösungen verwendet wurde (siehe Beispiel 4 für Einzelheiten des Experiments). Die offenen Quadrate (oberste Zeile) zeigen die Resultate aus der Kontrolle an und die geschlossenen Quadrate (unterste Zeile) zeigen die Resultate aus der Transfektion der Zellen mit RNAi zu POSH.

[0047] Fig. 20: Menschliches POSH-Protein vermittelt sowohl PTAP- und PPEY-vermittelte virale Partikel-Freisetzung. Phosphor-Bilder von SDS-PAGE-Gelen von Immunpräzipitationen von 35S Pulse-Chase markierten Gag-Proteinen, werden für zelluläre und virale Lysate aus transfizierten HeLa-Zellen präsentiert. HeLa-Zellen wurden mit einem HIV-codierenden Plasmid und siRNA transfiziert. Von Links nach Rechts: das linke Feld wurde mit Wildtyp HIV-codierendem Plasmid transfiziert. Das mittlere Feld wurde mit einem HIV-codierenden Plasmid transfiziert, das eine Punktmutation (PPEE nach PPEY) enthält. Das rechte Feld wurde mit

einem HIV-codierenden Plasmid transfiziert, das eine Punktmutation in p6 (PTAP nach ATAP) enthält. Von oben nach unten: Kontroll-siRNA (Lamin A/C) wurde in Zellen im oberen Feld transfiziert. siRNA zu Tsg101 wurde in Zellen im mittleren Feld transfiziert und siRNA zu POSH wurde in Zellen im unteren Feld transfiziert. Die Zeit während der Chase-Periode (0, 1, 2, 4 und 8 Stunden nach dem Pulse) wird von links nach rechts für jedes Feld präsentiert.

[0048] Fig. 21: Deletion der RING-Domäne und der 4. SH3-Domäne von menschlichem POSH-Protein hemmt die Freisetzung von viralem HIV1-Partikel.

[0049] Fig. 22: Menschliches POSH hat Ubiquitin-Ligaseaktivität

[0050] Fig. 23: Menschliches POSH co-immunpräzipitiert mit RAC1

[0051] Fig. 24: Knockdown von menschlichem POSH schließt HIV-Viruspratikel in intrazelluläre Vesikel ein. HIV-Virusfreisetzung wurde durch Elektronenmikroskopie analysiert, nach siRNA und Volllängen HIV-Plasmid-transfektion. Reife Viren wurden von Zellen sezerniert, die mit HIV-Plasmid und nicht-relevanter siRNA transfiziert waren (Kontrolle, unteres Feld). Knockdown von Tsg101-Protein resultierte in einem Sprossungsdefekt, die freigesetzten Viren hatten einen unreifen Phänotyp (oberes Feld). Knockdown von hPOSH-Mengen resultierte in der Akkumulation von Viren innerhalb der Zelle in intrazellulären Vesikeln (mittleres Feld).

[0052] Fig. 25: Menschliches POSH lokalisiert an zwei Stellen; eine am Nucleus und eine im Golgi (C). Nach der HIV-Transfektion wird die POSH-Golgi-Lokalisierung verstärkt (D). HeLa- und 293T-Zellen wurden mit pNenv-1 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit primären Antikörpern gegen POSH inkubiert und entweder mit anti-p24-Gag (B) oder einem Organellenmarker wie folgt: BiP – Endoplasmatisches Retikulum (Daten nicht gezeigt), GM130 – Golgi, (C,D) Nucleoporin – Kernmatrix (E,F) und Histon H1 – Nucleus (Daten nicht gezeigt). Zwei unterschiedliche fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper wurden verwendet. Spezifische Signale wurden durch Laser-Scanning-Confokale Mikroskopie erhalten und einzelne Signale wurden überlagert, um ihre relativen Positionen zu bewerten. POSH ist im Nucleus (A) lokalisiert und teilweise gleichzeitig mit HIV-1-Gag und dem Golgi-Marker, wahrscheinlich in der nuclearen Matrix (B) nach Transfektion, außerhalb des Nucleus lokalisiert.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

1. Definitionen

[0053] Der Begriff „Bindung" bezieht sich auf eine direkte Assoziation zwischen zwei Molekülen, zum Beispiel aufgrund von kovalenten, elektrostatischen, hydrophoben, ionischen und/oder Wasserstoffbrücken-Interaktionen unter physiologischen Bedingungen.

[0054] „Zellen", „Wirtszellen" oder „rekombinante Wirtszellen" sind Begriffe, die hierin austauschbar verwendet werden. Es ist klar, dass sich solche Begriffe nicht nur auf eine spezielle betreffende Zelle beziehen, sondern auf den Nachkommen oder mögliche Nachkommen einer solchen Zelle. Da bestimmte Modifikationen in nachfolgenden Generationen entweder aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen stattfinden können, können solche Nachkommen tatsächlich nicht mit der Elternzelle identisch sein, aber noch immer innerhalb des Geltungsbereiches des Begriffes, wie er hierin verwendet wird, eingeschlossen sein.

[0055] Ein „chimäres Protein" oder „Fusionsprotein" ist eine Fusion von einer ersten Aminosäuresequenz, die ein Polypeptid codiert, mit einer zweiten Aminosäuresequenz, die eine Domäne definiert, die zu irgendeiner Domäne der ersten Aminosäuresequenz fremd und nicht wesentlich homolog damit ist. Ein chimäres Protein kann eine Fremd-Domäne darstellen, die in einem Organismus gefunden wird (obgleich in einem unterschiedlichen Protein), der auch das erste Protein exprimiert oder es kann eine „Interspezies-", „Intergen" usw. Fusion von Proteinstrukturen sein, die durch unterschiedliche Arten von Organismen exprimiert werden.

[0056] Die Begriffe „Verbindung", „Test-Verbindung" und „Molekül" werden hierin austauschbar verwendet und sollen Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate, kleine organische Moleküle, natürliche Produktextrakt-Banken und alle andere Moleküle (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Chemikalien, Metalle und organometallische Verbindungen) umfassen, sind aber nicht auf sie beschränkt.

[0057] Die Redewendung „konservative Aminosäuresubstitution" bezieht sich auf Gruppierungen von Aminosäuren auf der Basis von bestimmten allgemeinen Eigenschaften. Eine funktionelle Art die gemeinsamen Ei-

genschaften zwischen einzelnen Aminosäuren zu definieren, ist es die genormten Frequenzen von Aminosäureveränderungen zwischen entsprechenden Proteinen von homologen Organismen zu analysieren (Schulz, G. E. und R. H. Schirmer., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Gemäß solchen Analysen können Gruppen von Aminosäuren definiert werden, wobei Aminosäuren innerhalb einer Gruppe vorzugsweise miteinander austauschen und einander daher am meisten in der Wirkung auf die gesamte Proteinstruktur ähneln (Schulz, G.E. und R. H. Schirmer., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Beispiele von Aminosäuregruppen, die auf diese Weise definiert werden umfassen:

(i) eine geladene Gruppe, bestehend aus Glu und Asp, Lys, Arg und His,
(ii) eine positiv-geladene Gruppe, bestehend aus Lys, Arg und His,
(iii) eine negativ-geladene Gruppe, bestehend aus Glu und Asp,
(iv) eine aromatische Gruppe, bestehend aus Phe, Tyr und Trp,
(v) eine Stickstoffring-Gruppe, bestehend aus His und Trp,
(vi) eine große aliphatische nicht-polare Gruppe, bestehend aus Val, Leu und Ile,
(vii) eine leicht polare Gruppe, bestehend aus Met und Cys,
(viii) ein Gruppe mit kleinem Rest, bestehend aus Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gin und Pro,
(ix) eine aliphatische Gruppe, bestehend aus Val, Leu, Ile, Met und Cys, und
(x) eine kleine Hydroxylgruppe, bestehend aus Ser und Thr.

[0058] Zusätzlich zu den vorstehend präsentierten Gruppen kann jeder Aminosäurerest seine eigene Gruppe bilden und auf die Gruppe, die durch eine einzelne Aminosäure gebildet wird, kann einfach durch die ein- und/oder drei-Buchstaben-Abkürzung Bezug genommen werden, die im Allgemeinen im Fachgebiet für diese Aminosäure verwendet wird.

[0059] Ein „konservierter Rest" ist eine Aminosäure, die über den Bereich von ähnlichen Proteinen relativ invariable ist. Oft werden konservierte Reste nur variieren, indem sie durch eine ähnliche Aminosäure ersetzt werden, wie es vorstehend für „konservative Aminosäure-Substitution" beschrieben wurde.

[0060] Der Begriff „Domäne", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf eine Region von einem Protein, das eine spezielle Struktur umfasst und/oder eine besondere Funktion ausführt.

[0061] „Homologie" oder „Identität" oder „Ähnlichkeit" bezieht sich auf Sequenzähnlichkeit zwischen zwei Peptiden oder zwischen zwei Nucleinsäuremoleküle. Homologie und Identität können jeweils durch Vergleichen einer Position in jeder Sequenz bestimmt werden, die für Vergleichszwecke abgeglichen werden kann. Wenn eine äquivalente Position in den verglichenen Sequenzen durch die gleiche Base oder Aminosäure besetzt ist, dann sind die Moleküle an dieser Position identisch; wenn die äquivalente Stelle durch den gleichen oder einen ähnlichen Aminosäurerest (z.B. ähnlich in sterischer und/oder elektronischer Natur) besetzt ist, dann können die Moleküle an dieser Position als homolog (ähnlich) bezeichnet werden. Der Ausdruck als Prozentsatz der Homologie/Ähnlichkeit oder Identität bezieht sich auf eine Funktion der Zahl an identischen oder ähnlichen Aminosäuren an Positionen, die von den verglichenen Sequenzen geteilt werden. Eine Sequenz, die „nicht-verwandt" oder „nicht homolog" ist, teilt weniger als 40% Identität, obwohl vorzugsweise weniger als 25% Identität, mit einer Sequenz der vorliegenden Erfindung. Beim Vergleich von zwei Sequenzen vermindert die Abwesenheit von Resten (Aminosäuren oder Nucleinsäuren) oder die Anwesenheit von zusätzlichen Resten auch die Identität und Homologie/Ähnlichkeit.

[0062] Der Begriff „Homologie" beschreibt einen auf Mathematik basierenden Vergleich von Sequenzähnlichkeiten, der verwendet wird, um die Gene oder Proteine mit ähnlichen Funktionen oder Motiven zu identifizieren. Die Nucleinsäure- und Proteinsequenzen der vorliegenden Erfindung können als eine „Abfrage-Sequenz" verwendet werden, um eine Suche in öffentlichen Datenbanken durchzuführen, zum Beispiel um andere Familienmitglieder, verwandte Sequenzen oder Homolge zu identifizieren. Solche Recherchen können unter Verwendung von NBLAST und XBLAST-Programmen (Version 2.0) von Altschul, et al. (1990) J Mol. Biol. 215:403–10 durchgeführt werden. BLAST-Nucleiotidrecherchen können mit dem NBLAST-Programm durchgeführt werden, Punktezahl = 100, Wortlänge = 12, um Nucleotidsequenzen zu erhalten, die homolog zu den Nucleinsäuremolekülen der Erfindung sind. BLAST-Proteinrecherchen können mit dem XBLAST-Programm durchgeführt werden, Punktezahl = 50, Wortlänge = 3, um Aminosäuresequenzen zu erhalten, die homolog zu den Proteinmolekülen der Erfindung sind. Um für Vergleichszwecke Abgleichungen mit Leerplätzen zu erhalten, kann, wie beschrieben in Atschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389–3402, genützt werden. Wenn BLAST oder Gapped BLAST-Programme verwendet werden, können die Standard-Parameter der jeweiligen Programme (z.B. XBLAST und BLAST) verwendet werden. Siehe http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

[0063] Wie hierin verwendet, bedeutet „Identität" der Prozentsatz von identischen Nucleotid- oder Aminosäu-

reresten an den entsprechenden Posititonen in zwei oder mehreren Sequenzen, wenn die Sequenzen so abgeglichen sind, dass sie die Sequenzübereinstimmung maximieren, d.h. Leerstellen und Insertionen berücksichtigen. Identität kann leicht durch bekannte Verfahren berechnet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf jene, die beschrieben sind in (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., Hg. Oxford Univeristy Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Hg., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., und Griffin, H. G., Hrsg., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; und Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. und Devereux, J., Hrsg., M Stockton Press, New York, 1991; und Carillo, H., und Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Verfahren zur Bestimmung der Identität werden darüber hinaus entworfen, um die längste Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen zu ergeben. Darüber hinaus sind Verfahren zur Identitätsbestimmung in öffentlich erhältlichen Computerprogrammen kodifiziert. Computerprogramm-Verfahren zur Identitätsbestimmung zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf das GCG-Programmeinheit (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, und FASIA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215:403–410 (1990) und Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389–3402 (1997)). Das BLAST X Programm ist öffentlich von NCBI und anderen Quellen erhältlich (BLAST Handbuch, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403–410 (1990). Der gut bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann auch verwendet werden, um die Identität zu verwenden.

[0064] Der Begriff „Intron" bezieht sich auf einen Teil einer Nucleinsäure, der anfänglich in RNA transkribiert wird, aber später entfernt wird, sodass er größtenteils nicht in der prozessierten mRNA vertreten ist. Intronentfernung findet durch Reaktionen an den 5' und 3'-Enden statt, die üblicherweise als die 5'- bzw. 3'-Spleißstellen bezeichnet werden. Abwechselnde Verwendung von unterschiedlichen Spleiß-Stellen resultiert in Spleiß-Varianten. Ein Intron liegt nicht notwendigerweise zwischen zwei „Exons" oder Teilen, die für Aminosäuren codieren, sondern kann stattdessen zum Beispiel zwischen dem Promoter und dem ersten Exon liegen. Ein Intron kann selbst-spleißend sein oder kann zelluläre Komponenten benötigen, um aus der mRNA gespleißt zu werden. Ein „heterologes Intron" ist ein Intron, das in eine codierende Sequenz inseriert ist, die nicht naturgemäß mit der Codierungssequenz verbunden ist. Außerdem kann ein heterologes Intron ein im Allgemeinen natürliches Intron sein, worin ein oder beide Spleißstellen geändert worden sind, um eine gewünschte Qualität bereitzustellen, wie zum Beispiel erhöhte oder verminderte Spleiß-Effizienz. Heterologe Introns werden zum Beispiel oft inseriert, um die Expression eines Gens in einem heterologen Wirt zu verbessern, oder um die Produktion einer Spleiß-Variante um Vergleich mit einer anderen zu erhöhen. Als ein Beispiel kann das Kaninchen Beta-Globingen verwendet werden und ist im Handel auf dem pCI-Vektor von Promega Inc. erhältlich. Andere beispielhafte Introns werden in Lacy-Hulbert et al. (2001) Gene Ther 8(8):649–53 bereitgestellt.

[0065] Der Begriff „isoliert", wie er hierin mit Bezug auf die Testproteine und Proteinkomplexe verwendet wird, bezieht sich auf eine Protein- oder Proteinkomplex-Präparation, die im Wesentlichen frei von kontaminierenden Proteinen ist, die normalerweise mit dem Protein oder Proteinkomplex vorhanden sein würden, z.B. in dem zellulären Milieu in welchem das Protein oder der Komplex endogen festgestellt wird. Ein isolierter Proteinkomplex wird daher aus zellulären Komponenten isoliert, welche die Untersuchung des Komplexes der isoliert wird normalerweise „kontaminieren" oder stören würden, zum Beispiel während nach Modulatoren davon gesucht wird. Es muss einem jedoch klar sein, dass ein solcher „isolierter" Komplex andere Proteine beinhalten kann, deren Modulation durch das betreffende Protein oder den Proteinkomplex untersucht wird.

[0066] Der Begriff „isoliert", wie er hierin mit Bezug auf Nucleinsäuren, wie zum Beispiel DNA oder RNA verwendet wird, bezieht sich auf Moleküle in einer Form, die nicht in der Natur vorkommt. Darüber hinaus soll eine „isolierte Nucleinsäure" Nucleinsäurefragmente umfassen, die nicht natürlich als Fragmente vorkommen und nicht in einem Naturzustand gefunden werden würden.

[0067] Lentiviren umfassen Primaten-Lentiviren, z.B. menschliche Immundefizienz Virustypen 1 und 2 (HIV-1/HIV-2); Simian Immundefizienzvirus (SIV) aus Schimpansen (SIVcpz), Sooty Mangabey (SiVsmm), Afrikanische Grüne Affen (SIVagm), Syke's Affen (SIVsyk), Mandrill (SIVmnd) und Macacken (SIVmac). Lentiviren umfassen auch Katzen-Lentiviren, z.B. Katzen-Immundefizienzvirus (FIV); Rinder-Lentiviren, z.B. Rinder-Immundefizienzvirus (BIV); Schaf-Lentiviren, z.B. Maedi/Visna-Virus (MVV) und Ziegen-Arthritis Encephalits-Virus (CAEV); und Pferde-Lentiviren, z.B. infektiöses Pferde-Anämievirus (EIAV). Alle Lentiviren exprimieren mindestens zwei zusätzliche regulatorische Proteine (Tat, Rev) zusätzlich zu den Gag, Pol und Env-Proteinen. Primaten-Lentiviren produzieren andere zusätzliche Proteine, einschließlich Nef, Vpr, Vpu, Vpx und Vif. Im Allgemeinen sind Lentiviren die ursächlichen Erreger einer Vielfalt von Krankheiten, zusätzlich zur Immundefizienz, einschließlich neurologischer Degeneration und Arthritis. Nucleotidsequenzen der verschiedenen Lentiviren können in Genbank unter den folgenden Hinterlegungsnummern gefunden werden (aus J. M. Coffin,

S. H. Hughes und H. E. Varmus, „Retroviren". Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, S. 804): 1) HIV-1: K03455, M19921, K02013, M38431, M38429, K02007 und M17449; 2) HIV-2: M30502, J04542, M30895, J04498, M15390, M31113 und 107625; 3) SIV:M29975, M30931, M58410, M66437, 106042, M33262, M19499, M32741, M31345 und 103295; 4) FIV: M25381, M36968 und UI 1820; 5) BIV: M32690; 6) E1AV: M16575, M87581 und U01866; 6) Visna: M10608, M51543, 106906, M60609 und M60610; 7) CAEV: M33677; und 8) Schaf-Lentivirus M31646 und M34193. Lentivirus-DNA kann auch von der American Type Culture Collection (ATCC) erhalten werden. Zum Beispiel ist Katzenimmundefizienzvirus unter der ATCC-Hinterlegungsnummer VR-2333 und VR-3112 erhältlich. Infektiöses Pferde-Anämievirus A ist unter der ATCC- Hinterlegungsnummer VR-778 erhältlich. Ziegen-Arthritis-Encephalitisvirus ist unter der ATCC- Hinterlegungsnummer VR-905 erhältlich. Visna-Virus ist unter der ATCC- Hinterlegungsnummer VR-779 erhältlich. Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „Nucleinsäure" auf Polynucleotide wie zum Beispiel Desoxyribonucleinsäure (DNA) und wo angebracht auf Ribonucleinsäure (RNA). Der Begriff sollte auch so verstanden werden, dass er als Äquivalente, Analoge von entweder RNA oder DNA umfasst, die aus Nucleotidanalogen gemacht sind, und, wenn für die beschriebenen Ausführungsform zutreffend, einzelsträngige (wie zum Beispiel Sense oder Antisense) und doppelsträngige Polynucleotide.

[0068] Der Begriff „Reifung", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Prozessierung von viralen Proteinen, die zum Abschnüren von entstehenden Virionen aus der Zellmembran führen.

[0069] Ein „Membran-assoziiertes Protein" soll Proteine umfassen, die integrale Membranproteine sind, sowie auch Proteine, die fest mit einer Membran verbunden sind.

[0070] Der Begriff „p6" oder p6gag" wird hierin verwendet, um auf ein Protein zu verweisen, das eine virale L-Domäne umfasst. Antikörper, die an eine p6-Domäne binden, werden als „anti-p6-Antikörper" bezeichnet. P6 verweist auch auf Proteine, die künstlich erzeugte L-Domänen umfassen, zum Beispiel einschließlich L-Domänen umfassend eine Reihe an L-Motiven. Der Begriff „Gag-Protein" oder „Gag-Polypeptid" verweist auf ein Polypeptid, das Gag-Aktivität aufweist und umfasst vorzugsweise eine L (oder späte) Domäne. Beispielhafte Gag-Proteine umfassen ein Motiv wie zum Beispiel PXXP, PPXY, RXXPXXP, RPDPTAP, RPLPVAP, RPEPTAP, YEDL, PTAPPEY und/oder RPEPTAPPEE. HIV-p24 ist ein beispielhaftes Gag-Polypeptid.

[0071] Eine „POSH-Nucleinsäure" ist eine Nucleinsäure, umfassend eine Sequenz, wie sie in irgendeiner der SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 6, 8 und 10 sowie in irgendeiner der hierin beschriebenen Varianten dargestellt wird.

[0072] Ein „POSH-Polypeptid" oder „POSH-Protein" ist ein Polypeptid, umfassend eine Sequenz, wie sie in irgendeiner der SEQ ID NOs: 2, 5, 7, 9 und 11 sowie in irgendeiner der hierin beschriebenen Variationen dargestellt wird.

[0073] Ein „POSH-assoziiertes Protein" oder „POSH-AP" bezieht sich auf ein Protein, das im Stande ist mit einem POSH-Polypeptid zu interagieren und/oder daran zu binden. Im Allgemeinen kann das POSH-AP direkt oder indirekt mit dem POSH-Polypeptid interagieren. Beispielhafte POSH-APs werden überall bereitgestellt.

[0074] Ein „Profil" wird hierin verwendet, um ein Informationsaggregat im Hinblick auf eine Zellpräparation oder Membran-Oberflächenproteine anzuzeigen. Ein Profil wird zumindest Information bezüglich der Anwesenheit oder Abwesenheit solcher Proteine umfassen. Üblichererweise wird ein Profil Information bezüglich der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Vielzahl solcher Proteine umfassen. Außerdem kann ein Profil andere Information über jedes identifizierte Protein enthalten, wie zum Beispiel relative oder absolute Mengen an vorhandenem Protein, Grad an posttranslationeller Modifikation, Membrantopologie, dreidimensionale Struktur, Isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht usw. Ein „Test-Profil" ist ein Profil, das von einer Testperson von unbekanntem diagnostischem Zustand erhalten wurde. Ein „Referenz-Profil" ist ein Profil, das von einer Testperson erhalten wurde, von der feststeht, dass sie infiziert oder nicht infiziert ist.

[0075] Die Begriffe Peptide, Proteine und Polypeptide werden hierin austauschbar verwendet.

[0076] Der Begriff „gereinigtes Protein" bezieht sich auf eine Präparation eines Proteins oder von Proteinen, die vorzugsweise isoliert werden aus, oder auf andere Weise im Wesentlichen frei sind von anderen Proteinen, die normalerweise mit dem (den) Protein(en) in einer Zelle oder einem Zelllysat assoziiert sind. Der Begriff „im Wesentlichen frei von anderen zellulären Proteinen" (hierin auch bezeichnet als „im Wesentlichen frei von anderen kontaminierenden Proteinen") wird definiert, dass er einzelne Präparationen von jeder der Komponenten-Proteine einschließt, umfassend weniger als 20% (Trockengewicht) kontaminierendes Protein, und vorzugsweise weniger als 5% kontaminierendes Protein umfasst. Funktionelle Formen von jedem der Protein-

komponenten können, wie in den beigefügten Beispielen beschrieben, als gereinigte Präparationen unter Verwendung eines clonierten Gens erzeugt werden. Mit „gereinigt" wird gemeint, wenn Bezug auf Komponenten-Proteinpräparationen genommen wird, die verwendet werden, um ein Proteingemisch zu rekonstituieren, dass das angezeigte Molekül im wesentlichen in Abwesenheit von anderen biologischen Makromolekülen, wie zum Beispiel anderen Proteinen (insbesondere anderen Proteinen, welche die Eigenschaften des Komponentenproteins, entweder als gereinigte Präparationen oder in ihrer Funktion in dem rekonstituierten Testgemisch im Wesentlichen maskieren, vermindern, undeutlich machen oder ändern) anwesend ist. Der Begriff „gereinigt", wie er hierin verwendet wird, bedeutet vorzugsweise mindestens 80% nach dem Trockengewicht, stärker bevorzugt im Bereich von 85 Gewichtsprozent, mehr bevorzugt 95–99 Gewichtsprozent und am meisten bevorzugt mindestens 99,8 Gewichtsprozent der biologischen Makromoleküle des gleichen vorhandenen Typs (aber Wasser, Puffer und andere kleine Moleküle, besonders Moleküle, die ein Molekulargewicht von weniger als 5000 aufweisen, können vorhanden sein). Der Begriff „rein", wie er hierin verwendet wird, hat vorzugsweise die gleichen numerischen Begrenzungen wie das gleich vorherstehende „gereinigt".

[0077] Ein „Rezeptor" oder „Protein, das Rezeptorfunktion aufweist" ist ein Protein, das mit einem extrazellulären Liganden interagiert oder einem Liganden, der innerhalb der Zelle liegt, aber in einem Raum, der topologisch äquivalent ist zum extrazellulären Raum (z.B. innerhalb des Golgi, innerhalb des endoplasmatischen Reticulums, innerhalb der nuklearen Membran, innerhalb eines Lysosoms oder Transportvesikels usw.). Beispielhafte Rezeptoren werden hierin durch Anmerkungen als solche in verschiedenen öffentlichen Datenbanken identifiziert. Rezeptoren weisen oft Membrandomänen auf.

[0078] Eine „rekombinante Nucleinsäure" ist jede Nucleinsäure, die durch rekombinante DNA-Techniken neben eine andere Nucleinsäure platziert worden ist. Eine „rekombinante Nucleinsäure" umfasst auch jede Nucleinsäure, die durch eine genetische Labortechnik, wie zum Beispiel Transformation und Integration, Transposon-Hopping oder virale Insertion, neben eine zweite Nucleinsäure platziert worden ist. Im Allgemeinen liegt eine rekombinante Nucleinsäure normalerweise nicht neben der zweiten Nucleinsäure.

[0079] Der Begriff „rekombinantes Protein" bezieht sich auf ein Protein der vorliegenden Erfindung, das durch rekombinante Techniken erzeugt wurde, wobei im Allgemeinen DNA, die das exprimierte Protein codiert, in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert wird, der dann verwendet wird, um eine Wirtszelle zu transformieren, um das heterologe Protein zu erzeugen. Darüber hinaus soll die Redewendung „stammend von", mit Bezug auf eine rekombinantes Gen, welches das rekombinante Protein codiert, bedeuten, dass es innerhalb der Bedeutung eines „rekombinanten Proteins" jene Proteine enthält, die eine Aminosäuresequenz eines nativen Proteins aufweisen oder eine Aminosäuresequenz, die ähnlich dazu ist, die durch Mutationen, einschließlich Substitutionen und Deletionen von natürlich vorkommenden Protein, erzeugt wird.

[0080] Eine „RING-Domäne" oder „Ring-Finger" ist eine Zink-bindende Domäne, mit einem definierten Oktett an Cystein und Histidinresten. Bestimmte RING-Domänen umfassen die Konsensussequenzen, wie sie nachstehend dargelegt sind (Aminosäure-Nomenklatur wird in Tabelle 1 dargelegt): Cys Xaa Xaa Cys Xaa_{10-20} Cys Xaa His Xaa_{2-5} Cys Xaa Xaa Cys Xaa_{13-50} Cys Xaa Xaa Cys
or Cys Xaa Xaa Cys Xaa_{10-20} Cys Xaa His Xaa_{2-5} His Xaa Xaa Cys Xaa_{13-50} Cys Xaa Xaa Cys.

[0081] Bestimmte RING-Domänen werden als Aminosäuresequenzen dargestellt, die mindestens 80% identisch sind zu den Aminosäuren 12–52 der SEQ ID NO: 2 wie sie in SEQ ID NO: 26 dargelegt ist. Bevorzugte RING-Domänen sind 85%, 90%, 95%, 98% und am meisten bevorzugt 100% identisch mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 26. Bevorzugte RING-Domänen der Erfindung binden an verschiedene Proteinpartner, um einen Komplex zu bilden, der Ubiquitin-Ligaseaktivität aufweist. RING-Domänen interagieren vorzugsweise mit mindestens einem der folgenden Proteintypen: F-Box-Proteine, E2 Ubiquintin-konjugierende Enzyme und Culline.

[0082] Der Begriff „RNA-Interferenz" oder „RNAi" bezieht sich auf jedes Verfahren, durch welches die Expression eines Gens oder Genproduktes durch das Einführen von einer oder mehrerer doppelsträngiger RNAs, die homolog mit dem Gen von Interesse sind (insbesondere zu der Messenger RNA des Gens von Interesse), in eine Zielzelle vermindert wird.

[0083] „Kleine Moleküle", wie hierin verwendet, soll sich auf eine Zusammensetzung beziehen, die ein Molekulargewicht von weniger als etwa 5 kD aufweist und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 2,5 kD. Kleine Moleküle können Nucleinsäuren, Peptide, Polypeptide, Peptidomimetika, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische (Kohlenstoff enthaltende) oder anorganische Moleküle sein. Viele Pharmafirmen haben umfassende Banken an chemischen und/oder biologischen Gemischen, umfassend Anordnungen von kleinen Molekü-

len, oft Pilz-, bakterielle, oder Algenextrakte, die mit jedem der Tests der Erfindung durchmustert werden können.

[0084] Eine „SH3"- oder „Src Homologie 3"-Domäne ist eine Proteindomäne, von im Allgemeinen etwa 60 Aminosäureresten, die zuerst als eine konservierte Sequenz in dem nicht-katalytischen Teil von verschiedenen cytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen (z.B. Src, Abi, Lck) identifiziert wurde. SH3-Domänen vermitteln den Zusammenbau von spezifischen Proteinkomplexen über die Bindung an Prolin-reiche Peptide. Beispielhafte SH3-Domänen werden durch die Aminosäuren 137–192, 199–258, 448–505 und 832–888 von SEQ ID NO: 2 dargestellt und sind in den SEQ ID NOs: 27–30 dargelegt. In bestimmten Ausführungsformen interagiert eine SH3-Domäne mit einer Konsensussequenz von RXaaXaaPXaaX6P (wobei X6, wie in der Tabelle nachstehend definiert, eine hydrophobe Aminosäure darstellt). In bestimmten Ausführungsformen interagiert eine SH3-Domäne mit einer oder mehreren der folgenden Sequenzen: P(T/S)AP, PFRDY, RPEPTAP, RQGPKEP, RQGPKEPFR, RPEPTAPEE und RPLPVAP. In bevorzugten Ausführungsformen interagiert die 4. SH3-Domäne, wie sie in SEQ ID NO: 30 dargelegt ist, mit einem oder mehreren Gag-Polypeptiden.

[0085] Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „hybridisiert spezifisch" auf die Fähigkeit eine Nucleinsäuresonde/Primer der Erfindung an mindestens 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 oder 100 aufeinander folgende Nucleotide einer POSH-Sequenz zu hybridisieren, oder einer Sequenz, die dazu komplementär ist, oder natürlich vorkommenden Mutanten davon, sodass sie weniger als 15%, vorzugsweise weniger als 10% und stärker bevorzugt weniger als 5% Hintergrundshybridisierung zu einer anderen zellulären Nucleinsäure als dem POSH-Gen aufweist (z.B. mRNA oder genomische DNA). Eine Vielzahl an Hybridisierungsbedingungen kann verwendet werden, um spezifische Hybridisierung nachzuweisen und die Stringenz wird hauptsächlich durch den Waschschritt des Hybridisierungstests bestimmt. Im Allgemeinen ergeben hohe Temperaturen und niedrige Salzkonzentrationen hohe Stringenz, während niedrige Temperaturen und hohe Salzkonzentrationen niedrige Stringenz ergeben. Hybridisierung mit niedriger Stringenz wird z.B. durch Waschen in etwa 2,0 × SSC bei 50°C erzielt und hohe Stringenz wird mit etwa 0,2 × SSC bei 50°C erzielt. Weitere Beschreibungen der Stringenz werden nachstehend bereitgestellt.

[0086] Wenn auf Polypeptide angewandt, bedeutet „erhebliche Sequenzidentität", dass zwei Peptidsequenzen, wenn sie optimal abgeglichen sind, wie zum Beispiel durch die Programme GAP oder BESTFIT unter Verwendung einer Standard-Leerstelle, mindestens 90% Sequenzidentität teilen, vorzugsweise mindestens 95% Sequenzidentität, stärker bevorzugt mindestens 99% Sequenzidentiät und mehr. Vorzugsweise unterscheiden sich Restpositionen, die nicht identisch sind durch konservative Aminosäuresubstitutionen. Zum Beispiel wirken sich die Substitutionen von Aminosäuren, die ähnliche chemische Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel Ladung oder Polarität, wahrscheinlich nicht auf die Eigenschaften eines solchen Proteins aus. Beispiele umfassen Glutamin statt Asparagin oder Glutaminsäure statt Asparaginsäure.

[0087] „Transkriptionelle regulatorische Sequenz" ist ein generischer Begriff, der in der gesamten Beschreibung verwendet wird, um auf DNA-Sequenzen, wie zum Beispiel Initiationsignale, Enhancer und Promotoren hinzuweisen, welche die Transkription von Protein-Codierungssequenzen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, induzieren oder kontrollieren. In bevorzugten Ausführungsformen steht die Transkription eines rekombinanten Proteingens unter der Kontrolle einer Promotorsequenz (oder anderen transkriptionellen regulatorischen Sequenz), welche die Expression eines rekombinanten Gens in einem Zelltyp kontrolliert, in welchem die Expression vorgesehen ist. Es wird auch offensichtlich sein, dass das rekombinante Gen unter der Kontrolle der transkriptionellen regulatorischen Sequenzen stehen kann, die gleich oder unterschiedlich zu jenen Sequenzen sind, welche die Transkription der natürlich vorkommenden Proteinform kontrollieren.

[0088] Wie es hierin verwendet wird, ist ein „transgenes Tier" jedes Tier, vorzugsweise ein nicht-menschlicher Säuger, Vogel oder ein Amphibie, in welcher ein oder mehrere der Zellen des Tieres heterologe Nucleinsäuren enthalten, die durch menschliche Intervention eingeführt wurden, wie zum Beispiel durch transgene Techniken, die im Fachgebiet gut bekannt sind. Die Nucleinsäure wird, direkt oder indirekt durch Einführung in eine Vorläuferzelle, mittels überlegter genetischer Manipulation, wie zum Beispiel durch Mikroinjektion oder durch Infektion mit einem rekombinanten Virus in die Zelle eingeführt. Der Begriff genetische Manipulation umfasst keine klassische Kreuzung oder in vitro Fertilisation, sondern ist eher auf das Einführen eines rekombinanten DNA-Moleküls gerichtet. Dieses Molekül kann innerhalb eines Chromosoms integriert sein, oder es kann extrachromosomal replizierende DNA darstellen. In den typischen hierin beschriebenen transgenen Tieren, veranlasst das Transgen die Zellen ein rekombinantes menschliches POSH-Protein zu exprimieren. Die „nicht-menschlichen Tiere" der Erfindung umfassen Wirbeltiere wie zum Beispiel Nager, nicht-menschliche Primaten, Schaf, Hund, Rind, Hühner, Amphibien, Reptilien usw. Bevorzugte nicht-menschliche Tiere werden aus der Nagerfamilie ausgewählt, einschließlich Ratte und Maus, am stärksten bevorzugt Maus, obwohl auch

transgene Amphibien, wie zum Beispiel Mitglieder der Xenopus-Gattung und transgene Hühner wichtige Werkzeuge zum Verstehen und Identifizieren von Mitteln sein können, die zum Beispiel die Embryogenese und Gewebebildung beeinflussen. Der Begriff „chimäres Tier" wird hierin verwendet, um auf Tiere zu verweisen, in welchen das rekombinante Gen festgestellt wird, oder in welchen die Rekombinante in manchen, aber nicht in allen Zellen des Tieres exprimiert wird. Der Begriff „Gewebe-spezifisches chimäres Tier" deutet an, dass die rekombinanten menschlichen POSH-Gene in manchen Geweben vorhanden sind und/oder exprimiert werden, aber nicht in anderen.

[0089] Wie er hierin verwendet wird, bedeutet der Begriff „Transgen" eine Nucleinsäuresequenz (die z.B. menschliche POSH-Polypeptide codiert), die für das transgene Tier oder die Zelle in die es eingeführt wird, teilweise oder völlig heterolog ist, d. h. fremd ist oder homolog zu einem endogenen Gen des transgenen Tiers oder der Zelle ist, in die es eingeführt wird, die aber entworfen wurde, um so in das tierische Genom inseriert zu werden, oder so inseriert ist, dass sie das Genom der Zelle ändert in welche sie inseriert wird (z.B. wird sie an einer Stelle inseriert, die sich von der des natürlichen Gens unterscheidet oder ihre Insertion resultiert in einem Knockout). Ein Transgen kann ein oder mehrere transkriptionelle regulatorische Sequenzen umfassen und jede andere Nucleinsäure, wie zum Beispiel Introns, die für die optimale Expression einer ausgewählten Nucleinsäure notwendig sein könnten.

[0090] Wie gut bekannt ist, können Gene für ein bestimmtes Polypeptid in einzelnen oder vielfachen Kopien innerhalb des Genoms eines Individuums vorliegen. Solche Duplikatgene können identisch sein, oder bestimmte Modifikationen aufweisen, einschließlich Nucleotidsubstitutionen, Additionen oder Deletionen, die alle noch für Polypeptide codieren, die im Wesentlichen die gleiche Aktivität aufweisen.

[0091] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Vektor" auf ein Nucleinsäuremolekül, das im Stande ist eine andere Nucleinsäure, mit der es verbunden worden ist, zu transportieren. Eine Art von bevorzugtem Vektor ist ein Episom, d.h. eine Nucleinsäure, die zur extra-chromosomalen Replikation im Stande ist. Bevorzugte Vektoren sind jene, die zur autonomen Replikation und/Expression von Nucleinsäuren im Stande sind, mit denen sie verbunden sind. Vektoren, die im Stande sind die Expression von Genen zu lenken, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, werden hierin als „Expressionsvektoren" bezeichnet. Im Allgemeinen liegen Expressionsvektoren, die in rekombinanten DNA-Techniken nützlich sind, oft in der Form von „Plasmiden" vor, die sich auf doppelsträngige DNA-Schlaufen beziehen, die in ihrer Vektorform nicht an das Chromosom gebunden sind. In der vorliegenden Beschreibung werden „Plasmid" und „Vektor" austauschbar verwendet, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Form von Vektor ist. Die Erfindung soll jedoch solche anderen Arten von Expressionsvektoren umfassen, die äquivalenten Funktionen dienen und die im Fachgebiet in der Folge hierzu bekannt werden.

[0092] Ein „Virion" ist ein vollständiges virales Partikel; Nucleinsäure und Kapsid (und in manchen Viren eine flüssige Hülle).

Tabelle 1: Abkürzungen für Aminosäureklassen*

Symbol	Kategorie	Vertretene Aminosäure
X1	Alkohol	Ser, Thr
X2	Aliphatisch	Ile, Leu, Val
Xaa	Irgendeine	Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr
X4	Aromatisch	Phe, His, Trp, Tyr
X5	Geladen	Asp, Glu, His, Lys, Arg
X6	Hydrophob	Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Trp, Tyr
X7	Negativ	Asp, Glu
X8	Polar	Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr
X9	Positiv	His, Lys, Arg
X10	Klein	Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val
X11	Winzig	Ala, Gly, Ser
X12	Bogenähnlich	Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr
X13	Asparagin-Aspartat	Asn, Asp

*Abkürzungen, wie übernommen von http://smart.embl-heidelberg.de/SMART_DATA/alignments/consensus/grouping.html.

2. Überblick

[0093] In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung neue menschliche POSH-Nucleinsäuren und Proteine und verwandte Verfahren und Zusammensetzungen. In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung neue Verbindungen zwischen bestimmten Krankheitsstadien und POSH-Nucleinsäuren und Proteinen. POSH kreuzt und reguliert eine große Auswahl an zellulären Schlüsselfunktionen, die durch Beeinflussung der Menge an und/oder Aktivität der POSH-Polypeptide manipuliert werden können. In bestimmten Aspekten stellt die vorliegende Erfindung, durch Identifizieren des menschlichen POSH-Gens, Verfahren zur Identifizierung von Krankheiten bereit, die mit Defekten im POSH-Gen in Zusammenhang stehen und Verfahren, zur Verbesserung solcher Erkrankungen. In weiteren Aspekten stellt die Erfindung Nucleinsäuremittel bereit (z.B. RNAi-Sonden, Antisense), mit Antikörper in Zusammenhang stehende Mittel, kleine Moleküle und andere Mittel, welche die POSH-Funktion beeinflussen. Andere Aspekte und Ausführungsformen werden hierin beschrieben.

[0094] In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung die Entdeckung, dass bestimmte POSH-Polypeptide als E3-Enzyme im Ubiquitinierungssystem wirken. Demgemäß kann die Hinunterregulation oder Hinaufregulation von POSH-Ubiquitinligaseaktivität verwendet werden, um biologische Prozesse zu manipulieren, die durch Protein-Ubiquitinierung beeinflusst werden. Hinunterregulation oder Hinaufregulation kann bei jedem Schritt der POSH-Bildung und Regulation erzielt werden, einschließlich transkriptioneller, translationeller oder post-translationeller Regulation. Zum Beispiel können POSH-Transkriptmengen durch RNAi vermindert werden, die auf eine POSH-Gensequenz abzielt. Als ein anderes Beispiel kann POSH-Ubiquitin-Ligaseaktivität durch Inkontaktbringen von POSH mit einem Antikörper gehemmt werden, der an die POSH-RING-Domäne bindet und damit interferiert oder eine Domäne von POSH, welche die Interaktion mit einem Zielprotein (einem Protein, das mindestens teilweise aufgrund von POSH-Aktivität ubiquitiniert wird) vermittelt. Als ein anderes Beispiel kann POSH-Aktivität erhöht werden, indem die POSH-Expression erhöht wird oder ein aktiver Teil davon. Eine Ubiquitinligase, wie zum Beispiel POSH, kann an biologischen Prozessen teilnehmen, einschließlich zum Beispiel an einem oder mehreren verschiedenen Stadien des viralen Lebenszyklus, wie zum Beispiel Viruseintritt in eine Zelle, Produktion von viralen Proteinen, Zusammenbau von viralen Proteinen und Freisetzung von viralen Partikeln aus der Zelle. POSH kann an Erkrankungen teilhaben, die durch die Akkumulierung

von ubiquitinierten Proteinen gekennzeichnet ist, wie zum Beispiel Demenzen (z.B. Alzheimer und Pick's), Einschlusskörper Myositis und Myopathien, Polyglucosankörper-Myopathie und bestimmte Formen von amyotropher lateraler Sklerose. POSH kann an Krankheiten teilhaben, die durch übermäßige oder unpassende Ubiquitinierung und/oder Proteinabbau gekennzeichnet sind. Außerdem kann POSH an onkologischen Prozessen teilhaben, wie zum Beispiel dem Versagen der Zellteilungs-Kontrollsysteme, dem Versagen der regulatorischen Systeme von Zelltod und dem Versagen überaktiver Oncogene herunterzuregulieren, wie zum Beispiel hyperaktiven Membran-gebundenen Wachstumsfaktorrezeptoren. Indem bestimmte POSH-Polypeptide als Ubiquitinligasen identifiziert wurden, erlauben Aspekte der vorliegenden Erfindung einem Fachmann Krankheiten zu identifizieren, die mit einer geänderten POSH-Ubiquitin-Ligaseaktivität in Zusammenhang stehen.

[0095] In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung die Entdeckung, dass bestimmte POSH-Polypeptide an der viralen Reifung, einschließlich der Produktion, Prozessierung nach der Translation, Zusammenbau und/oder Freisetzung von Proteinen in einem Viruspartikel beteiligt sind. Demgemäß können virale Infektionen durch Hemmung einer Aktivität verbessert werden (z.B. Ubiquitin-Ligaseaktivität oder Zielprotein-Interaktion) von POSH und in bevorzugten Ausführungsformen ist das Virus ein Virus, das ein Gag-Protein verwendet, wie zum Beispiel HIV, SIV, Ebola oder funktionelle Homologe, wie zum Beispiel VP40 für Ebola. Weitere Virusarten werden nachstehend genauer beschrieben. In einer Ausführungsform bindet eine SH3-Domäne von POSH an eine virale Gag-Sequenz, die durch eine Konsensussequenz P(T/S)AP, RXXP(T/S)AP oder PXXDY dargestellt wird, wie zum Beispiel die PTAP oder PFRDY-Sequenzen von HIV-Gag (positioniert zum Beispiel bei 455–458 bzw. 292–296). In bestimmten Fällen ist eine Abnahme einer POSH-Funktion für Zellen tödlich, die mit einem Virus infiziert sind, welches POSH bei der Freisetzung der viralen Partikel verwendet. Während man nicht an einen Mechanismus gebunden sein möchte, scheint der Verlust der POSH-Funktion in solchen Zellen, durch eine Überakkumulation von viralen Partikeln oder Teilen davon in einer Zelle, zu Zelltod führen. In bestimmten Ausführungsformen kann die Hemmung einer POSH-Aktivität z.B. durch siRNA-Knockdown verwendet werden, um infizierte Zellen zu zerstören, sogar Zellen, die fast kein latentes Virus aufweisen, da solche Zellen durch die mögliche Überakkumulierung von viralen Partikeln oder Teilen davon sterben werden.

[0096] In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung die Entdeckung, dass hPOSH mit Rac, einer kleinen GTPase, interagiert. Rho, Rac und Cdc42 wirken gemeinsam, um die Organisation des Aktin-Cytoskellets und den JNK MAP-Kinaseweg zu regulieren. Ectopische Expression von Maus-POSH („mPOSH") aktiviert den JNK-Weg und verursacht nukleare Lokalisierung von NF-κB. Überexpression von mPOSH in Fibroblasten stimuliert die Apoptose. (Tapon et al. (1998) EMBO J. 17:1395–404). In Drosophila kann POSH mit der Signalübertragung einer anderen GTPase, Ras, interagieren oder sie auf andere Weise beeinflussen. (Schnorr et al. (2001) Genetics 159:609–22). Der JNK-Signalweg und NF-κB reguliert eine Vielzahl an Schlüsselgenen, die zum Beispiel an Immunantworten, Entzündung, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind. Zum Beispiel reguliert NF-κB die Produktion von Interleukin 1, Interleukin 8, Tumornekrosefaktor und vielen Zell-Adhäsionsmolekülen. NF-κB hat sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Rollen in der Zelle (z.B. im FAS-induzierten Zelltod bzw. TNF-alpha-Signalweg). NF-κB wird negativ reguliert, teilweise durch die Inhibitorproteine IκBα und IκBβ (gemeinsam bezeichnet als „IκB"). Phosphorylierung von IκB erlaubt die Aktivierung und nukleare Lokalisierung von NF-κB. Phosphorylierung von IκB löst seinen Abbau durch das Ubiquitinsystem aus. In noch einer weiteren Ausführungsform stimuliert ein POSH-Polypeptid demgemäß den JNK-Signalweg. In einer zusätzlichen Ausführungsform fördert ein POSH-Polypeptid die nukleare Lokalisierung von NF-κB. In weiteren Ausführungsformen kann die Manipulation von POSH-Mengen und/oder Aktivitäten verwendet werden, um Apoptose zu regulieren. Durch Hinaufregulation von POSH kann Apoptose in bestimmten Zellen stimuliert werden und das wird im Allgemeinen in Zuständen wünschenswert sein, die durch übermäßige Zellproliferation gekennzeichnet sind (z.B. in bestimmten Krebsarten). Durch Hinunterregulieren von POSH kann die Apoptose in bestimmten Zellen vermindert werden und das wird im Allgemeinen in Zuständen wünschenswert sein, die durch übermäßigen Zelltod gekennzeichnet sind, wie zum Beispiel Myokardinfarkt, Schlaganfall, degenerative Erkrankungen von Muskeln und Nerven und zur Organbewahrung vor der Transplantation. In einer weiteren Ausführungsform verbindet sich ein POSH-Polypeptid mit einem vesikulären Trafficking-Komplex, wie zum Beispiel einem Clathrin- oder Coatomer-enthaltenden Komplex und insbesondere einem Trafficking-Komplex, der im Nucleus und/oder Golgi-Apparat lokalisiert ist.

3. Beispielhafte Nucleinsäuren und Expressionsvektoren

[0097] In bestimmten Aspekten stellt die Erfindung Nucleinsäuren bereit, die POSH-Polypeptide codieren, SEQ ID NO: 2. Nucleinsäuren der Erfindung sind menschliche POSH-Sequenzen, SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3.

[0098] Ein Fachmann wird leicht verstehen, dass geeignete Stringenzbedingungen, die DNA-Hybridisierung

fördern, variiert werden können. Zum Beispiel könnte man die Hybridisierung bei 6,0 × Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) bei etwa 45°C durchführen, gefolgt von einer Waschung mit 2,0 × SSC bei 50°C. Die Salzkonzentrationen im Waschschritt können zum Beispiel aus einer niedrigen Stringenz von etwa 2.0 × SSC bei 50°C bis zu einer hohen Stringenz von etwa 0,2 × SSC bei 50°C ausgewählt werden. Außerdem kann die Temperatur im Waschschritt von niedrigen Bedingungen mit niedriger Stringenz bei Raumtemperatur, etwa 22°C, zu Bedingungen mit hoher Stringenz, bei etwa 65°C, erhöht werden. Sowohl Temperatur als auch Salz kann variiert werden, oder Temperatur- oder Salzkonzentrationen können konstant gehalten werden, während die andere Variable verändert wird. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung Nucleinsäuren bereit, die unter Bedingungen von niedriger Stringenz von 6 × SSC bei Raumtemperatur hybridisieren, gefolgt von einer Waschung bei 2 × SSC bei Raumtemperatur.

[0099] Eine POSH-Nucleinsäure der Erfindung wird in einer Zelle einen teilweisen oder vollständigen Verlust des POSH-Funktionsphänotyps genetisch komplementieren. Zum Beispiel kann eine POSH-Nucleinsäure der Erfindung in einer Zelle exprimiert werden, in der endogenes POSH durch RNAi reduziert worden ist und die eingeführte POSH-Nucleinsäure wird einen Phänotyp lindern, der von RNAi resultiert. Ein beispielhafter POSH-Funktionsverlust-Phänotyp ist eine Abnahme in Virus-ähnlicher Partikelproduktion in einer Zelle, die mit einem viralen Vektor transfiziert wurde, wahlweise ein HIV-Vektor. In bestimmten Ausführungsformen induziert eine POSH-Nucleinsäure, wenn sie mit einer effektiven Menge in einer Zelle exprimiert wird, Apoptose.

[0100] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft POSH-Nucleinsäuren, die als Antisense, RNAi oder Ribozyme verwendet werden. Wie hierin verwendet, bezieht sich Nucleinsäuretherapie auf die Verabreichung oder in situ Erzeugung einer Nucleinsäure oder eines Derivates davon, welches unter zellulären Bedingungen spezifisch mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA hybridisiert (z.B. bindet), die eines der betreffenden POSH-Polypeptide codiert, damit die Produktion von diesem Protein, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird. Die Bindung kann durch herkömmliche Basenpaar-Komplementarität oder zum Beispiel im Fall der Bindung an DNA-Duplexe, über spezifische Interaktionen in der großen Rille („major groove") der Doppelhelix stattfinden.

[0101] Ein Nucleinsäure-Therapiekonstrukt der vorliegenden Erfindung kann zum Beispiel als ein Expressionsplasmid verabreicht werden, das wenn es in der Zelle transkribiert wird RNA produziert, die mindestens zu einem eindeutigen Teil der zellulären mRNA komplementär ist, die ein POSH-Polypeptid codiert. Alternativ ist das Konstrukt ein Oligonucleotid, das ex vivo erzeugt wird und welches, wenn es in eine Zeile eingeführt wird, Hemmung der Expression durch Hybridisieren mit der mRNA und/oder den genomischen Sequenzen verursacht, die ein POSH-Polypeptid codieren. Solche Oligonucleotidsonden sind wahlweise modifizierte Oligonucleotide, die resistent gegen endogene Nucleasen sind, z.B. Exonucleasen und/oder Endonucleasen und daher in vivo stabil sind. Beispielhafte Nucleinsäuremoleküle zur Verwendung als Antisense-Oligonucleotide sind Phosphoramidat, Phosphothioat und Methylphosphonat-Analoge von DNA (siehe auch U.S. Patente 5.176.996; 5.264.564; und 5.256.775). Außerdem sind allgemeine Ansätze zur Konstruktion von Oligomeren, die in der Nucleinsäuretherapie nützlich sind, zum Beispiel von van der Krol et al., (1988) Biotechniques 6:958–976 und Stein et al., (1988) Cancer Res 48:2659–2668 zusammengefasst worden.

[0102] Demgemäß sind die modifizierten Oligomere der Erfindung in der Therapeutik, Diagnostik und in Forschungszusammenhängen nützlich. In therapeutischen Anwendungen werden die Oligomere in einer für die Nucleinsäuretherapie im Allgemeinen angebrachten Weise genützt.

[0103] Zusätzlich zur Verwendung in der Therapie, können die Oligomere der Erfindung als diagnostische Reagenzien genützt werden, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der POSH DNA- oder RNA-Sequenzen nachzuweisen, an welche sie spezifisch binden, so wie für die Bestimmung der Expressionsmengen eines Gens der Erfindung oder zur Bestimmung, ob ein Gen der Erfindung eine genetische Läsion enthält.

[0104] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird die betreffende Nucleinsäure in einem Expressionsvektor bereitgestellt, der eine Sequenz umfasst, bestehend aus SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 und funktionsfähig mit mindestens einer regulatorischen Sequenz verbunden ist. Regulatorische Sequenzen sind im Fachgebiet anerkannt und werden für die direkte Expression des POSH-Polypeptids ausgewählt. Demgemäß umfasst der Begriff regulatorische Sequenz Promotoren, Enhancer und andere Expressions-Kontrollelemente. Beispielhafte regulatorische Sequenzen werden in Goeddel beschrieben; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Zum Beispiel kann jede einer großen Vielzahl an Expressions-Kontrollsequenzen, welche die Expression von einer DNA-Sequenz kontrollieren, wenn sie funktionsfähig damit verbunden ist, in diesen Vektoren verwendet werden, um DNA-Sequenzen zu exprimieren, die ein POSH-Polypeptid codieren. Solche nützliche Expressions-Kontrollsequenzen umfassen zum Beispiel die frü-

hen und späten Promotoren von SV40, tet-Promotor, Adenovirus oder Cytomegalievirus-Immediate-Early-Promotor, das lac-System, das trp-System, das TAC- oder TRC-System, T7-Promotor, dessen Expression durch T7-RNA-Polymerase gesteuert wird, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Lambda-Phagen, die Kontrollregionen für das fd-Hüllenprotein, den Promotor für die 3-Phosphoglycerat-Kinase oder andere glycolytische Enzyme, die Promotoren der sauren Phosphatase, z.B. Pho5, die Promotoren des α-Paarungsfaktors von Hefe, den Polyhedron-Promotor des Baculovirussystems und andere Sequenzen, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen oder ihrer Viren kontrollieren, und verschiedene Kombinationen davon. Es sollte klar sein, dass der Entwurf des Expressionsvektors von solchen Faktoren wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle abhängen kann und/oder der Art des Proteins, von dem erwünscht ist, dass es exprimiert wird. Darüber hinaus sollten die Kopienzahl des Vektors, die Fähigkeit diese Kopienzahl zu kontrollieren und die Expression von irgend einem anderen Protein, das durch den Vektor codiert wird, wie zum Beispiel antibiotische Marker, auch in Erwägung gezogen werden.

[0105] Wie offensichtlich sein wird, kann das betreffende Genkonstrukt verwendet werden, um Expression der betreffenden POSH-Polypeptide in Zellen zu verursachen, die in Kultur vermehrt werden, z.B. um Proteine oder Polypeptide zu erzeugen, einschließlich Fusionsproteine oder Polypeptide für Reinigung.

[0106] Diese Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Gen transfiziert ist, einschließlich einer Sequenz, bestehend aus SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3. Die Wirtszelle kann jede prokaryontische oder eukaryontische Zelle darstellen. Zum Beispiel kann ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung in bakteriellen Zellen, wie zum Beispiel E. coli, Insektenzellen (z.B. unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems), Hefe oder Säugerzellen exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind Fachleuten bekannt.

[0107] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung ferner Herstellungsverfahren der betreffenden POSH-Polypeptide. Zum Beispiel kann eine Wirtzelle, die mit einem Expressionsvektor der Erfindung transfiziert ist, unter geeigneten Bedingungen gezüchtet werden, um zu ermöglichen, dass die Expression des Polypeptids stattfindet. Das Polypeptid kann sezerniert und aus einem Zellgemisch und Medium isoliert werden, welches das Polypeptid enthält. Alternativ kann das Polypeptid im Cytoplasma zurückbehalten werden und die Zellen geerntet, lysiert und das Protein isoliert werden. Eine Zellkultur umfasst Wirtszellen, Medien und andere Nebenprodukte. Geeignete Medien für die Zellkultur sind im Fachgebiet gut bekannt. Das Polypeptid kann aus dem Zellkulturmedium, Wirtszellen oder beidem unter Verwendung von Techniken isoliert werden, die im Fachgebiet für die Reinigung von Proteinen bekannt sind, einschließlich Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltrations-Chromatographie, Ultrafiltration, Elektrophorese und Immunaffinitäts-Reinigung mit Antikörpern, die für besondere Epitope des Polypeptids spezifisch sind. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das POSH-Polypeptid ein Fusionsprotein, das eine Domäne enthält, die seine Reinigung erleichtert, wie zum Beispiel ein POSH-GST-Fusionsprotein, POSH-Intein-Fusionsprotein, POSH-Zellulose-Bindungsdomänen-Fusionsprotein, POSH-Polyhistidin-Fusionsprotein usw.

[0108] Eine Nucleotidsequenz, die ein POSH-Polypeptid codiert, kann verwendet werden, um eine rekombinante Form des Proteins über mikrobielle oder eukaryontische zelluläre Prozesse zu erzeugen. Ligieren der Polynucleotidsequenz in ein Genkonstrukt, wie zum Beispiel einen Expressionsvektor und Transformieren oder Transfizieren in Wirte, entweder eukaryontische (Hefe, Vogel, Insekt oder Säuger) oder prokaryontische (bakterielle) Zellen, sind Standard-Verfahren.

[0109] Eine rekombinante POSH-Nucleinsäure kann durch Ligieren des klonierten Gens oder einem Teil davon in einem Vektor erzeugt werden, der für die Expression in entweder prokaryontischen Zellen, oder eukaryontischen Zellen oder beidem geeignet ist. Expressionsvehikel zur Produktion von einem rekombinanten POSH-Polypeptid umfassen Plasmide und andere Vektoren. Zum Beispiel umfassen geeignete Vektoren für die Expression eines POSH-Polypeptids Plasmide der Arten: von pBR322 abgeleitete Plasmide, von pEMBL abgeleitete Plasmide, von pEX abgeleitete Plasmide, von pBTac abgeleitete Plasmide und von pUC abgeleitete Plasmide für die Expression in prokaryontischen Zellen, wie zum Beispiel E. coli.

[0110] Es gibt etliche Vektoren für die Expression von rekombinanten Proteinen in Hefe. Zum Beispiel sind YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2, und YRP17 Clonierungs- und Expressionsvehikel, die für das Einführen von genetischen Konstrukten in S. cerevisiae nützlich sind (siehe zum Beispiel Broach et al., (1983) in Experimental Manipulation of Gene Expression, Hg. M. Inouye Academic Press, S. 83). Diese Vektoren können in E. coli aufgrund der Anwesenheit des pBR322 Ori und in S. cerevisiae aufgrund der Replikationsdeterminante des Hefe 2-Mikron-Plasmid replizieren. Zusätzlich können Arzneistoff-Restistenzmarker wie zum Beispiel Amipicillin verwendet werden.

[0111] Die bevorzugten Säuger-Expressionsvektoren enthalten sowohl prokaryontische Sequenzen, um die Fortpflanzung des Vektors in Bakterien zu erleichtern, als auch eine oder mehrere eukaryontische Transkriptionseinheiten, die in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Die pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und von pHyg abgeleitete Vektoren sind Beispiele für Säugerexpressionsvektoren zur Transfektion in eukaryontischen Zellen. Manche dieser Vektoren werden mit Sequenzen aus bakteriellen Plasmiden modifiziert, wie zum Beispiel pBR322, um die Replikation und die Selektion der Arzneimittelresistenz sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen zu erleichtern. Alternative Derivate von Viren, wie zum Beispiel das Rinder-Papillomavirus (BPV-1), oder Epstein-Barr-Virus (pHEBo, pREP-abstammend und p205) kann für die transiente Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen verwendet werden. Beispiele von anderen viralen (einschließlich retroviralen) Expressionssystemen können nachstehend in der Beschreibung von Gentherapie-Verabreichungssystemen gefunden werden. Die verschiedenen Verfahren, die bei der Herstellung von Plasmiden und der Transformation von Wirtsorganismen eingesetzt werden, sind im Fachgebiet gut bekannt. Für andere geeignete Expressionssysteme für sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Zellen, sowie für allgemeine rekombinante Verfahren, siehe Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage, herausgegeben von Sambrook, Fritsch und Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Kapitel 16 und 17. In manchen Fällen kann es wünschenswert sein das rekombinante POSH-Polypeptid durch die Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems zu exprimieren. Beispiele solcher Baculovirus-Expressionssysteme umfassen von pVL abstammende Vektoren (wie zum Beispiel pVL1392, pVL1393 und pVL941), von pAcUW abstammende Vektoren (wie zum Beispiel pAcUW1) und von pBlueBac abstammende Vektoren (wie zum Beispiel den β-Gal-enthaltenden pBlueBacIII).

[0112] Es ist im Fachgebiet gut bekannt, dass ein Methionin an der N-terminalen Position durch die Verwendung des Enzyms Methionin-Aminopeptidase (MAP) enzymatisch gespalten werden kann. MAP ist aus E. coli (Ben-Bassat et al., (1987) J. Bacteriol. 169:751–757) und Salmonella typhimurium cloniert worden und seine in vitro Aktivität ist an rekombinanten Proteinen gezeigt worden (Miller et al., (1987), PNAS USA 84:2718–1722). Das Entfernen eines N-terminalen Methionins kann daher, falls erwünscht, entweder in vivo durch die Expression solcher rekombinanter Polypeptide in einem Wirt erzielt werden, der MAP produziert (z.B. E. coli oder CM89 oder S. cerevisiae) oder in vitro durch die Verwendung von gereinigter MAP (z.B. Verfahren von Miller et al.).

[0113] Alternativ können die Codierungssequenzen für das Polypeptid als ein Teil eines Fusionsgens, einschließlich einer Nucleotidsequenz, die ein unterschiedliches Polypeptid codiert, eingebaut werden. Diese Art von Expressionssystem kann unter Bedingungen nützlich sein, worin es wünschenswert ist, z.B. eine immunogenes Fragment eines POSH-Polypeptids herzustellen. Zum Beispiel kann das VP6-Capsidprotein eines Rotavirus als ein immunogenes Trägerprotein für Teile des Polypeptids verwendet werden, entweder in der monomeren Form, oder in der Form eines viralen Partikels. Die Nucleinsäuresequenzen, die dem Teil des POSH-Polypeptids entsprechen, gegen den Antikörper erzeugt werden, können in ein Fusionsgenkonstrukt eingebaut werden, welche die Codierungssequenzen für ein spätes strukturelles Vaccinia-Virusprotein codieren, um eine Gruppe an rekombinanten Viren zu produzieren, die Fusionsproteine exprimieren, umfassend einen Teil des Proteins als Teil des Virions. Das Hepatitis B Oberflächenantigen kann in dieser Rolle auch benützt werden. Auf ähnliche Weise können chimäre Konstrukte, die für Fusionsproteine codieren, die einen Teil eines POSH-Polypeptids und das Poliovirus-Capsidprotein enthalten, erzeugt werden, um die Immunogenität zu erhöhen (siehe zum Beispiel EP Veröffentlichungsnummer: 0259149; und Evans et al., (1989) Nature 339:385; Huang et al., (1988) J. Virol. 62:3855; und Schlienger et al., (1992) J. Virol. 66:2).

[0114] Das vielfache System der Antigen-Peptide (MAP) für auf Peptid-basierende Immunisierung kann verwendet werden, wobei ein gewünschter Teil eines POSH-Polypeptids direkt aus Organo-chemischer Synthese des Peptids auf einen oligomeren, verzweigenden Lysinkern erhalten wird (siehe zum Beispiel Posnett et al., (1988) JBC 263:1719 und Nardelli et al., (1992) J. Immunol. 148:914). Antigen-Determinanten eines POSH-Polypeptids können auch exprimiert und durch bakterielle Zellen präsentiert werden.

[0115] In einer anderen Ausführungsform kann ein Fusionsgen, das für eine Reinigungs-Leadersequenz codiert, wie zum Beispiel eine Poly-(His)/Enterokinase-Spaltungstellensequenz am N-Terminus des gewünschten Teils des rekombinanten Proteins, die Reinigung des exprimierten Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Ni^{2+} Metallharz ermöglichen. Die Reinigungs-Leadersequenz kann anschließend durch Behandlung mit Enterokinase entfernt werden, um das gereinigte POSH-Polypeptid bereitzustellen (z.B. siehe Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; und Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

[0116] Techniken zur Erzeugung von Fusionsgenen sind gut bekannt. Das Verbinden von verschiedenen

DNA-Fragmenten, die für unterschiedliche Polypeptidsequenzen codieren, wird im Wesentlichen in Übereinstimmung mit herkömmlichen Techniken durchgeführt, welche die Termini mit glatten Enden oder überhängenden Enden für die Ligation einsetzen, wobei Restriktionsenzymspaltung geeignete Termini bereitstellt, Auffüllen von kohäsiven Enden wo passend, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um unerwünschte Verbindung zu vermeiden und enzymatische Ligation. In einer anderen Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich automatisierten DNA-Synthesegeräten, synthetisiert werden. Alternativ kann PCR-Amplifikation von Genfragmenten unter Verwendung von Verankerungsprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen zwei konsekutiven Genfragmenten erzeugen, die anschließend angelagert werden, um eine chimäre Gensequenz zu erzeugen (siehe zum Beispiel Current Protocols in Molecular Biology, Hrsg. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

Tabelle 2. Beispielhafte POSH-Nucleinsäuren

Sequenzname	Organismus	Hinterlegungsnummer
cDNA FLJ 11367 fis, Clon	Homo sapiens	AK021429
HEMBA1000303		
Reichlich SH3-Domänen (POSH) mRNA	Mus musculus	NM_021506
Reichlich SH3s POSH mRNA	Mus musculus	AF030131
Reichlich SH3s POSH mRNA	Drosophila melanogaster	NM_079052
Reichlich SH3s POSH mRNA	Drosophila melanogaster	AF220364

Tabelle 3: Beispielhafte POSH-Polypeptide

Sequenzname	Organismus	Hinterlegungsnummer
SH3-Domänen-enthaltendes Potein POSH	Mus musculus	T09071
Reichlich SH3-Domänen	Mus musculus	NP_067481
Reichlich SH3s: POSH	Mus musculus	AAC40070
Reichlich SH3s	Drosophila melanogaster	AAF37265
LD45365p	Drosophila melanogaster	AAK93408
POSH Genprodukt	Drosophila melanogaster	AAF57833
Reichlich SH3s	Drosophila melanogaster	NP_523776

[0117] Außerdem stellen die folgenden Tabellen die Nucleinsäuresequenz und dazugehörige SEQ ID NOs für Domänen von menschlichem POSH-Protein bereit und eine Zusammenfassung der Sequenzidentifikationsnummern, die in dieser Anmeldung verwendet wurden.

Tabelle 4. Nucleinsäuresequenzen und dazugehörige SEQ ID NOs für Domänen in menschlichem POSH

Name der Sequenz	Sequenz	SEQ ID NO.
RING-Domäne	TGTCCGGTGTGTCTAGAGCGCCTTGATGCTTCTGCG-AAGGTCTTGCCTTGCCAGCA TACGTTTTGCAAGCGATGTTTGCTGGGGATCG-TAGGTTCTCGAAATGAACTCAGAT GTCCCGAGT	31
1. SH3-Domäne	CCATGTGCCAAAGCGTTATACAACTATGAAGGAAAAGAG-CCTGGAGACCTTAAATT CAGCAAAGGCGACATCATCATTTTGCGAAGACAAGTG-GATGAAAATTGGTACCATG GGGAAGTCAATGGAATCCATGGCTTTTTCCCCAC-CAACTTTGTGCAGATTATT	32
2. SH3-Domäne	CCTCAGTGCAAAGCACTTTATGACTTTGAAGTGAAA-GACAAGGAAGCAGACAAAGA TTGCCTTCCATTTGCAAAGGATGATGTTCTGACTGTGATC-CGAAGAGTGGATGAAA ACTGGGCTGAAGGAATGCTGGCAGACAAAATAGGAATATT-TCCAATTTCATATGTT GAGTTTAAC	33
3. SH3-Domäne	AGTGTGTATGTTGCTATATATCCATACACTCCTCGGAAA-GAGGATGAACTAGAGCT GAGAAAAGGGGAGATGTTTTTAGTGTTTGAGCGCTGC-CAGGATGGCTGGTTCAAAG GGACATCCATGCATACCAGCAAGATAGGGGTTTTC-CCTGGCAATTATGTGGCACCA GTC	34
4. SH3-Domäne	GAAAGGCACAGGGTGGTGGTTTCCTATCCTCCTCAGAGT-GAGGCAGAACTTGAACT TAAAGAAGGAGATATTGTGTTTGTTCATAAAAAACGAGAG-GATGGCTGGTTCAAAG GCACATTACAACGTAATGGGAAAACTGGCCTTTTC-CCAGGAAGCTTTGTGGAAAAC A	35

Tabelle 5. Zusammenfassung der Sequenzidentifikationsnummern

Sequenzinformation	Sequenzidentifikationsnummer (SEQ ID NO)
Menschl. POSH Codierungssequenz	SEQ ID No: 1
Menschl. POSH Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 2
Menschl. POSH cDNA-Sequenz	SEQ ID No: 3
5' cDNA-Fragment von menschl. POSH	SEQ ID No: 4
N-Terminus Proteinfragment von menschl. POSH	SEQ ID No: 5
3' mRNA-Fragment von menschl. POSH	SEQ ID No: 6
C-Terminus Proteinfragment von menschl. POSH	SEQ ID No: 7
Maus POSH mRNA-Sequenz	SEQ ID No: 8
Maus POSH Proteinsequenz	SEQ ID No: 9
Drosophila melanogaster POSH mRNA-Sequenz	SEQ ID No: 10
Drosophila melanogaster POSH Protein-Sequenz	SEQ ID No: 11
Menschliche POSH RING-Domäne Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 26
Menschliche POSH 1. SH3-Domäne Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 27
Menschliche POSH 2. SH3-Domäne Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 28
Menschliche POSH 3. SH3-Domäne Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 29
Menschliche POSH 4. SH3-Domäne Aminosäuresequenz	SEQ ID No: 30
Menschliche POSH RING-Domäne Nucleinsäuresequenz	SEQ ID No: 31
Menschliche POSH 1. SH3-Domäne Nucleinsäuresequenz	SEQ ID No: 32
Menschliche POSH 3. SH3-Domäne Nucleinsäuresequenz	SEQ ID No: 33
Menschliche POSH 3. SH3-Domäne Nucleinsäuresequenz	SEQ ID No: 34
Menschliche POSH 4. SH3-Domäne Nucleinsäuresequenz	SEQ ID No: 35

4. Beispielhafte Polypeptide

[0118] Die vorliegende Erfindung stellt auch isolierte und/oder gereinigte Formen der betreffenden POSH-Polypeptide bereit, die isoliert werden aus, oder sonst im Wesentlichen frei sind von anderen intrazellulären Proteinen, die normalerweise mit dem Protein verbunden sein könnten oder einen bestimmten Komplex einschließlich des Proteins bilden. In bestimmten Ausführungsformen weist ein POSH-Polypeptid eine Aminosäuresequenz auf, die identisch ist zu einer Aminosäuresequenz wie sie in der SEQ ID NO: 2 dargelegt ist.

[0119] Wahlweise wird ein POSH-Polypeptid der Erfindung anstatt eines endogenen POSH-Polypeptids wirken, zum Beispiel indem ein teilweiser oder vollständiger Funktionsverlust des POSH-Phänotyps in einer Zelle gemildert wird. Zum Beispiel kann ein POSH-Polypeptid der Erfindung in einer Zelle erzeugt werden, in welcher endogenes POSH durch RNAi reduziert worden ist, und das eingeführte POSH-Polypeptid wird einen Phänotyp abschwächen, der aus der RNAi resultiert. Ein beispielhafter Funktionsverlust des POSH-Phänotyps ist eine Abnahme in Virus-ähnlicher Partikelproduktion in einer Zelle, die mit einem viralen Vektor transfiziert wurde, wahlweise einem HIV-Vektor. In bestimmten Ausführungsformen induziert ein POSH-Polypeptid, wenn es

in einer effektiven Menge in einer Zelle erzeugt wurde, Apoptose.

[0120] In bestimmten Ausführungsformen interagiert ein POSH-Polypeptid der Erfindung mit einem viralen Gag-Protein über eine oder mehrere SH3-Domänen. In weiteren Ausführungsformen können POSH-Polypeptide auch oder alternativ, teilweise durch die Aktivität einer RING-Domäne, bei der Ubiquitinierung mitwirken.

[0121] Offenbart werden auch Polypeptide, die aus einem Volllängen-POSH-Polypeptid stammen. Isolierte Peptidylteile der betreffenden Proteine können durch Screening der Polypeptide erhalten werden, die rekombinant aus dem entsprechenden Fragment der Nucleinsäure hergestellt werden, die solche Polypeptide codiert. Außerdem können Fragmente chemisch unter Verwendung von Techniken synthetisiert werden, die im Fachgebiet als herkömmliche Merrifield-Festphasen f-Moc oder t-Boc-Chemie bekannt sind. Zum Beispiel kann jedes der betreffenden Proteine willkürlich, ohne Überlappung der Fragmente, in Fragmente der gewünschten Länge geteilt werden, oder vorzugsweise in überlappende Fragmente einer gewünschten Länge geteilt werden. Die Fragmente können hergestellt werden (rekombinant oder durch chemische Synthese) und getestet werden, um jene Peptidyl-Fragmente zu identifizieren, die entweder als Agonisten oder Antagonisten der Bildung eines bestimmten Proteinkomplexes wirken können, oder allgemeiner eines POSH-Komplexes, wie zum Beispiel durch Mikroinjektionstests.

[0122] Es ist auch möglich die Struktur der betreffenden POSH-Polypeptide für solche Zwecke wie die Verstärkung therapeutischer oder prophylaktischer Wirksamkeit oder Stabilität zu modifizieren (z.B. ex vivo Haltbarkeit und Resistenz zu proteolytischem Abbau in vivo). Solche modifizierten Polypeptide werden, wenn sie entworfen werden, um mindestens eine Aktivität der natürlich vorkommenden Form des Proteins beizubehalten, als funktionelle Äquivalente der POSH-Polypeptide angesehen, die hierin genauer beschrieben werden. Solche modifizierten Polypeptide können zum Beispiel durch Aminosäureaustausch, -Deletion oder -Addition hergestellt werden.

[0123] Zum Beispiel ist es angebracht zu erwarten, dass ein isolierter Austausch von einem Leucin mit einem Isoleucin oder Valin, einem Aspartat mit einem Glutamat, einem Threonin mit einem Serin oder ein ähnlicher Austausch von einer Aminosäure mit einer strukturell verwandten Aminosäure (d.h. konservative Mutationen) keinen wesentlichen Effekt auf die biologische Aktivität des resultierenden Moleküls haben wird. Konservative Austausche sind jene, die innerhalb einer Familie von Aminosäuren stattfinden, die in ihren Seitenketten verwandt sind. Genetisch codierte Aminosäuren können in vier Familien eingeteilt werden: (1) sauer = Aspartat, Glutamat; (2) basisch = Lysin, Arginin, Histidin; (3) nicht-polar = Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan; und (4) nicht geladen, polar = Glycin, Asparagin, Glutamin, Cystein, Serin, Threonin, Tyrosin. Phenylalanin, Tryptophan, und Tyrosin werden manchmal gemeinsam als aromatische Aminosäuren klassifiziert. In ähnlicher Weise kann das Aminosäurenrepertoir gruppiert werden als (1) sauer = Aspartat, Glutamat; (2) basisch = Lysin, Arginin, Histidin, (3) aliphatisch = Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, mit Serin und Threonin wahlweise getrennt als aliphatische Hydroxylgruppe; (4) aromatisch = Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan; (5) Amid = Asparagin, Glutamin; und (6) schwefelhaltig = Cystein und Methionin. (Siehe zum Beispiel Biochemistry, 2. Auflage, herausgegeben durch L. Stryer, W.H. Freeman und Co., 1981). Ob eine Veränderung in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids in einem funktionellen Homolog resultiert, kann leicht durch Bewertung der Fähigkeit des Varianten-Polypeptids bestimmt werden, eine Reaktion in Zellen zu produzieren, die in einer Weise ähnlich dem Wildtyp-Protein ist. Zum Beispiel können solche Variantenformen eines POSH-Polypeptids z.B. auf ihre Fähigkeit bewertet werden an ein anderes Polypeptid zu binden, z.B. ein anderes POSH-Polypeptid oder ein anderes Protein, das an der viralen Reifung beteiligt ist. Polypeptide in denen mehr als ein Austausch stattgefunden hat, können leicht in der gleichen Weise getestet werden.

[0124] Außerdem offenbart wird ein Verfahren zur Erzeugung von Gruppen an kombinatorischen Mutanten der betreffenden POSH-Polypeptide, sowie Verkürzungsmutanten und ist besonders für die Identifizierung von möglichen Variantensequenzen (z.B. Homologen) nützlich, die bei der Bindung an ein POSH-Polypeptid funktionell sind. Der Zweck des Screenings solcher kombinatorischer Banken ist es zum Beispiel POSH-Homologe zu erzeugen, die entweder als Agonisten oder Antagonisten wirken können, oder die alternativ ganz neue Aktivitäten besitzen. Es können kombinatorisch abgeleitete Homologe erzeugt werden, die eine selektive Potenz relativ zu einem natürlich vorkommenden POSH-Polypeptid aufweisen. Solche Proteine können, wenn sie aus rekombinanten DNA-Konstrukten exprimiert werden, in Gentherapieprotokollen verwendet werden.

[0125] Genauso kann Mutagenese zu Homologen führen, die intrazelluläre Halbwertszeiten aufweisen, die dramatisch anders sind als die des entsprechenden Wildtyp-Proteins. Zum Beispiel kann das geänderte Protein durch proteolytischen Abbau oder andere zelluläre Prozesse, die in der Zerstörung oder andernfalls Deak-

tivierung des POSH-Polypeptids von Interesse resultieren, entweder stabiler oder weniger stabil gemacht werden. Solche Homologe und die Gene, die sie codieren, können genützt werden, um POSH-Mengen durch Modulation der Halbwertszeit des Proteins zu ändern. Zum Beispiel kann eine kurze Halbwertszeit transientere biologische Effekte erzeugen und kann, wenn es Teil eines induzierbaren Expressionssystems ist, eine engere Kontrolle der rekombinanten POSH-Mengen innerhalb der Zelle ermöglichen. Wie vorstehend können solche Proteine und insbesondere ihre rekombinanten Nucleinsäurekonstrukte in Gentherapieprotokollen verwendet werden.

[0126] In ähnlicher Weise können POSH-Homologe durch den vorliegenden kombinatorischen Ansatz erzeugt werden, um als Antagonisten zu wirken, indem sie in der Lage sind mit der Fähigkeit des Wirkens des entsprechenden Wildtypproteins zu interferieren.

[0127] In einer repräsentativen Ausführungsform dieses Verfahrens werden die Aminosäuresequenzen für eine Population von POSH-Homologen abgeglichen, um vorzugsweise die höchst mögliche Homologie zu fördern. Eine solche Population an Varianten kann zum Beispiel Homologe aus einer oder mehreren Arten umfassen, oder Homologe, aus der gleichen Art, die sich aber durch eine Mutation unterscheiden. Aminosäuren, die an den abgeglichen Sequenzen an jeder Position erscheinen, werden ausgewählt, um eine degenerative Gruppe von kombinatorischen Sequenzen zu erzeugen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die kombinatorische Bank mittels einer degenerierte Genbank erzeugt, die eine Bank von Polypeptiden codiert, die jeweils mindestens einen Teil von möglichen POSH-Sequenzen umfasst. Ein Gemisch von synthetischen Oligonucleotiden kann zum Beispiel enzymatisch in Gensequenzen ligiert werden, sodass die degenerierte Gruppe von möglichen POSH-Nucleotidsequenzen als einzelne Polypeptide exprimierbar sind, oder alternativ als eine Gruppe von größeren Fusionsproteinen (z.B. zur Phagendisplay).

[0128] Es gibt viele Wege durch welche die Bank von möglichen Homologen aus einer degenerierten Oligonucleotidsequenz erzeugt werden kann. Chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem automatisierten DNA-Synthesegerät durchgeführt werden und die synthetischen Gene können dann zur Expression in ein geeignetes Gen ligiert werden. Der Zweck einer degenerierten Gruppe an Genen ist es in einem Gemisch alle Sequenzen bereitzustellen, die eine geeignete Gruppe an möglichen POSH-Sequenzen codieren. Die Synthese von degenerierten Oligonucleotiden ist im Fachgebiet gut bekannt (siehe zum Beispiel Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Rekombinante DNA, Proc. 3. Cleveland Sympos. Makromolecules, Hg. AG Walton, Amsterdam: Elsevier Seiten 273–289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Solche Techniken sind in der gelenkten Evolution von anderen Proteinen eingesetzt worden (siehe zum Beispiel Scott et al., (1990) Science 249:386–390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429–2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404–406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87:6378–6382; sowie auch U.S. Patennummern: 5.223.409, 5.198.346 und 5.096.815).

[0129] Alternativ können andere Arten der Mutagenese genützt werden, um eine kombinatorische Bank zu erzeugen. POSH-Homologe (sowohl agonistische als auch antagonistische Formen) können zum Beispiel erzeugt werden und aus einer Bank durch Screening unter Verwendung von zum Beispiel der Alanin-Scanning-Mutagenese und ähnliches isoliert werden (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565–1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095–3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109–118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597–601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888–2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832–10838; und Cunningham et al., (1989) Science 244:1081–1085), durch Linker-Scanning-Mutatenese (Gustin et al., (1993) Virology 193:653–660; Brown et al., (1992) Mol Cell Biol. 12:2644–2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); Durch Sättigungs-Mutagenese (Meyers et al., (1986) Science 232:613); durch PCR-Mutagenese (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11–19); oder durch zufällige Mutagenese, einschließlich chemischer Mutagenese, usw. (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; und Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32–34). Linker-Scanning-Mutagenese ist, insbesondere in einem kombinatorischen Rahmen, ein attraktives Verfahren zur Identifikation von verkürzten (bioaktiven) Formen der POSH-Polypeptide.

[0130] Eine große Auswahl von Techniken sind im Fachgebiet zum Screening von Genprodukten von kombinatorischen Banken bekannt, die durch Punktmutationen und Verkürzungen erzeugt wurden und in der Tat für das Screening von cDNA-Banken nach Genprodukten, die eine bestimmte Eigenschaft aufweisen. Solche Techniken werden im Allgemeinen für schnelle Durchmusterung der Genbanken adaptierbar sein, die durch die kombinatorische Mutagenese von POSH-Homologen erzeugt wurden. Die am häufigsten zum Screening von großen Genbanken verwendeten Techniken umfassen üblicherweise die Clonierung der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen, mit den resultierenden Genbankvekto-

ren und die Expression von kombinatorischen Genen unter Bedingungen in welchen der Nachweis einer gewünschten Aktivität die relativ leichte Isolierung des Vektors erleichtert, der das Gen codiert dessen Produkt nachgewiesen wurde. Jeder der nachstehend beschriebenen veranschaulichenden Tests ist für Analyse mit Hochdurchsatz zugänglich, wie sie notwendig ist, um große Zahlen an degenerierten Sequenzen zu durchmustern, die durch kombinatorische Mutagenesetechniken erzeugt werden.

[0131] In einer illustrativen Ausführungsform eines Screeningtests werden kombinatorische Kandidaten-Genprodukte eines der Testproteine auf der Oberfläche einer Zelle oder eines Virus präsentiert und die Fähigkeit von besonderen Zellen oder viralen Partikeln an ein POSH-Polypeptid zu binden, wird in einem „Panningtest" nachgewiesen. Zum Beispiel kann eine Bank von POSH-Varianten in das Gen für ein Oberflächen-Membranprotein einer bakteriellen Zelle cloniert werden (Ladner et al., WO 88/06630; Fuchs et al., (1991) Bio/Technology 9:1370–1371; und Goward et al., (1992) TIBS 18:136–140) und das resultierende Fusionsprotein durch Panning nachgewiesen werden, z.B. unter Verwendung eines Fluoreszent-markierten Moleküls, welches an das POSH-Polypeptid bindet, um mögliche funktionelle Homologe zu erhalten. Zellen können visuell inspiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgetrennt werden, oder wo es die Morphologie der Zellen erlaubt, durch ein Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortiergerät aufgetrennt werden.

[0132] In ähnlicher Weise kann die Genbank als ein Fusionsprotein auf der Oberfläche eines Viruspartikels exprimiert werden. Zum Beispiel können in dem filamentösen Phagensystem fremde Peptidsequenzen auf der Oberfläche von infektiösen Phagen exprimiert werden und dadurch zwei wesentliche Vorteile übertragen. Erstens kann eine große Zahl an Phagen gleichzeitig durchmustert werden, da diese Phagen bei sehr hohen Konzentrationen auf Affinitätsmatrizen aufgetragen werden können. Zweitens kann der Phage durch eine weitere Infektionsrunde amplifiziert werden, da jeder infektiöse Phage das kombinatorische Genprodukt auf seiner Oberfläche präsentiert, wenn ein bestimmter Phage aus einer Affinitätsmatrix in niedrigen Erträgen wiedergewonnen wird. Die Gruppe der fast identischen, filamentösen E. coli Phagen M13, fd und f1 wird am häufigsten in Phagen-Displaybanken verwendet, da jedes der Phagen gIII oder gVIII-Hüllenproteine verwendet werden kann, um Fusionsproteine zu erzeugen, ohne die endgültige Verpackung des Viruspartikels zu stören (Ladner et al., PCT-Veröffentlichung WO 90/02909; Garrard et al., PCT-Veröffentlichung WO 92/09690; Marks et al., (1992) J. Biol. Chem. 267;16007–16010; Griffiths et al., (1993) EMBO J. 12:725–734; Clackson et al., (1991) Nature 352:624–628; und Barbas et al., (1992) PNAS USA 89:4457–4461).

[0133] Die Erfindung stellt auch für die Reduktion der betreffenden POSH-Polypeptide bereit, um Nachahmungen zu erzeugen, z.B. Peptide oder nicht-Peptidmittel, die im Stande sind die Bindung des authentischen Proteins an einen anderen zellulären Partner nachzuahmen. Solche wie vorstehend beschriebenen mutagenen Techniken, sowie das Thioredoxin-System, sind insbesondere auch für die Kartierung der Determinanten eines POSH-Polypepids nützlich, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, zum Beispiel der Bindung von Proteinen aneinander, die an der Virusreifung beteiligt sind. Zur Veranschaulichung, die kritischen Reste eines POSH-Polypeptids, die an der molekularen Erkennung eines Substratproteins beteiligt sind, können bestimmt und verwendet werden, um POSH-Polypeptid-abgeleitete Peptidnachahmungen („peptidomimetics") zu erzeugen, die an das Substratprotein binden und durch Hemmung der POSH-Bindung wirken, um seine biologische Aktivität zu hemmen. Indem zum Beispiel Scanning-Mutagenese angewandt wird, um die Aminosäurereste von einem POSH-Polypeptid zu kartieren, die bei der Bindung an ein anderes Polypeptid beteiligt sind, können Peptidnachahmungs-Verbindungen erzeugt werden, die jene Reste nachahmen, die an der Bindung beteiligt sind. Zum Beispiel können nicht-hydrolysierbare Peptidanaloge von solchen Resten unter Verwendung von Benzodiazepin erzeugt werden (z.B. siehe Freidinger et al., in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall Hg., ESCOM Publisher: Leiden, Niederlande, 1988), Azepin (z.B. Huffman et al., in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall Hg., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), substituierte Gamma-Lactamringe (Gravey et al., in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall Hg., ESCOM Publisher: Leiden, Niederlande, 1988), Keto-Methylen-Pseudopeptide (Ewenson et al., (1986) J. Med. Chem. 29:295; und Ewenson et al., in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985) β-Schleife-Dipeptidkerne (Nagai et al., (1985) Tetrahedron Lett 26:647; und Sato et al., (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231) und b-Aminoalkohole (Gordon et al., (1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; und Dann et al., (1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71).

[0134] Die folgende Tabelle stellt Sequenzen der RING-Domäne und der verschiedenen SH3-Domänen bereit.

Tabelle 6. Aminosäuresequenzen und verwandte SEQ ID NOs für die Domänen in menschlichem POSH

Name der Sequenz	Sequenz	SEQ ID NO.
RING-Domäne	CPVCLERLDASAKVLPCQHTFCKRCLLGIVGSRNELRCPEC	26
1. SH3-Domäne	PCAKALYNYEGKEPGDLKFSKGDIIILRRQVDENWYHGEVN-GIHGFFPTNFVQIIK	27
2. SH3-Domäne	PQCKALYDFEVKDKEADKOCLPFAKDDVLTVIRRVDENWA-EGMLADKIGIFFISYVEDNS	28
3. SH3-Domäne	SVYVAIYPYTPRKEDELELRKGEMFLVFERCQDGWF-KGTSMHTSKIGVFPGNYVAPVT	29
4. SH3-Domäne	ERHRVVVSYPPQSEAELELKEGDIVFVHKKREDGWFKGTL-QRNGKTGLFPGSFVENI	30

5. Antikörper und ihre Verwendungen

[0135] Ein anderer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf einen Antikörper, der spezifisch mit einem POSH-Polypeptid reaktiv ist. Antikörper können zum Beispiel unter Verwendung von Immunogenen, die von einem POSH-Polypeptid stammen, durch Standardprotokolle erzeugt werden, z.B. basierend auf den cDNA-Sequenzen, anti-Protein/anti-Peptidantiseren oder monoclonalen Antikörpern (siehe zum Beispiel, Antibodies: A Laboratory Manual, herausgegeben von Harlow und Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Ein Säuger, wie zum Beispiel eine Maus, ein Hamster oder ein Kaninchen, kann mit einer immunogenen Form des Peptids immunisiert werden (z.B. einem POSH-Polypeptid oder einem Antigenfragment, das im Stande ist eine Antikörperantwort hervorzurufen, oder ein wie vorstehend beschriebenes Fusionsprotein). Techniken zur Verleihung von Immunogenität auf ein Protein oder Peptid umfassen Konjugation an Träger oder andere Techniken, die im Fachgebiet gut bekannt sind. Ein immunogener Teil eines POSH-Polypeptids kann in der Anwesenheit von Adjuvans verabreicht werden. Der Fortschritt der Immunisierung kann durch den Nachweis von Antikörpertitern im Plasma und Serum überwacht werden. Standard-ELISA oder andere Immuntests können mit dem Immunogen als ein Antigen verwendet werden, um die Antikörpermengen zu bewerten. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die betreffenden Antikörper immunspezifisch für antigene Determinanten von einem POSH-Polypeptid eines Säugers, z.B. antigene Determinanten eines Proteins, das in SEQ ID NO: 2 dargelegt wird.

[0136] In einer Ausführungsform sind die Antikörper für eine RING-Domäne oder eine SH3-Domäne spezifisch und vorzugsweise ist die Domäne ein Teil eines POSH-Polypeptids. In einer spezifischeren Ausführungsform ist die Domäne ein Teil einer Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt wird. In einer Gruppe von beispielhaften Ausführungsformen bindet ein Antikörper an eine oder mehrere SH3-Domänen, die durch die Aminosäuren 137–192 von SEQ ID NO: 2, Aminosäuren 199–258 von SEQ ID NO:2, Aminosäuren 448–505 von SEQ ID NO.2 und/oder Aminosäuren 832–888 von SEQ ID NO: 2, dargestellt sind. In einer anderen beispielhaften Ausführungsform bindet ein Antikörper an eine RING-Domäne, die durch die Aminosäuren 12–52 von SEQ ID NO: 2 dargestellt ist. In einer anderen Ausführungsform sind die Antikörper mit einem oder mehreren Proteinen immunreaktiv, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die mindestens 80% identisch ist zu einer Aminosäuresequenz wie sie in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist. In anderen Ausführungsformen ist ein Antikörper mit einem oder mehreren Proteinen immunreaktiv, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die 85%, 90%, 95% 98%, 99% oder identisch ist zu einer Aminosäuresequenz, wie sie in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist.

[0137] Nach der Immunisierung eines Tieres mit einer antigenen Erzeugung eines POSH-Polypeptids, können anti-POSH-Antiseren erhalten werden und falls erwünscht polyclonale anti-POSH-Antikörper, die aus dem Serum isoliert werden. Um monoclonale Antikörper herzustellen können Antikörper-produzierende Zellen (Lymphocyten) aus einem immunisierten Tier gesammelt und durch somatische Standard-Zellfusionsverfahren mit immortalisierten Zellen, wie zum Beispiel Myelomazellen fusioniert werden, um Hybridomzellen zu ergeben. Solche Techniken sind im Fachgebiet gut bekannt und umfassen zum Beispiel die Hybridomtechnik (ursprünglich entwickelt durch Kohler und Milstein, (1975) Nature, 256: 495–497), die menschliche B-Zell-Hybridomtechnik (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72) und die EBV-Hybridomtechnik, zur Erzeugung von menschlichen monoclonalen Antikörpern (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. Seiten 77–96). Hybridomzellen können immunchemisch auf die Produktion von Antikörpern durchmustert werden, die spezifisch mit einem menschlichen POSH-Polypeptid der vorliegenden Erfindung reaktiv

sind und monoclonale Antikörper, die aus einer Kultur, umfassend solche Hybridomzellen, isoliert werden. In einer Ausführungsform reagieren anti-menschliche POSH-Antikörper spezifisch mit dem Protein, das durch eine Nucleinsäure codiert wird, das SEQ ID NO: 2 aufweist.

[0138] Der Begriff Antikörper, wie er hierin verwendet wird, soll Fragmente davon umfassen, die auch spezifisch mit einem der betreffenden POSH-Polypeptide reagieren. Antikörper können unter Verwendung von herkömmlichen Techniken fragmentiert werden und die Fragmente auf die Nützlichkeit in der gleichen Weise durchmustert werden, wie es für ganze Antikörper vorstehend beschrieben wurde. Zum Beispiel können $F(ab)_2$-Fragmente durch Behandlung des Antikörpers mit Pepsin erzeugt werden. Das daraus resultierende $F(ab)_2$-Fragment kann behandelt werden, um Disulfidbrücken zu reduzieren, um dadurch Fab-Fragmente zu erzeugen. Der Antikörper der vorliegenden Erfindung ist weiterhin dafür gedacht bispezifische, einzelkettige und chimäre und humanisierte Moleküle zu umfassen, die eine Affinität zu einem POSH-Polypeptid aufweisen, die durch mindestens eine CDR-Region des Antikörpers verliehen wird. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Antikörper ferner einen damit verbundenen Marker, der nachgewiesen werden kann (z.B. kann der Marker ein Radioisotop, fluoreszierende Verbindung, Enzym oder Enzym-Cofaktor sein).

[0139] Anti-POSH-Antikörper können z.B. verwendet werden, um POSH-Polypeptidmengen in einem Individuum zu überwachen, insbesondere in der Anwesenheit von POSH an der Plasmamembran zur Bestimmung ob oder nicht dieser Patient mit einem Virus, wie zum Beispiel einem RNA-Virus infiziert ist oder nicht, oder die Ermöglichung der Bestimmung der Wirksamkeit eines bestimmten Behandlungsregimes, für eine Person, die an einer solchen Krankheit leidet. Außerdem wird von POSH-Polypeptiden erwartet, dass sie manchmal in dem freigesetzten Viruspartikel lokalisieren. Viruspartikel können gesammelt werden und auf die Anwesenheit eines POSH-Polypeptids überprüft werden. Die Menge an POSH-Polypeptid kann in einer Vielzahl von Probenarten wie zum Beispiel Zellen und/oder in Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Blutproben, gemessen werden.

[0140] Eine andere Anwendung von anti-POSH-Antikörpern liegt im immunologischen Screening von cDNA-Banken, die in Expressionsvektoren wie zum Beispiel gt11, gt18-23, ZAP und ORF8 konstruiert werden. Messenger-Banken dieser Art, die Codierungssequenzen aufweisen, die im richtigen Leserahmen und Orientierung inseriert sind, können Fusionsproteine produzieren. Zum Beispiel wird gt11 Fusionsproteine produzieren, deren Amino-Termini aus β-Galactosidase Aminosäuresequenzen bestehen und deren Carboxyl-Termini aus einem fremden Polypeptid bestehen. Antigene Epitope eines POSH-Polypeptids, z.B. andere Orthologe eines bestimmten Proteins oder andere Paraloge aus der gleichen Art, können dann mit Antikörpern nachgewiesen werden, wie zum Beispiel dem Inkontaktbringen von Nitrozellulosefiltern, die von infizierten Platten mit den geeigneten anti-POSH-Antikörpern abgenommen werden. Positive Phagen, die durch diesen Test nachgewiesen werden, können dann von der infizierten Platte isoliert werden. Die Anwesenheit von POSH-Homologen kann nachgewiesen und aus anderen Tieren cloniert werden, so auch alternierende Isoformen (einschließlich Spleiß-Varianten) aus Menschen.

6. Suche von Nucleotid- und Polypeptidsequenzen aufgrund von Homologie

[0141] Die Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen der Erfindung können als Abfragesequenzen gegen Datenbanken wie zum Beispiel GenBank, SwissProt, BLOCKS und Pima II verwendet werden. Diese Datenbanken enthalten früher identifizierte und kommentierte Sequenzen, die unter Verwendung von BLAST, das für Basic Local Alignment Search Tool steht (Altschul S F (1993) J Mol Evol 36:290–300; Altschul, S F et al., (1990) J Mol Biol 215:403–10) auf Homologieregionen (Ähnlichkeit) durchsucht werden kann.

[0142] BLAST erzeugt Abgleichungen von sowohl Nucleotid- als auch Aminosäuresequenzen, um die Sequenzähnlickeit zu bestimmen. BLAST ist besonders bei der Bestimmung von genauen Übereinstimmungen oder bei der Identifizierung von Homologen nützlich, die prokaryontischen (bakteriell) oder eukaryontischen (tierisch, von Pilzen oder Pflanzen) Ursprung haben können. Andere Algorithmen können verwendet werden, wie derjenige, der in Smith, R. F. und T. F. Smith (1992; Protein Engineering 5:35–51) beschrieben ist, wenn man sich mit primären Sequenzmustern und sekundären Struktur-Gap-penalties beschäftigt. Wie in dieser Anmeldung offenbart, haben Sequenzen Längen von mindestens 49 Nucleotiden und nicht mehr als 12% unerwünschte Basen (wobei N eher als A, C, G oder T eingetragen wird).

[0143] Der BLAST-Ansatz, wie er in Karlin und Altschul (1993; Proc Natl Acad. Sci 90:5873–7) genau beschrieben wird, sucht Übereinstimmungen zwischen einer Abfragesequenz und einer Datenbank-Sequenz, um die statistische Signifikanz von jeder der gefundenen Übereinstimmungen zu berechnen und nur von jenen Übereinstimmungen zu berichten, welche die vom Benutzer ausgewählte Signifikanzschwelle befriedigen. Vor-

zugsweise wird die Schwelle für Nucleotide bei 10–25 gesetzt und bei 3–15 für Peptide.

7. Transgene Tiere und Verwendungen davon

[0144] Ein weiterer Aspekt der Erfindung zeichnet sich durch transgene nicht-menschliche Tiere aus, die ein heterologes POSH-Gen exprimieren, vorzugsweise ein menschliches POSH-Gen der vorliegenden Erfindung und/oder bei welchen ein oder mehrere Kopien der endogenen POSH-Gene in mindestens einem der Gewebe oder Zelttypen des Tieres unterbrochen worden sind. Demgemäß zeichnet sich die Erfindung durch ein Tiermodell für virale Infektion aus. In einer Ausführungsform sind die transgenen, nicht-menschlichen Tiere ein Säuger, wie zum Beispiel eine Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege, Schaf, Hund, Katze, Rind oder ein nicht-menschlicher Primat. Ohne durch die Theorie gebunden wollen zu sein, wird vorgeschlagen, dass ein solches Tier für die Infektion mit Hüllen-Viren, retroid-Virus und RNA-Virus wie zum Beispiel verschiedene Rhabdoviren, Lentiviren und Filoviren empfänglich sein kann. Ein solches transgenes Tier kann daher als ein nützliches Tiermodell dienen, um die Progression von Krankheiten zu untersuchen, die durch solche Viren verursacht werden. Alternativ kann ein solches Tier als eine Basis nützlich sein, um ein oder mehrere andere menschliche Transgene einzuführen, um ein transgenes Tier zu erzeugen, das mehrere menschliche Gene trägt, die an der Infektion beteiligt sind, die durch retroide Viren oder andere RNA-Viren verursacht wird. Retroide Viren umfassen Lentiviren, wie zum Beispiel HIV. Andere RNA-Viren umfassen Filoviren wie zum Beispiel das Ebolavirus. Als ein Ergebnis des Einführens von mehreren menschlichen Transgenen, kann das transgene Tier für bestimmte virale Infektionen empfindlich werden, und daher ein nützliches Tiermodell zur Untersuchung dieser viralen Infektionen bereitstellen.

[0145] Das transgene Tier, welches das menschliche POSH-Gen trägt ist als eine Basis zum Einführen von anderen menschlichen Genen nützlich, die an der HIV-Infektion beteiligt sind, wie zum Beispiel Cyclin Ti, CD34, CCR5 und Fusin (CRCX4). In einer Ausführungsform ist das zusätzliche menschliche Transgen ein Gen, das an einer Krankheit oder einem Zustand beteiligt ist, der mit AIDS in Zusammenhang steht (z.B. Bluthochdruck, Kaposi-Sarkom, Cachexia usw.) Ein solches Tier kann ein nützliches Tiermodell sein, um die HIV-Infektion, AIDS und verwandte Krankheitsentwicklungen zu untersuchen.

[0146] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft transgene Tiere, die Zellen umfassen (von diesem Tier), die ein Transgen der vorliegenden Erfindung enthalten und die vorzugsweise (obwohl wahlweise) ein exogenes POSH-Protein in einer oder mehreren Zellen des Tieres exprimieren. Ein POSH-Transgen kann eine Wildtypform des Proteins codieren, oder kann Homologe davon codieren, sowie Antisensekonstrukte. Darüber hinaus kann es wünschenswert sein das heterologe POSH-Transgen bedingt zu exprimieren, damit entweder die zeitliche Abstimmung oder die Menge der POSH-Genexpression reguliert werden kann. Solche bedingte Expression kann unter Verwendung von prokaryontischen Promotorsequenzen bereitgestellt werden, die prokaryontische Proteine benötigen um gleichzeitig exprimiert zu werden, um die Expression der POSH-Transgene zu erleichtern. Beispielhafte Promotoren und die entsprechenden prokaryontischen Proteine sind in U.S. Patentnummer 4.833.080 angegeben.

[0147] Darüber hinaus können transgene Tiere, die gewebespezifische Expression zeigen zum Beispiel erzeugt werden, indem ein gewebespezifisches Regulationselements, wie zum Beispiel ein Enhancer, in das Transgen inseriert wird. Zum Beispiel kann der endogene POSH-Gen-Promotor oder ein Teil davon mit einem anderen Promotor und/oder Enhancer z.B. einem CMV oder einem Moloney Mäuse-Leukämievirus (MLV) Promotor und/oder Enhancer ersetzt werden.

[0148] Alternativ können nicht-menschliche transgene Tiere, die nur HIV-Transgene im Gehirn exprimieren unter Verwendung von Gehirn-spezifischen Promotoren erzeugt werden (z.B. Myelin Basisprotein (MBP) Promotor, dem Neurofilamentprotein (NF-L) Promotor, dem Gonadotropin-freisetzenden Hormonpromotor, dem Vasopressinpromotor und dem Neuronen-spezifischen Enolasepromotor, siehe So Forss-Petter et al., Neuron, 5, 187, (1990). Solche Tiere können sich im in vivo Modell als nützlich erweisen, um die Fähigkeit eines möglichen Anti-HIV-Arzneistoffes zu evaluieren, die Blut-Hirn-Schranke zu übertreten. Andere Zielzellen für die spezifische Promotoren verwendet werden können, sind zum Beispiel Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen. Andere gewebespezifische Promotoren sind im Fachgebiet gut bekannt, siehe z.B. R. Jaenisch, Science, 240, 1468 (1988).

[0149] Nicht-menschliche transgene Tiere, die ein induzierbares POSH-Transgen enthalten, können unter Verwendung von induzierbaren regulatorischen Elementen erzeugt werden (z.B. Metallothionein-Promotor), die im Fachgebiet gut bekannt sind. Transgene POSH-Expression kann dann in diesen Tieren durch Verabreichung einer Verbindung an dieses Tier begonnen werden, das die Genexpression induziert (z.B. Schwerme-

talle). Ein anderes bevorzugtes induzierbares System umfasst einen Tetracyclin-induzierbaren Transkriptionsaktivator (U.S. Patentnummer 5.654.168, ausgestellt am 5.8.1997 für Bujard und Gossen und U.S. Patentnummer 5.650.298, ausgestellt am 22. Juli 1997 für Bujard et al.).

[0150] Im Allgemeinen können transgene Tierlinien durch Erzeugung von trangenen Tieren erhalten werden, die in ihrem Genom mindestens ein Transgen eingebaut haben, Auswahl von mindestens einem Gründer aus diesen Tieren und Züchten des Gründers, um mindestens eine Linie von transgenen Tieren zu etablieren, die das ausgewählte Transgen in ihrem Genom eingebaut aufweist.

[0151] Tiere zum Erhalten von Eiern oder anderen kernhaltigen Zellen (z.B. embryonale Stammzellen) zur Erzeugung von transgenen Tieren, können von kommerziellen Standardquellen, wie zum Beispiel die Charles River Laboratories (Wilmington, Mass), Taconic (Germantown, N.Y.), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) erhalten werden.

[0152] Eier können von geeigneten Tieren, z.B. durch Ausspülen aus dem Ovidukt oder unter Verwendung von Techniken erhalten werden, die U.S. Patentnummer 5.489.742 beschrieben sind, ausgestellt am 6. Feb. 1996 für Hammer und Taurog; U.S. Patentnummer 5.625.125, ausgestellt am 29. Apr. 1997 für Rennet et al.; Gordon et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380–7384; Gordon & Ruddle, 1981, Science 214:1244–1246; U.S. Patentnummer 4.873.1931 für T. E. Wagner und P. C. Hoppe; U.S. Patentnummer 5.604.131; Armstrong, et al. (1988) J. of Reproduction, 39:511 oder PCT-Anmeldungsnummer PCT/FR93/00598 (WO 94/00568) durch Mehtali et al. Vorzugsweise wird das Weibchen hormonellen Bedingungen ausgesetzt, die wirkungsvoll bei der Förderung der Superovulation sind, bevor die Eier erhalten werden.

[0153] Viele Techniken können verwendet werden, um DNA in ein Ei oder eine kernhaltige Zelle einzuführen, einschließlich in vitro Fertilisation unter Verwendung von Sperma als ein Träger von exogener DNA („Sperma-vermittelter Gentransfer", z.B. Lavitrano et al., 1989, Cell 57:717–723), Mikroinjektion, Gen-Targeting (Thompson et al., 1989, Cell 56:313–321), Elektroporation (Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1803–1814), Transfektion, oder Retrovirus-vermittelter Gentransfer (Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148–6152). Für einen Überblick von solchen Techniken, siehe Gordon (1989), Transgene Tiere, Intl. Rev. Cytol. 115:171–229.

[0154] Außer bei Sperma-vermitteltem Gentransfer sollten Eier gemeinsam mit (bevor, während oder nach) anderen Transgen-Transfer-Techniken fertilisiert werden. Ein bevorzugtes Verfahren zum fertilisieren von Eiern ist durch Züchten eines Weibchens mit einem fruchtbaren Männchen. Eier können jedoch auch durch eine in vitro Fertilisationstechnik fertilisiert werden.

[0155] Fertilisierte Eier, die Trangene enthalten, können unter Verwendung von geeigneten Techniken in scheinträchtige Tiere übertragen werden, die auch als „Pflege-Muttertiere" bezeichnet werden. Scheinträchtige Tiere können zum Beispiel erhalten werden, indem 40–80 Tage alte weibliche Tiere, die mehr als 8 Wochen alt sind in Käfige mit unfruchtbaren, z.B. vasektomierten Männchen, gegeben werden. Am nächsten Morgen werden die Weibchen auf Vaginalstöpsel überprüft. Weibchen die sich mit vasektomierten Männchen gepaart haben, werden bis zur Zeit des Transfers separat gehalten.

[0156] Empfänger-Weibchen können z.B. unter Verwendung des GNRH-Agonisten (GnRH-a): des-gly10, (D-Ala6)-LH-RH Ethylamid, SigmaChemical Co., St. Louis, Mo., synkronisiert werden. Alternativ kann eine unilaterale Schwangerschaft durch ein kurzes operatives Verfahren erzielt werden, welches das „Wegschälen" der Bursamembran vom linken Gebärmutterhorn umfasst. Injizierte Embryos können dann über das Infundibulum in das linke Gebärmutterhorn transferiert werden. Mögliche transgene Gründer können üblicherweise sofort nach der Geburt aus den endogenen Nachkommen eines Wurfs identifiziert werden. Zur Erzeugung von transgenen Tieren aus embryonischen Stammzellen, siehe z.B. Teratocarcinomas and embryonic stemcells, a practical approach, Hg. E. J. Robertson, (IRL Press 1987) oder in Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7161 (1984).

[0157] Gründer, die das Gen exprimieren, können dann gezüchtet werden, um eine transgene Linie zu etablieren. Demgemäß können Gründertiere gezüchtet, durch Inzucht gezüchtet, gekreuzt, oder ausgezüchtet werden, um Kolonien von Tieren der vorliegenden Erfindung zu produzieren. Tiere, die multiple Transgene enthalten, können durch Kreuzung der unterschiedlichen Gründertiere erzeugt werden (z.B. ein HIV-transgenes Tier und transgenes Tier, das menschliches CD4 exprimiert), sowie durch Einführen von mehrfachen Transgenen in ein Ei oder eine embryonische Zelle, wie vorstehend beschrieben. Darüber hinaus können Embryos von

A-transgenen Tieren als gefrorene Embryos gelagert werden, die dann aufgetaut und falls benötigt in scheinträchtige Tiere implantiert werden (siehe z.B. Hirabayashi et al. (1997) Exp Anim 46:111 und Anzai (1994) Jikken Dobutsu 43:247).

[0158] Die vorliegende Erfindung stellt transgene Tiere bereit, welche die Transgene in allen ihren Zellen tragen, sowie Tiere, die das Transgen in manchen aber nicht in allen Zellen tragen, d.h. Mosaiktiere. Das Transgen kann als ein einzelnes Transgen oder in Tandem, z.B. Kopf-an-Kopf-Tandems, oder Kopf-an-Schwanz oder Schwanz-an-Schwanz oder als vielfache Kopien integriert werden.

[0159] Die erfolgreiche Expression der Transgene kann durch jedes von verschiedenen Mitteln nachgewiesen werden, die Fachleuten gut bekannt sind. Nicht-limitierende Beispiele umfassen Northern-Blot, in situ Hybridisierung der mRNA-Analyse, Western-Blot-Analyse, Immunhistochemie und FACS-Analyse der Proteinexpression.

[0160] In einem weiteren Aspekt zeichnet sich die Erfindung durch nicht-menschliche Tierzellen aus, die ein POSH-Transgen enthalten, vorzugsweise ein menschliches POSH-Transgen. Zum Beispiel kann die tierische Zelle (z.B. somatische Zelle oder Keimzelle (d.h. Ei oder Spermium)) aus dem trangenen Tier erhalten werden. Transgene somatische Zellen oder Zelllinien können zum Beispiel in Arzneistoff-Screeningtests verwendet werden. Transgene Keimzellen andererseits können in der Erzeugung von transgenen Nachkommen, wie vorstehend beschrieben, verwendet werden.

Krankheitsmodelle und Arzneistoff-Screeningtests

[0161] Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Identifizierung (Screening) bereit oder zur Bestimmung von Sicherheit und/oder Wirksamkeit von Virus-Therapeutika, d.h. Verbindungen, die für die Behandlung und/oder Verhinderung der Entwicklung von Erkrankungen oder Zuständen nützlich sind, die durch virale Infektion (z.B. AIDS) verursacht werden, oder zu denen sie beiträgt. Außerdem sind die Tests für die weitere Verbesserung von bekannten anti-viralen Verbindungen nützlich, z.B. durch Modifizierung ihrer Struktur, um ihre Stabilität und/oder Aktivität und/oder Toxizität zu erhöhen.

1. In vivo Tests in transgenen Tieren

[0162] Zusätzlich zur Bereitstellung von in vitro Tests, können die transgenen Tiere selbst in in vivo Tests verwendet werden, um virale Therapeutika zu identifizieren. Zum Beispiel können die Tiere in Tests verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die jede Phase des viralen Lebenszyklus vermindern oder hemmen z.B. Expression von einem oder mehreren viralen Genen., Aktivität von einem oder mehreren viralen Proteinen, Glycosylierung von einem oder mehreren viralen Proteinen, Prozessierung von einem oder mehreren viralen Proteinen, virale Replikation, Zusammenfügung der Virionen, und/oder Sprossung von infektiösen Virionen.

[0163] In einer beispielhaften Ausführungsform umfasst der Test die Verabreichung einer Testverbindung an ein transgenes Tier der Erfindung, das mit einem Virus infiziert ist, umfassend Hüllenviren, DNA-Viren, Retroviren und andere RNA-Viren und Vergleichen einer phänotypischen Veränderung in dem Tier im Vergleich mit einem transgenen Tier, das keine Testverbindung erhalten hat. Wo das Tier zum Beispiel mit HIV infiziert wird, kann die phänotypische Veränderung die Verbesserung in einem mit AIDS in Zusammenhang stehenden Komplex sein (ARC, AIDS related complex), Katarakte, entzündliche Läsionen im zentralen Nervensystem einer schwachen sklerotischen Nierenläsion, oder einer Hautläsion, wie zum Beispiel psoriasiforme Dermatitis, hyperkerstotische Läsion, Kaposi Sarkom oder Kachexie. Die Wirkung einer Verbindung oder Hemmung des Kaposi Sarkoms kann wie z.B. beschrieben in PCT/US97/11202 (WO97/49373) durch Gallo et al., bestimmt werden.

[0164] Diese und andere mit HIV in Zusammenhang stehende Symptome oder Phänotypen werden in Leonard et al. (1988) Science 242:1665 weiter beschrieben.

[0165] In einer anderen Ausführungsform ist die phänotypische Veränderung eine Freisetzung/Sprossung der Viruspartikel. In noch einer weiteren Ausführungsform ist die phänotypische Veränderung die Zahl von CD4+ T-Zellen oder das Verhältnis von CD4+ T-Zellen im Vergleich zu CD8+ T-Zellen. In HIV infizierten Menschen, sowie in HIV transgenen Mäusen deutet die Analyse der Lymphknoten darauf hin, dass sich die Zahl der CD4+ T-Zellen vermindert und die sich die Zahl der CD8+ T-Zellen erhöht. Zahlen von CD4+ und CD8+ T-Zellen können zum Beispiel durch indirekte Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie bestimmt werden, wie z.B. be-

schrieben in Santoro et al., vorstehend.

[0166] Alternativ kann eine phänotypische Veränderung überwacht werden, z.B. eine Veränderung in der Expressionsmenge eines HIV-Gens. Die HIV-RNA kann aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus gag mRNA, gag-pro-pol mRNA, vif mRNA, vpr mRNA, tat mRNA, rev mRNA, vpu/env mRNA, nef mRNA, und vpx mRNA. Das HIV-Protein kann ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Pr55 Gag und Fragmenten davon (p17 MA, p24 CA, p7 NC, p1, p9, p6 und p2), Pr160 Gag-Pro-Pol, und Fragmenten davon (p10 PR, p51 RT, p66 RT, p32 IN), p23 Vif, p15 Vpr, p14 Tat, p19 Rev, p16 Vpu, gPr 160 Env oder Fragmenten davon (gp 120 SU und gp41TM), p27 Nef, und p14 Vpx. Die Mengen von jeder dieser mRNAs oder von Proteinen kann in Zellen aus einer Gewebeprobe bestimmt werden, wie zum Beispiel einer Hautbiopsie, wie z.B. beschrieben in PCT/US97/11202 (WO97/49373) von Gallo et al. Die Quantifizierung von HIV mRNA und Protein wird anderswo hierin weiter beschrieben und auch z.B. in Dickie et al. (1996) AIDS Res. Human Retroviruses 12:1103. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Menge an gp120 auf der Oberfläche von PBMC bestimmt. Das kann wie in den Beispielen beschrieben, z.B. durch Immunfluoreszenz auf PBMC durchgeführt werden, die aus den Tieren erhalten wurden.

[0167] Eine weitere phänotypische Veränderung ist die Produktionsmenge oder Rate von Viruspartikeln im Serum und/oder Gewebe des Tieres. Das kann z.B. durch Bestimmung der Reversen Transkriptase (RT-Aktivität) oder der viralen Belastung, wie es anderswo hierin sowie in PCT/US97/11202 (WO97/49373) von Gallo et al., beschrieben wird, bestimmt werden, zum Beispiel durch Bestimmung des p24 Antigens.

[0168] Noch eine andere phänotypische Veränderung, die eine HIV-Infektion oder das Fortschreiten von AIDS andeuten kann, ist die Produktion von entzündlichen Cytokinen, wie zum Beispiel IL-6, IL-8 und TNF-alpha; die Wirksamkeit einer Verbindung, wie zum Beispiel eines anti-HIV-Therapeutikums, kann durch ELISA-Test für die Reduktion von Serummengen von irgendeinem oder allen dieser Cytokine bewertet werden.

[0169] Ein Impfstoff kann durch Verabreichung eines Testantigens an ein transgenes Tier der Erfindung untersucht werden. Das Tier kann wahlweise mit dem gleichen oder einem unterschiedlichen Antigen geboostet werden. Ein solches Tier wird dann mit einem Virus wie zum Beispiel HIV infiziert. Die Produktion von Viruspartikeln oder die Expression von viralen Proteinen wird dann bei verschiedenen Zeiten nach der Verabreichung des Testimpfstoffes gemessen. Eine Verminderung in der Menge der Viruspartikel, die erzeugt werden, oder der viralen Expression, wird darauf hindeuten, dass der Testimpfstoff bei der Reduktion oder Hemmung der Virusproduktion und/oder Expression wirksam ist. Die Menge an Antikörper, die von dem Tier in Antwort auf das Impfstoffantigen erzeugt wird, kann auch gemäß den im Fachgebiet bekannten Verfahren bestimmt werden und stellt einen relativen Hinweis auf die Immunogenität des bestimmten Antigens dar.

2. Zelluläre in vitro Tests

[0170] Zellen aus den transgenen Tieren der Erfindung können in Kultur etabliert werden und immortalisiert werden, um Zelllinen zu bilden. Zum Beispiel können immortalisierte Zelllinien aus den Lebern von transgenen Ratten, wie beschrieben in Bulera et al. (1997) Hepatology 25:1192, etabliert werden. Zelllinien aus anderen Zellarten können gemäß im Fachgebiet bekannten Verfahren etabliert werden.

[0171] In einem auf Zellen basierenden Test können Zellen, die ein POSH-Transgen exprimieren, mit einem Virus von Interesse infiziert und in der Anwesenheit einer Testverbindung oder einer Kontrollverbindung inkubiert werden. Die Produktion von viralen Partikeln wird dann verglichen. Dieses Testsystem stellt daher ein Mittel zur Identifizierung von molekularen Antagonisten bereit, das zum Beispiel durch Störung der viralen Freisetzung/Sprossung wirkt.

[0172] Auf Zellen basierende Tests können auch verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, welche die Expression eines viralen Gens modulieren, die Translation einer viralen mRNA modulieren oder die Stabilität einer viralen mRNA oder eines Proteins modulieren. Demgemäß kann eine Zelle, die im Stande ist ein besonderes virales Protein zu exprimieren, mit einer Testverbindung inkubiert werden und die Menge des viralen Proteins, das in dem Zellmedium produziert wird, kann gemessen und mit jenem verglichen werden, das von einer Zelle produziert wird, die nicht mit der Testverbindung in Kontakt gebracht worden ist. Die Spezifität der Verbindung für die Regulation der Expression eines bestimmten Virusgens, kann durch verschiedene Kontrollanalysen, z.B. durch Messung der Expression von einem oder mehreren Kontrollgenen, bestätigt werden. Diese Art von zellulärem Test kann insbesondere für die Bestimmung der Wirksamkeit von Antisense-Molekülen oder Ribozymen nützlich sein.

[0173] In bestimmten Aspekten betrifft die Erfindung RNAi, Ribozym, Antisense und andere mit Nucleinsäuren in Zusammenhang stehende Verfahren und Zusammensetzungen zur Manipulation (üblicherweise Verminderung) einer POSH-Aktivität. Beispielhafte RNAi und Ribozymmoleküle können eine Sequenz umfassen wie sie in jeder der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25 gezeigt wird.

[0174] Bestimmte Ausführungsformen der Erfindung verwenden Materialien und Verfahren, die den Knockdown von einem oder mehreren POSH-Genen mittels einer RNA-Interferenz (RNAi) bewirken. RNAi ist ein Prozess der Sequenz-spezifischen post-transkriptionellen Genrepression, die in eukaryontischen Zellen stattfinden kann. Im Allgemeinen umfasst dieser Prozess den Abbau einer mRNA von einer speziellen Sequenz, die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) induziert ist, die homolog zu dieser Sequenz ist. Die Expression einer langen dsRNA zum Beispiel, die der Sequenz einer bestimmten einzelsträngigen mRNA entspricht (ss mRNA), wird diese Botschaft instabil machen und dadurch die Expression des entsprechenden Gens „stören". Demgemäß kann jedes ausgewählte Gen durch Einführen einer dsRNA unterdrückt werden, das der gesamten oder einem Teil der mRNA für dieses Gen entspricht. Es scheint, dass wenn eine lange dsRNA exprimiert wird, sie anfänglich durch eine Ribonuclease III in kürzere dsRNA-Oligonucleotide, von so wenigen wie 21 oder 22 Rasenpaaren in Länge, prozessiert wird. Darüber hinaus kann RNAi demgemäß durch das Einführen oder die Expression von relativ kurzen homologen dsRNAs beeinträchtigt werden. Tatsächlich kann die Verwendung von relativ kurzen homologen dsRNAs, wie nachstehend besprochen, bestimmte Vorteile aufweisen.

[0175] Säugerzellen haben mindestens zwei Signalwege, die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) beeinflusst werden. In dem RNAi (sequenzspezifisch) Signaleweg, wird die initiierende dsRNA zuerst, wie vorstehend beschrieben, in kurze interferierende (si)RNAs zerlegt. Die siRNAs weisen Sense- und Antisense-Stränge von etwa 21 Nucleotiden auf, die ungefähr 19 Nucleotid-siRNAs mit Überhängen von zwei Nucleotiden am jedem 3'Ende bilden. Von kurzen interferierenden RNAs wird angenommen, dass sie die Information bereitstellen, die es einer spezifischen Boten-RNA ermöglicht für den Abbau gezielt ausgewählt zu werden. Im Gegensatz dazu wird der unspezifische Signalweg durch dsRNA von irgendeiner Sequenz ausgelöst, solange sie mindestens 30 Basenpaare lang ist. Die unspezifischen Effekte treten auf, da dsRNA zwei Enzyme aktiviert: PKR, das in seiner aktiven Form den Translations-Initiationsfaktor eIF2 phosphoryliert, um die gesamte Proteinsynthese zu stoppen, und 2', 5' Oligoadenylat-Synthetase (2', 5'-AS), die ein Molekül synthetisiert, das RNase L aktiviert, ein unspezifisches Enzym, das auf alle mRNAs abzielt. Der unspezifische Signalweg kann eine Wirtsreaktion auf Stress oder virale Infektion darstellen und im Allgemeinen werden die Wirkungen des unspezifischen Signalwegs vorzugsweise unter bevorzugten Verfahren der vorliegenden Erfindung minimiert. Bezeichnenderweise scheinen längere dsRNAs benötigt zu werden, um den unspezifischen Signalweg zu induzieren und demgemäß werden kürzere als etwa 30 Rasenpaare lange dsRNAs bevorzugt, um die Genrepression durch RNAi zu bewirken (siehe Hunter et al. (1975) J Biol Chem 250:409–17; Manche et al. (1992) Mol Cell Biol 12:5239–48; Minks et al. (1979) J Biol Chem 254:10180–3; und Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494–8).

[0176] Von RNAi ist gezeigt worden, dass sie bei der Reduktion oder Eliminierung der Expression eines Gens in etlichen unterschiedlichen Organismen, einschließlich Caenorhabditiis elegans (siehe z.B. Fire et al. (1998) Nature 391: 806–11), Mauseiern und -Embryos (Wianny et al. (2000) Nature Cell Biol 2: 70–5; Svoboda et al. (2000) Development 127: 4147–56) und gezüchteten RAT-1-Fibroblasten (Bahramina et al. (1999) Mol Cell Biol 19: 274–83) wirksam ist und es scheint einen sich vor langer Zeit entwickelten Signalweg darzustellen, der in eukaryontischen Pflanzen und Tieren vorhanden ist (Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485–90). Es hat sich herausgestellt, dass RNAi ein wirkungsvolles Mittel zur Verminderung der Genexpression in einer Vielzahl von Zelltypen ist, einschließlich HeLa-Zellen, NIH/3T3-Zellen, COS-Zellen, 293-Zellen und BHK-21 Zellen und die Expression eines Gens üblicherweise auf niedrigere Mengen reduziert, als sie durch die Verwendung von Antisense-Techniken erreicht wird und die Expression tatsächlich oft ganz ausschaltet (siehe Bass (2001) Nature 411: 428–9). In Säugerzellen sind siRNAs bei Konzentrationen wirksam, die mehrere Größenordnungen unter den Konzentrationen liegen, die üblicherweise in Antisense-Experimenten verwendet werden (Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494– 8).

[0177] Die doppelsträngigen Oligonucleotide, die verwendet werden, um RNAi zu beeinflussen, sind vorzugsweise weniger als 30 Rasenpaare lang und umfassen stärker bevorzugt 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 oder 17 Rasenpaare der Ribonucleinsäure. Wahlweise können die dsRNA-Oligonucleotide der Erfindung überhängende 3'-Enden umfassen. Beispielhafte 2-Nucleotid-3'-Überhänge können aus Ribonucleotidresten von jeder Art zusammengesetzt sein und können sogar aus 2'-Desoxythymidinresten bestehen, welche die Kosten der RNA-Synthese senken und die Nucleaseresistenz von siRNAs im Zellkulturmedium und innerhalb der transfi-

zierten Zellen erhöhen können (siehe Elbashi et al. (2001) Nature 411: 494–8). Längere dsRNAs von 50, 75, 100 oder sogar 500 Rasenpaaren oder mehr können in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung genützt werden. Beispielhafte Konzentrationen von dsRNAs zur Bewirkung von RNAi sind etwa 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 25 nM oder 100 nM, obwohl abhängig von der Art der behandelten Zellen, der Zielgens und anderer Faktoren, die für den Fachmann leicht erkennbar sind, andere Konzentrationen verwendet werden können. Beispielhafte dsRNAs können chemisch synthetisiert oder in vitro oder in vivo unter Verwendung von geeigneten Expressionsvektoren produziert werden. Beispielhafte synthetische RNAs umfassen 21 Nucleotid-RNAs, die chemisch unter im Fachgebiet bekannten Verfahren synthetisiert werden (z.B. Expedit-RNA-Phosphoramidite und Thymidin-Phosphoramidite (Proligo, Deutschland). Synthetische Oligonucleotide werden vorzugsweise entschützt und unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren gelgereinigt (siehe z.B. Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15:188–200). Längere RNAs können aus Promotoren, wie zum Beispiel T7 RNA-Polymerase-Promotoren, die im Fachgebiet bekannt sind, transkribiert werden. Ein einzelnes RNA-Ziel, das in beiden Richtungen stromabwärts von einem in vitro Promotor platziert wird, wird beide Stränge des Ziels transkribieren, um ein dsRNA-Oligonucleotid der gewünschten Zielsequenz zu erzeugen. Jede der vorstehenden RNA-Arten wird entworfen werden, um einen Teil einer Nucleotidsequenz zu umfassen, die in einer POSH-Nucleinsäure dargestellt ist, wie zum Beispiel eine Nucleinsäure, die unter stringenten und/oder physiologischen Bedingungen an irgendeine von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 oder Komplementen davon hybridisiert.

[0178] Die spezifische beim Entwurf der Oligonucleotide verwendete Sequenz kann irgendeine fortlaufende Sequenz an Nucleotiden sein, die innerhalb der exprimierten Genbotschaft des Ziels enthalten ist. Im Fachgebiet bekannte Programme und Algorithmen können verwendet werden, um geeignete Zielsequenzen auszuwählen. Außerdem können optimale Sequenzen unter Nutzung von Programmen ausgewählt werden, die entworfen wurden, um die Sekundärstruktur einer spezifischen einzelsträngigen Nucleinsäuresequenz vorauszusagen und die Selektion von jenen Sequenzen ermöglichen, die wahrscheinlich in exponierten einzelsträngigen Bereichen einer gefalteten mRNA vorkommen. Verfahren und Zusammensetzungen zum Entwerfen von geeigneten Oligonucleotiden können zum Beispiel in U.S. Patentnummer 6.251.588 gefunden werden. Von Boten-RNA (mRNA) wird allgemein angenommen, dass sie ein lineares Molekül ist, das die Information zur Lenkung der Proteinsynthese innerhalb der Sequenz von Ribonucleotiden enthält, Studien haben jedoch etliche sekundäre und tertiäre Strukturen offenbart, die in den meisten mRNAs bestehen. Sekundäre Strukturelemente in RNA werden größtenteils durch Watson-Crick-artige Interaktionen zwischen unterschiedlichen Regionen des gleichen RNA-Moleküls gebildet. Wichtige sekundäre Strukturelemente umfassen intramolekulare doppelsträngige Regionen, Haarnadelschleifen, Ausbuchtungen in Duplex-RNA und interne Schlaufen. Tertiäre Strukturelemente werden gebildet, wenn sekundäre Strukturelemente miteinander oder mit einzelsträngigen Regionen in Kontakt kommen, um eine komplexere dreidimensionale Struktur zu bilden. Etliche Forscher haben die Bindungsenergien einer großen Zahl von RNA-Duplexstrukturen gemessen und haben eine Gruppe an Regeln abgeleitet, die verwendet werden können, um die Sekundärstruktur von RNA vorauszusagen (siehe z.B. Jaeger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706 (1989); und Turner et al. (1988) Annu. Rev. Biophys. Chem. 17:167). Die Regeln sind bei der Identifizierung von RNA-Strukturelementen nützlich und insbesondere zur Identifizierung von einzelsträngigen RNA-Regionen, die bevorzugte mRNA-Segmente darstellen können, um zum Silencing auf RNAi, Ribozym oder Antisense-Technologien abzuzielen. Demgemäß können bevorzugte Segmente des mRNA-Ziels zum Entwurf der RNAi-vermittelten dsRNA-Oligonucleotide identifiziert werden, sowie zum Entwurf von geeigneten Ribozym- und Hammerkopf-Ribozym-Zusammensetzungen der Erfindung.

[0179] Die dsRNA-Oligonucleotide können durch Transfektion mit einem heterologen Zielgen unter Verwendung von Trägerzusammensetzungen, wie zum Beispiel Liposomen, in die Zelle eingeführt werden, die im Fachgebiet bekannt sind, z.B. Lipofektamin 2000 (Life Technologies) wie beschrieben durch den Hersteller von adhärente Zelllinien. Die Transfektion der dsRNA-Oligonucleotide zum Abzielen auf endogene Gene, kann unter Verwendung von Oligofectamin (Life Technologies) durchgeführt werden. Die Transfektionseffizienz kann unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie für Säugerzelllinien nach der Co-Transfektion von hGFP-codierendem pAD3 (Kehlenback et al. (1998) J Cell Biol 141: 863–74) überprüft werden. Die Wirksamkeit der RNAi kann durch eine Vielzahl an Tests nach der Einführung der dsRNAs bewertet werden. Diese umfassen Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern, welche das POSH-Genprodukt nach ausreichender Zeit für den Umsatz des endogenen Pools erkennen, nachdem die neue Proteinsynthese unterdrückt wird, Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion und Northern-Blot-Analyse, um die Mengen von bestehender POSH-Ziel-mRNA zu bestimmen.

[0180] Weitere Zusammensetzungen, Verfahren und Anwendungen von RNAi-Technologie werden in den U.S. Patentanmeldungsnummern 6.278.039, 5.723.750 und 5.244.805 bereitgestellt.

[0181] Ribozymmoleküle, die entworfen wurden, um POSH-mRNA-Transkripte katalytisch zu spalten, können auch verwendet werden, um die Translation der Test-POSH-mRNA und/oder die Expression von POSH zu verhindern (siehe z.B. PCT Internationale Veröffentlichung WO90/11364, veröffentlicht am 4. Oktober 1990; Sarver et al. (1990) Science 247:1222–1225 und U.S. Patentnummer 5.093.246).

[0182] Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, die im Stande sind die spezifische Spaltung von RNA zu katalysieren. (Für eine Zusammenfassung siehe Rossi (1994) Current Biology 4: 469–471). Die Mechanismen der Ribozymwirkung umfassen sequenzspezifische Hybridisierung des Ribozym-Moleküls mit komplementärer Ziel-RNA, gefolgt durch ein endonucleolytisches Spaltungsereignis. Die Zusammensetzung der Ribozymmoleküle umfasst vorzugsweise eine oder mehrere Sequenzen, die komplementär zu einer POSH mRNA sind und der gut bekannten katalytischen Sequenz, die für mRNA-Spaltung verantwortlich ist oder einer funktionell äquivalenten Sequenz (siehe z.B. U.S. Patentnummer 5.093.246).

[0183] Während Ribozyme, die mRNA an ortsspezifischen Erkennungssequenzen spalten, verwendet werden können, um Ziel-mRNAs zu zerstören, wird die Verwendung von Hammerkopf-Ribozymen bevorzugt. Hammerkopf-Ribozyme spalten mRNAs an Stellen, die durch flankierende Regionen vorgeschrieben werden, die komplementäre Rasenpaare mit der Ziel-mRNA bilden. Vorzugsweise hat die Ziel-mRNA die folgende Sequenz von zwei Basen: 5'-UG-3'. Die Konstruktion und Produktion von Hammerkopf-Ribozymen ist im Fachgebiet gut bekannt und wird in Haseloff und Gerlach genauer beschrieben ((1988) Nature 334:585–591; und siehe PCT Anmeldungsnummer WO89/05852). Hammerkopf Ribozymsequenzen können in eine stabile RNA, wie zum Beispiel eine Transfer-RNA (tRNA) eingebettet sein, um die Spaltungseffizienz in vivo zu erhöhen (Perriman et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175–79; de Feyter, und Gaudron, Methods in Molecular Biology, Bd. 74, Kapitel 43, „Expressing Ribozymes in Plants", herausgegeben von Turner, P.C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.). Insbesondere ist die RNA-Polymerase III vermittelte Expression von tRNA-Fusions-Ribozymen im Fachgebiet gut bekannt (siehe Kawasaki et al. (1998) Nature 393: 284–9; Kuwabara et al. (1998) Nature Biotechnol. 16: 961–5; und Kuwabara et al. (1998) Mol. Cell 2: 617–27; Koseki et al. (1999) J Virol 73: 1868–77; Kuwabara et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886–91; Tanabe et al. (2000) Nature 406: 473–4). Es gibt üblicherweise etliche mögliche Hammerkopf Ribozym-Spaltungsstellen innerhalb einer bestimmten Ziel-cDNA-Sequenz. Vorzugsweise wird das Ribozym so erzeugt, dass die Spaltungs-Erkennungsstelle nahe dem 5'-Ende der Ziel-mRNA liegt, um die Wirksamkeit zu erhöhen und die intrazelluläre Anhäufung von nicht-funktionellen mRNA-Transkripten zu minimieren. Darüber hinaus würde die Verwendung von jeder Spaltungs-Erkennungsstelle, die in der Zielsequenz liegt, welche unterschiedliche Teile der C-terminalen Aminosäuredomäne von zum Beispiel langen oder kurzen Formen des Ziels codiert, das selektive Abzielen auf eine oder mehrere Formen des Ziels ermöglichen und daher einen selektiven Effekt auf eine Form des Ziel-Genprodukts haben.

[0184] Auf Gene abzielende Ribozyme enthalten notwendigerweise eine Hybridisierungsregion, die komplementär zu zwei Regionen von mindestens 5 und vorzugsweise jeweils 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 fortlaufenden Nucleotiden in der Länge von einer POSH mRNA sind, wie zum Beispiel einer mRNA einer Sequenz, die in jeder der SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 6, 8 oder 10 dargestellt ist. Außerdem besitzen Ribozyme hoch spezifische Endoribonucleaseaktivität, die autokatalytisch die Ziel-Sense-mRNA spaltet. Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auf Ribozyme, die mit einer Sense-mRNA hybridisieren, die ein POSH-Gen, wie zum Beispiel ein therapeutisches Arzneistoff-Zielkandidatengen codieren, und dadurch an die Sense-mRNA hybridisieren und sie spalten, sodass sie nicht länger im Stande ist transkribiert zu werden, um ein funktionelles Polypeptidprodukt zu synthetisieren.

[0185] Die Ribozyme der vorliegenden Erfindung umfassen auch RNA-Endoribonucleasen (nachstehend „Cech-artige Ribozyme"), wie zum Beispiel das eine, das natürlich in Tetrahymena thermophila vorkommt (bekannt als die IVS oder L-19 IVS-RNA) und das von Thomas Cech und Mitarbeitern ausführlich beschrieben worden ist (Zaug, et al. (1984) Science 224:574–578; Zaug, et al. (1986) Science 231:470–475; Zaug, et al. (1986) Nature 324:429–433; veröffentlichte Internationale Patentanmeldungsnummer WO88/04300 durch Unitversity Patents Inc.; Been, et al. (1986) Cell 47:207–216). Die Cech-artigen Ribozyme weisen eine acht-Rasenpaare aktive Stelle auf, die an eine Ziel-RNA-Sequenz hybridisiert, wonach die Spaltung der Ziel-RNA stattfindet. Die Erfindung umfasst jene Cech-artigen Ribozyme, die auf Sequenzen mit einer aktiven Stelle von acht-Rasenpaare Länge abzielen, die in einem Zielgen oder einer Nucleinsäuresequenz vorhanden sind.

[0186] Ribozyme können aus modifizierten Oligonucleotiden bestehen (z.B. zur verbesserten Stabilität, Targeting usw.) und sollten an Zellen verabreicht werden, welche das Zielgen in vivo exprimieren. Ein Verabreichungsverfahren umfasst die Verwendung eines DNA-Konstruktes, welches das Ribozym unter der Kontrolle

eines starken konstitutiven Pol III oder Pol II-Promotors „codiert", sodass transfizierte Zellen ausreichende Mengen des Ribozyms produzieren werden, um die endogenen Zielbotschaften zu zerstören und die Translation zu hemmen. Da Ribozyme im Gegensatz zu Antisense-Molekülen katalytisch sind, wird eine niedrigere intrazelluläre Konzentration für die Effizienz benötigt.

[0187] In bestimmten Ausführungsformen kann ein Ribozym entworfen werden, indem zuerst ein Sequenzteil identifiziert wird, der ausreichend ist, um einen wirkungsvollen Knockdown durch RNAi zu bewirken. Der gleiche Sequenzteil kann dann in ein Ribozym aufgenommen werden. In diesem Aspekt der Erfindung sind die auf das Gen abzielenden Teile des Ribozyms oder der RNAi im Wesentlichen die gleiche Sequenz von mindestens 5 und vorzugsweise 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 oder mehr fortlaufende Nucleotide einer POSH-Nucleinsäure, wie zum Beispiel einer Nucleinsäure von irgendeiner der SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 6, 8 oder 10. In einer langen Ziel-RNA-Kette sind erhebliche Zahlen an Zielstellen nicht für das Ribozym erreichbar, da sie innerhalb der sekundären oder tertiären Strukturen versteckt sind (Birikh et al. (1997) Eur J Biochem 245: 1–16). Um das Problem der Ziel-RNA-Erreichbarkeit zu lösen, werden üblicherweise Computererzeugte Vorhersagen der Sekundärstruktur verwendet, um Ziele zu identifizieren, die am wahrscheinlichsten einzelsträngig vorliegen, oder eine „offene" Konfiguration aufweisen (siehe Jaeger et al. (1989) Methods Enzymol 183:281–306). Andere Ansätze nützen einen systematischen Ansatz, zur Vorhersage von Sekundärstrukturen, welcher die Bewertung einer großen Zahl von hybridisierenden Kandidaten-Oligonucleotidmolekülen einschließt (siehe Milner et al. (1997) Nat Biotechnol 15: 537–41; und Patzel und Sczakiel (1998) Nat Biotechnol 16:64–8). Außerdem beschreibt U.S. Patentnummer 6.251.588 Verfahren zur Evaluierung von Oligonucleotidsonden-Sequenzen, um die Möglichkeit zur Hybridisierung einer Nucleinsäure-Zielsequenz vorherzusagen. Das Verfahren der Erfindung stellt die Verwendung von solchen Verfahren bereit, um bevorzugte Segmente an Ziel-mRNA-Sequenzen auszuwählen, von denen vorhergesagt wird, dass sie einzelsträngig sind und ferner die passende Verwendung der gleichen oder im Wesentlichen identischen Ziel-mRNA-Sequenz, die vorzugsweise etwa 10–20 aufeinander folgende Nucleotide der Ziel-mRNA umfasst, sowohl im Entwurf der RNAI-Oligonucieotide, als auch der Ribozyme der Erfindung.

[0188] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der isolierten „Antisense" Nucleinsäuren, zur Hemmung der Expression, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation einer Test-POSH-Nucleinsäure. Die Antisense-Nucleinsäuren können an das mögliche Arzneistoffziel durch herkömmliche Rasenpaar-Komplementarität oder zum Beispiel im Falle der Bindung an DNA-Duplexe, durch spezifische Interaktionen in der Hauptgrube der Doppelhelix binden. Im Allgemeinen beziehen sich diese Verfahren auf den Bereich an Techniken, die im Allgemeinen im Fachgebiet eingesetzt werden und umfassen alle Verfahren, die sich auf spezifische Bindung an Oligonucleotidsequenzen stützen.

[0189] Ein Antisense-Konstrukt der vorliegenden Erfindung kann zum Beispiel als ein Expressionsplasmid verabreicht werden, welches, wenn es in der Zelle transkribiert wird, RNA erzeugt, die komplementär zu mindestens einem einmaligen Teil der zellulären mRNA ist, die ein POSH-Polypeptid codiert. Alternativ ist das Antisense-Konstrukt eine Oligonucleotidsonde, die ex vivo erzeugt wird und die, wenn sie in die Zelle eingeführt wird, Hemmung der Expression durch Hybridisierung der mRNA und/oder der genomischen Sequenzen einer POSH-Nucleinsäure verursacht. Solche Oligonucleotidsonden sind vorzugsweise modifizierte Oligonucleotide, die resistent gegen endogene Nucleasen sind, z.B. Exonucleasen und/oder Endonucleasen sind und daher in vivo stabil sind. Beispielhafte Nucleinsäuremoleküle zur Verwendung als Antisense Oligonucleotide sind Phosphoramidat, Phosphothioat und Methylphosphonat-Analoge der DNA (siehe auch U.S. Patente 5.176.996; 5.264.564; und 5.256.775). Außerdem sind allgemeine Ansätze zur Konstruktion von Oligomeren zusammengefasst worden, die in der Antisense-Therapie nützlich sind, zum Beispiel von Van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958–976; und Stein et al. (1988) Cancer Res 48:2659–2668.

[0190] Hinsichtlich Antisense-DNA werden Oligodesoxyribonucleotide bevorzugt, die aus der Translations-Initiationsstelle, z.B. zwischen den –10 und +10-Regionen des POSH-Gens stammen. Antisense-Ansätze umfassen den Entwurf von Oligonucleotiden (entweder DNA oder RNA), die komplementär zu mRNA sind, die das POSH-Polypeptid codiert. Die Antisense-Oligonucleotide werden an die mRNA-Transkripte binden und die Translation verhindern. Absolute Komplementarität wird, obwohl bevorzugt, nicht benötigt. Im Falle von doppelsträngigen Antisense-Nucleinsäuren, kann daher ein Einzelstrang der Duplex-DNA untersucht werden oder Triplex-Bildung kann getestet werden. Die Fähigkeit zu hybridisieren wird sowohl vom Komplementaritätsgrad als auch der Länge der Antisense-Nucleinsäure abhängen. Im Allgemeinen gilt, je länger die hybridisierende Nucleinsäure, desto mehr Fehlpaarungen kann sie mit einer RNA enthalten und noch immer eine stabile Duplex (oder Triplex, wie auch immer der Fall liegt) bilden. Ein Fachmann kann unter Verwendung von Standardverfahren einen tolerierbaren Grad an Fehlpaarung sicherstellen, um den Schmelzpunkt des hybridisierten Komplexes zu bestimmen.

[0191] Oligonucleotide, die zum 5'-Ende der mRNA komplementär sind, z.B. der 5' nicht-translatierten Sequenz bis zu und einschließlich dem AUG-Initiationscodon, sollten bei der Hemmung der Translation effizienter wirken. Von Sequenzen, die komplementär zu den 3' nicht-translatierten Sequenzen der mRNAs sind, ist jedoch vor kurzem gezeigt worden, dass sie auch bei der Hemmung der Translation von mRNAs effektiv sind (Wagner, R. 1994, Nature 372:333). In einem Antisense-Ansatz zur Hemmung der Translation von dieser mRNA könnten daher Oligdnucleotide verwendet werden, die komplementär zu entweder den 5' oder 3' nicht-translatierten, nicht-codierenden Regionen des Gens sind. Oligonucleotide, die komplementär zu der 5' nicht-translatierten Region der mRNA sind, sollten das Gegenstück des AUG umfassen. Antisense-Oligonucleotide, die komplementär zu mRNA-Codierungsregionen sind, sind weniger wirkungsvolle Translationsinhibitoren, könnten aber auch in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden. Ob sie nun entworfen wurden, um mit der 5', 3' oder der Codierungsregion der mRNA zu hybridisieren, Antisense-Nucleinsäuren sollten mindestens sechs Nucleotide lang sein und sind vorzugsweise weniger als etwa 100 und stärker bevorzugt, weniger als etwa 50, 25, 17 oder 10 Nucleotide lang.

[0192] Es wird bevorzugt, dass in vitro Studien zuerst durchgeführt werden, um die Fähigkeit der Antisense-Oligonucleotide zu quantifizieren, die Genexpression zu hemmen. Es wird bevorzugt, dass diese Studien die Kontrollen nützen, die zwischen Antisense-Genhemmung und unspezifischen biologischen Wirkungen von Oligonucleotiden unterscheiden. Es wird auch bevorzugt, dass diese Studien die Mengen der Ziel-RNA oder des -Proteins mit denen einer internen Kontroll-RNA oder eines -Proteins vergleichen. Ergebnisse, die unter Verwendung des Antisense-Oligonucleotids erhalten werden, können mit jenen verglichen werden, die unter Verwendung eines Kontroll-Oligonucleotids erhalten werden. Es wird bevorzugt, dass das Kontroll-Oligonucleotid ungefähr die gleiche Länge wie das Test-Oligonucleotid aufweist und dass sich die Nucleotidsequenz des Oligonucleotids von der Antisense-Sequenz nicht mehr unterscheidet, als notwendig ist, um spezifische Hybridisierung mit der Zielsequenz zu verhindern.

[0193] Die Antisense-Oligonucleotide können DNA oder RNA oder chimäre Gemische oder Derivate oder modifizierte Versionen davon sein, einzelsträngig oder doppelsträngig. Die Oligonucleotide können am Basenrest, Zuckerrest oder am Phosphatgrundgerüst modifiziert sein, zum Beispiel, um die Stabilität des Moleküls, die Hybridisierung usw. zu verbessern. Das Oligonucleotid kann andere hinzugefügte Gruppen, wie zum Beispiel Peptide (z.B. zum Abzielen auf Wirtszellrezeptoren) umfassen, oder Mittel zur Erleichterung des Transports durch die Zellmembran (siehe z.B. Letsinger et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553–6556; Lemaitre et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648–652; PCT Veröffentlichungsnummer WO88/09810, veröffentlicht am 15. Dezember 1988) oder die Blut-Hirnschranke (siehe zum Beispiel PCT-Veröffentlichungsnummer WO89/10134, veröffentlicht am 25. April 1988), durch Hybridisierung ausgelöste Spaltungsmittel. (Siehe z.B. Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958–976) oder Intercalierende Mittel. (Siehe z.B. Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539–549). Zu diesem Zweck kann das Oligonucleotid mit einem anderen Molekül verbunden sein, z.B. einem Peptid, einem durch Hybridisierung ausgelösten Vernetzungsmittel, Transportmittel, einem durch Hybridisierung ausgelösten Spaltungsmittel usw.

[0194] Das Antisense-Oligonucleotid kann mindestens einen modifizierten Basenrest umfassen, der aus der Gruppe ausgewählt wird, einschließlich aber nicht beschränkt auf 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xantin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxytiethyl), Uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w, und 2,6-Diaminopurin.

[0195] Das Antisense-Oligonucleotid kann auch mindestens einen modifizierten Zuckerrest enthalten, ausgewählt aus der Gruppe einschließlich, aber nicht beschränkt auf Arabinose, 2-Fluoroarabinose, Xylulose und Hexose.

[0196] Das Antisense-Oligonucleotid kann auch ein neutrales Peptid-ähnliches Grundgerüst aufweisen. Solche Moleküle werden als Peptid-Nucleinsäure (PNA)-Oligomere bezeichnet und werden z.B. in Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670 und in Eglom et al. (1993) Nature 365:566 beschrieben. Ein Vorteil von PNA-Oligomeren ist ihre Fähigkeit, aufgrund des neutralen Grundgerüsts der DNA im Wesentlichen unabhängig von der Ionenstärke des Mediums, an komplementäre DNA zu binden. In noch einer ande-

ren Ausführungsform umfasst das Antisense-Oligonucleotid mindestens ein modifiziertes Phosphat-Grundgerüst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Phosphorothioat, einem Phosphorodithioat, einem Phosphoramidothioat, einem Phosphoramidat, einem Phosphordiamidat, einem Methylphosphonat, einem Alkyl-Phosphotriester und einem Formacetal oder Analog davon.

[0197] In noch einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Oligonucleotid ein Alpha-anomerisches Oligonucleotid. Ein alpha-anomeres Oligonucleotid bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, in welcher, im Gegensatz zur üblichen antiparallelen Richtung, die Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625–6641). Das Oligonucleotid ist ein 2'-O-Methylribonucleotid (Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131–6148), oder ein chimäres RNA-DNA-Analog (Inoue et al., 1987, FERS Lett. 215:327–330).

[0198] Während Antisense-Nucleotide, die komplementär zur Codierungsregion einer POSH-mRNA-Sequenz sind, verwendet werden können, können auch jene verwendet werden, die komplementär zur transkribierten nicht-translatierten Region sind.

[0199] In bestimmten Fällen kann es schwierig sein die intrazellulären Konzentrationen von Antisense zu erzielen, die ausreichen, um die Translation von endogenen mRNAs zu unterdrücken. Daher benützt ein bevorzugter Ansatz ein rekombinantes DNA-Konstrukt in welchem das Antisense-Oligonucleotid unter die Kontrolle des starken Pol III- oder Pol II-Promotors gestellt wird. Die Verwendung eines solchen Konstrukts zur Transfektion von Zielzellen wird in der Transkription von ausreichenden Mengen an einzelsträngigen RNAs resultieren, die komplementäre Basenpaare mit dem endogenen möglichen Arzneistoff-Zieltranskript bilden werden und dadurch die Translation verhindern. Zum Beispiel kann ein Vektor so eingeführt werden, dass er durch eine Zelle aufgenommen wird und die Transkription einer Antisense-RNA lenkt. Ein solcher Vektor kann episomal bleiben oder chromosomal integriert werden, solange er transkribiert werden kann, um die gewünschte Antisense-RNA herzustellen. Solche Vektoren können durch rekombinante DNA-Technologieverfahren konstruiert werden, die im Fachgebiet Standard sind. Vektoren können Plasmide, viral oder andere im Fachgebiet bekannte sein, die für Replikation und Expression in Säugerzellen verwendet werden. Die Expression der Sequenz, welche die Antisense-RNA codiert, kann durch irgendeinen im Fachgebiet bekannten Promotor stattfinden, um in Säugern, vorzugsweise in menschlichen Zellen zu wirken. Solche Promotoren können induzierbar oder konstitutiv sein. Solche Promotoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: die SV40 frühe Promotorregion (Bernoist und Chambon, 1981, Nature 290:304–310), der Promotor, der in der langen 3'-terminalen Wiederholung des Rous Sarcoma Virus enthalten ist (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787–797), der Herpes Thymidinkinase-Promotor (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441–1445), die regulatorischen Sequenzen des Metallothioneingens (Brinster et al., 1982, Nature 269:39–42), usw. Jede Art von Plasmid, Cosmid, YAC oder viraler Vektor kann verwendet werden, um das rekombinante DNA-Konstrukt zu erzeugen, das direkt in die Gewebestelle eingeführt werden kann.

[0200] Alternativ kann die POSH-Genexpression durch Abzielen auf Desoxyribonucleotidsequenzen, die komplementär zur regulatorischen Region des Gens sind, reduziert werden (d.h. dem Promotor und/oder Enhancern), um dreifachhelikale Strukturen zu bilden, welche die Transkription des Gens in einer Zielzelle im Körper verhindern. (Siehe allgemein, Helene, C. 1991, Anticancer Drug Res., 6(6):569–84; Helene, C. et al., 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:27–36; und Maher, L.J., 1992, Bioassays 14(12):807–15).

[0201] Nucleinsäuremoleküle, die bei der Tripelhelixbildung zur Hemmung der Transkription verwendet werden sollen, sind vorzugsweise einzelsträngig und bestehen aus Desoxyribonucleotiden. Die Basenzusammensetzung dieser Oligonucleotide sollte Tripelhelixbildung über die Hoogsteen Basenpaarungsregeln fördern, die im Allgemeinen benötigen, dass beträchtliche Abschnitte von entweder Purinen oder Pyrimidinen in einem Strang eines Duplex vorhanden sind. Nucleotidsequenzen können auf Pyrimidin basieren und werden in TAT und CGC-Triplets über die drei assoziierten Stränge der daraus resultierenden Triplehelix resultieren. Die Pyrimidin-reichen Moleküle stellen Basenkomplementarität zu einer Purin-reichen Region eines Einzelstrangs eines Duplex in einer parallelen Orientierung zu diesem Strang bereit. Außerdem können Nucleinsäuremoleküle ausgewählt werden, die Purin-reich sind, zum Beispiel einen Abschnitt an G-Resten enthalten. Diese Moleküle werden eine Tripelhelix mit einem DNA-Duplex bilden, die reich an GC-Paaren ist, in welcher die Mehrzahl der Purinreste auf einem Einzelstrang der Duplex liegt, auf die abgezielt wird, was in CGC-Triplets über die drei Stränge in der Triplex resultiert.

[0202] Alternativ können die möglichen POSH-Sequenzen, die für Tripel-Helixbildung ausgewählt werden können, durch die Bildung eines sogenannten „Switchback"-Nucleinsäuremoleküls erhöht werden. Switchback-Moleküle werden in einer alternierenden 5'-3', 3'-5'-Weise synthetisiert, sodass sie mit dem ersten Strang

einer Duplex Rasenpaar bilden und dann mit dem anderen, wodurch es nicht mehr notwendig ist, dass ein beträchtlicher Abschnitt von entweder Purinen oder Pyrimidinen auf einem Strang der Duplex vorhanden ist.

[0203] Auch offenbart wird die Verwendung von DNA-Enzymen zur Hemmung der Expression des POSH-Gens. DNA-Enzyme beinhalten manche der mechanistischen Kennzeichen von sowohl der Antisense- als auch Ribozym-Technologien. DNA-Enzyme werden so entworfen, dass sie eine bestimmte Nucleinsäure-Zielsequenz erkennen, sehr ähnlich einem Antisense-Oligonucleotid, sie sind jedoch, sehr ähnlich einem Ribozym, katalytisch und spalten die Zielnucleinsäure spezifisch.

[0204] Es gibt gegenwärtig zwei grundlegende Arten von DNA-Enzymen und beide davon werden durch Santoro und Joyce identifiziert (siehe zum Beispiel U.S. Patentnummer 6110462). Das 10-23-DNA-Enzym umfasst eine Schlaufenstruktur, die zwei Arme verbindet. Die beiden Arme stellen Spezifität bereit, indem sie die speziellen Nucleinsäure-Zielsequenzen erkennen, während die Schlaufenstruktur die katalytische Funktion unter physiologischen Bedingungen bereitstellt.

[0205] Um ein ideales DNA-Enzym zu entwerfen, das eine Zielnucleinsäure spezifisch erkennt und spaltet, muss ein Fachmann die einzigartige Zielsequenz zuerst identifizieren. Das kann unter Verwendung des gleichen Ansatzes durchgeführt werden, wie für Antisense-Oligonucleotide umrissen wird. Vorzugsweise ist die einzigartige oder wesentliche Sequenz G/C-reich und ungefähr 18 bis 22 Nucleotide lang. Hoher G/C-Gehalt hilft eine stärkere Interaktion zwischen dem DNA-Enzym und der Zielsequenz zu sichern.

[0206] Beim Synthetisieren des DNA-Enzyms wird die spezifische Antisense-Erkennungssequenz, die das Enzym zur Nachricht leiten wird, so geteilt, dass sie zwei Arme des DNA-Enzyms umfasst und die DNA-Enzymschlaufe zwischen die beiden spezifischen Arme gelegt wird.

[0207] Verfahren der Herstellung und Verabreichung von DNA-Enzymen können zum Beispiel in US 6110462 gefunden werden. Ähnliche Verfahren zur Verabreichung von DNA-Ribozymen in vitro oder in vivo umfassen Verfahren zur Verabreichung eines RNA-Ribozyms, wie vorstehend genau beschrieben. Außerdem wird ein Fachmann erkennen, dass DNA-Enzyme, wie Antisense-Oligonucleotide, wahlweise modifiziert werden können, um die Stabilität zu verbessern und die Abbauresistenz zu verbessern.

[0208] Antisense-RNA und -DNA, Ribozym, RNAi und Triele-Helixmoleküle der Erfindung können durch irgendein im Fachgebiet bekanntes Verfahren zur Synthese von DNA und RNA-Molekülen hergestellt werden. Diese umfassen Techniken für die chemische Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden und Oligoribonucleotiden, die im Fachgebiet gut bekannt sind, wie zum Beispiel chemische Festphasen-Phosphoramidit-Synthese. Alternativ können RNA-Moleküle durch in vitro und in vivo Transkription von DNA-Sequenzen erzeugt werden, welche die Antisense-RNA-Moleküle codieren. Solche DNA-Sequenzen können in eine große Vielzahl an Vektoren eingebaut werden, die geeignete RNA-Polymerasepromotoren, wie zum Beispiel die T7 oder SP6-Polymerase-Promotoren beinhalten. Alternativ können Antisense-cDNA-Konstrukte, die Antisense-RNA konstitutiv oder induzierbar synthetisieren, abhängig vom verwendeten Promotor, stabil in Zelllinien eingebaut werden. Darüber hinaus können verschiedene gut bekannte Modifikationen für Nucleinsäuremoleküle zur Erhöhung der intrazellulären Stabilität und der Halbwertszeit eingeführt werden. Mögliche Modifikationen umfassen, sind aber nicht limitiert auf das Hinzufügen von flankierenden Sequenzen von Ribonucleotiden oder Desoxyribonucleotiden an die 5' und/oder 3'-Enden des Moleküls oder der Verwendung von Phosphorothioat oder 2' O-Methyl eher als eine Phosphodisterase-Verbindung innerhalb des Oligodesoxyribonucleotid-Grundgerüsts.

9. Arzneistoff-Screeningtests

[0209] In bestimmten Aspekten stellt die vorliegende Erfindung auch Tests zur Identifizierung von therapeutischen Mitteln bereit, welche die POSH-Funktion entweder stören oder sie fördern. In bestimmten Ausführungsformen sind Mittel der Erfindung antivirale Mittel, die wahlweise die virale Reifung stören und vorzugsweise, ist das Virus ein Retrovirus, Rhabdovirus oder Filovirus. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen stört ein antivirales Mittel die katalytische Ubiquitin-Ligaseaktivität von POSH (z.B. POSH Auto-Ubiquitinierung oder Übertragung auf ein Zielprotein). In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen stört ein antivirales Mittel die Interaktion zwischen POSH und einem Zielpolypeptid, zum Beispiel kann ein antivirales Mittel die Interaktion zwischen einem SH3-Teil oder einem POSH-Polypeptid und einem Gag-Polypeptid des Virus stören oder irreversibel machen. In weiteren Ausführungsformen sind die Mittel der Erfindung anti-apoptotische Mittel, die wahlweise die JNK- und/oder das NF-κB-Signalübertragung stören. In noch zusätzlichen Ausführungsformen stören Mittel der Erfindung die Signalübertragung einer GTPase, wie zum Beispiel Rac oder Ras, indem sie wahlweise die Interaktion zwischen einem POSH-Polypeptid und einem Rac-Protein stören. In bestimmten

Ausführungsformen modulieren die Mittel der Erfindung die Ubiquitin-Ligaseaktivität von POSH und können verwendet werden, um bestimmte Erkrankungen zu behandeln, die mit der Ubiquitin-Ligaseaktivität in Zusammenhang stehen.

[0210] In bestimmten Ausführungsformen stellt die Erfindung Tests bereit, um Mittel zu identifizieren, optimieren oder sonst zu bewerten, die eine Ubiquitin-verwandte Aktivität von einem POSH-Polypeptid erhöhen oder vermindern. Ubiquitin-verwandte Aktivitäten von POSH-Polypeptiden können die Selbst-Ubiquitinierungs-Aktivität von einem POSH-Polypeptid umfassen, die im Allgemeinen die Übertragung von Ubiquitin von einem E2-Enzym auf das POSH-Polypeptid betreffen und die Ubiquitinierung von einem Zielprotein, das im Allgemeinen die Übertragung eines Ubiquitins aus einem POSH-Polypeptid auf das Zielprotein betrifft. In bestimmten Ausführungsformen wird eine POSH-Aktivität zumindest teilweise durch eine POSH-RING-Domäne vermittelt.

[0211] In bestimmten Ausführungsformen umfasst ein Test die Bildung eines Gemisch, das ein POSH-Polypeptid oder ein Fragment davon umfasst, wobei sowohl das POSH-Polypeptid als auch die Fragmente durch Nucleinsäuren codiert werden, die an menschliche POSH-DNA der SEQ ID NO: 1 hybridisieren und Ubiquitin-Ligaseaktivität beibehalten, ein E2-Polypeptid und eine Quelle von Ubiquitin (die das E2-Polypeptid sein kann, das schon vorher einen Komplex mit Ubiquitin gebildet hat). Wahlweise umfasst das Gemisch ein E1-Polypeptid und wahlweise umfasst das Gemisch ein Ziel-Polypeptid. Zusätzliche Komponenten des Gemischs können ausgewählt werden, um Bedingungen bereitzustellen, die mit der Ubiquitinierung des POSH-Polypeptis übereinstimmen. Ein oder mehrere einer Vielzahl von Parametern kann nachgewiesen werden, wie zum Beispiel POSH-Ubiquitin-Konjugate, E2-Ubiquitin-Thioester, freies Ubiquitin und Ziel-Polypeptid-Ubiquitinkomplexe. Der Begriff „nachweisen" wird hierin verwendet, um eine Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit des nachzuweisenden Gegenstandes zu umfassen (z.B. POSH-Ubiquitin, E2-Ubiquitin, usw.), eine quantitative Messung des nachzuweisenden Gegenstandes, oder einer mathematischen Berechnung, basierend auf dem Nachweis von anderen Parametern, der Anwesenheit, Abwesenheit oder Menge des nachzuweisenden Gegenstandes. Der Begriff „nachweisen" umfasst die Situation worin vom nachzuweisenden Gegenstand bestimmt wird, ob er abwesend ist oder unter dem Sensitivitätsgrad liegt. Nachweis kann den Nachweis einer Markierung (z.B. fluoreszierende Markierung, radioaktive Markierung, und andere nachstehend beschriebene) umfassen, Auflösung und Identifizierung durch Größe (z.B. SDS-PAGE, Massen-Spektrometrie), Reinigung und Nachweis und andere Verfahren, die im Hinblick auf diese Beschreibung einem Fachmann zur Verfügung stehen werden. Zum Beispiel kann radioaktive Markierung durch Szintillationszählung gemessen werden oder durch Densitometrie nach dem Inkontaktbringen mit einer photographischen Emulsion, oder durch Verwendung einer Vorrichtung, wie zum Beispiel einem Phosphorlmager. Densitometrie kann ebenfalls verwendet werden, um gebundenes Ubiquitin nach einer Reaktion mit einem Enzymmarkierungssubstrat zu messen, das ein opakes Produkt erzeugt, wenn eine Enzymmarkierung verwendet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein Test den Nachweis des POSH-Ubiquitinkomplexes. In einem Screeningtest wird ein Testmittel zu dem Gemisch hinzugefügt. Die (das) in einem Screeningtest nachgewiesene(n) Parameter kann (können) mit einer geeigneten Referenz verglichen werden. Eine geeignete Referenz kann ein Test sein, der vorher, gleichzeitig oder später durchgeführt wurde, der das Testmittel vermeidet. Eine geeignete Referenz kann auch ein Durchschnitt von früheren Messungen in der Abwesenheit des Testmittels sein.

[0212] In bestimmten Ausführungsformen umfasst ein Test das Bilden eines Gemisches, umfassend ein POSH-Polypeptid, ein Ziel-Polypeptid und eine Quelle an Ubiquitin (die das POSH-Polypeptid darstellen kann, das vorher mit Ubiquitin einen Komplex eingegangen ist). Wahlweise umfasst das Gemisch ein E1 und/oder E2-Polypeptid und wahlweise umfasst das Gemisch einen E2-Ubiquitinkomplex. Zusätzliche Komponenten des Gemischs können ausgewählt werden, um Bedingungen bereitzustellen, die mit der Ubiquitinierung des Ziel-Polypeptids übereinstimmen. Ein oder mehrere einer Vielzahl von Parametern kann nachgewiesen werden, wie zum Beispiel POSH-Ubiquitin-Komplexe und Ziel-Polypeptid-Ubiquitin-Komplexe. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein Test den Nachweis eines Ziel-Polypeptid-Ubiquitin-Komplexes. In einem Screeningtest wird ein Testmittel zu dem Gemisch hinzugefügt. Das (die) in einem Screeningtest nachgewiesene(n) Parameter kann (können) mit einer geeigneten Referenz, wie vorstehend beschrieben, verglichen werden. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen setzt ein Screeningtest für ein antivirales Mittel ein Zielpolypeptid ein, das eine L-Domäne umfasst und vorzugsweise eine HIV L-Domäne.

[0213] In bestimmten Ausführungsformen wird ein Test in einem Hochdurchsatz-Format durchgeführt. Zum Beispiel kann eine der Komponenten eines Gemischs an einem festen Substrat befestigt werden und eine oder mehrere der anderen Komponenten ist markiert. Zum Beispiel kann das POSH-Polypeptid an einer Oberfläche, wie zum Beispiel einer Platte mit 96 Vertiefungen, befestigt werden und das Ubiquitin liegt in Lösung und markiert vor. Ein E2 und E1 ist auch in Lösung und die POSH-Ubiquitinkomplexbildung kann durch Waschen der festen Oberfläche gemessen werden, um nicht als Komplex vorliegendes, markiertes Ubiquitin zu entfer-

nen und das Ubiquitin nachzuweisen, das gebunden bleibt. Andere Variationen können verwendet werden. Zum Beispiel kann die in Lösung vorliegende Ubiquitinmenge nachgewiesen werden. In bestimmten Ausführungsformen kann die Bildung von Ubiquitinkomplexen durch eine interaktive Technik gemessen werden, wie zum Beispiel FREI, wobei ein Ubiquitin mit einem ersten Marker markiert ist und der gewünschte Komplexpartner (z.B. POSH-Polypeptid oder Ziel-Polypeptid) mit einer zweiten Markierung markiert ist, wobei der erste und der zweite Marker interagieren, wenn sie sich nahe kommen, um ein verändertes Signal zu erzeugen. In FREI sind die ersten und zweiten Marker Fluorophore. FREI wird nachstehend näher beschrieben. Die Bildung von Polyubiquitin-Komplexen kann durch Mischen von zwei oder mehreren Pools an unterschiedlich markiertem Ubiquitin durchgeführt werden, das nach der Bildung eines Polyubiquitins interagiert (siehe z.B. US. Patentveröffentlichung 20020042083). Hochdurchsatz kann durch Ausführen eines interaktiven Tests, wie zum Beispiel FREI, auch in Lösung erzielt werden. Wenn ein Polypeptid in dem Gemisch, so wie das POSH-Polypeptid oder Ziel-Polypeptid, leicht zu reinigen ist (z.B. mit einem spezifischen Antikörper oder über ein Tag wie zum Beispiel Biotin, FLAG, Polyhistidin, usw.), kann die Reaktion außerdem in Lösung durchgeführt werden und das Polypeptid mit dem Tag schnell, gemeinsam mit irgendwelchen Polypeptiden, wie zum Beispiel Ubiquitin isoliert werden, die mit dem Polypeptid mit tag in Zusammenhang stehen. Proteine können auch durch den Nachweis mittels SDS-PAGE aufgelöst werden.

[0214] In bestimmten Ausführungsformen ist das Ubiquitin entweder direkt oder indirekt markiert. Das ermöglicht üblicherweise einen leichten und schnellen Nachweis und Messung von ligiertem Ubiquitin, was den Test für Hochdurchsatz Screening-Anwendungen nützlich macht. Wie vorstehend beschrieben können bestimmte Ausführungsformen ein oder mehrere „tagged" oder markierte Proteine einsetzen. Ein „tag" soll Reste umfassen, die eine schnelle Isolierung des Polypeptids mit tag erleichtern. Ein tag kann verwendet werden, um die Anhaftung eines Polypeptids an einer Oberfläche zu erleichtern. Eine Markierung soll Reste umfassen, welche einen schnellen Nachweis des markierten Polypeptids ermöglichen. Bestimmte Reste können sowohl als eine Markierung sowie auch als Tag verwendet werden (z.B. Epitop-Tags, die leicht zu reinigen sind und mit einem gut-charakterisierten Antikörper nachgewiesen werden). Biotinylierung von Polypeptiden ist gut bekannt, zum Beispiel sind etliche Biotinylierungsmittel bekannt, einschließlich Amin-reaktiven und Thiol-reaktiven Mitteln für die Biotinylierung von Proteinen, Nucleinsäuren, Kohlenhydraten, Carbonsäuren; siehe Kapitel 4, Molecular Probes Catalog, Haugland, 6. Auflage, 1996. Ein biotinyliertes Substrat kann an eine biotinylierte Komponente über Avidin oder Streptavidin angeheftet werden. Auf ähnliche Weise ist auch eine große Zahl an haptenylierenden Reagenzien bekannt.

[0215] Ein „E1" ist ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym. In einer bevorzugten Ausführungsform ist E1 im Stande Ubiquitin an ein E2 zu übertragen. In einer bevorzugten Ausführungsform bildet E1 eine hochenergetische Thiolesterbindung mit Ubiquitin und aktiviert dadurch Ubiquitin. Ein „E2" ist ein Ubiquitin-Trägerenzym (das auch als ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym bekannt ist). In einer bevorzugten Ausführungsform wird Ubiquitin von E1 auf E2 übertragen. In einer bevorzugten Ausführungsform resultiert der Transfer in einer Thiolesterbindung, die zwischen E2 und Ubiquitin gebildet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist E2 im Stande Ubiquitin auf ein POSH-Polypeptid zu übertragen.

[0216] In einer alternativen Ausführungsform wird ein POSH-Polypeptid, E2 oder Ziel-Polypeptid an eine Perle gebunden, wahlweise mit der Unterstützung einer Markierung („Tag"). Nach der Ligation können die Perlen von dem ungebundenen Ubiquitin abgetrennt und das gebundene Ubiquitin gemessen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das POSH-Polypeptid an Perlen gebunden und die verwendete Zusammensetzung umfasst markiertes Ubiquitin. In dieser Ausführungsform können die Perlen mit gebundenem Ubiquitin unter Verwendung einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierungs (FACS) Maschine abgetrennt werden. Verfahren für eine solche Verwendung werden in der U.S. Patentanmeldung mit der Seriennummer 09/047.119 beschrieben. Die Menge an gemessenem Ubiquitin kann dann gemessen werden.

[0217] In einem Screeningtest kann die Wirkung eines Testmittels zum Beispiel bewertet werden, indem die Wirkung des Testmittels auf Kinetiken, Ruhezustand und/oder Endpunkt der Reaktion bewertet wird.

[0218] Die Komponenten der verschiedenen Testgemische, die hierin bereitgestellt werden, können in verschiedenen Mengen vereinigt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Ubiquitin (oder E2 im Komplex mit Ubiquitin) bei einer Endkonzentration von 5 bis 200 ng pro 100 Mikroliter Reaktionslösung kombiniert.

[0219] Wahlweise wird E1 bei einer Endkonzentration von 1 bis 50 ng pro 100 µl Reaktionslösung verwendet. Wahlweise wird E2 bei einer Endkonzentration von 10 bis 100 ng pro 100 µl Reaktionslösung kombiniert, stärker bevorzugt 10–50 ng pro 100 µl Reaktionslösung. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das POSH-Polypeptid bei einer Endkonzentration von 1 ng bis 500 ng pro 100 µl Reaktionslösung kombiniert.

[0220] Im Allgemeinen wird ein Testgemisch so erzeugt, dass es die Ubiquitin-Ligaseaktivität und/oder Ubiquitinierungsaktivität fördert. Im Allgemeinen werden das physiologische Bedingungen sein, wie zum Beispiel 50–200 mM Salz (z.B. NaCl, KCl), pH-Wert zwischen 5 und 9 und vorzugsweise zwischen 6 und 8. Solche Bedingungen können durch Versuch und Irrtum optimiert werden. Inkubationen können bei jeden Temperaturen durchgeführt werden, welche die optimale Aktivität erleichtern, üblicherweise zwischen 4 und 40 Grad Celsius. Inkubationsperioden werden für optimale Aktivität ausgewählt, können aber auch optimiert werden, um schnelles Hochdurchsatz-Screening zu erleichtern. Üblicherweise werden zwischen 0,5 und 1,5 Stunden ausreichend sein. Eine Vielzahl an anderen Reagenzien kann in die Zusammensetzungen aufgenommen werden. Diese umfassen Reagenzien wie Salze, Lösungsmittel, Puffer, neutrale Proteine, z.B. Albumin, Detergentien, usw., die verwendet werden können, um die optimale Ubiquitinierungs-Enzymaktivität zu erleichtern und/oder unspezifische Hintergrunds-Interaktionen zu vermindern. Auch Reagenzien, die sonst die Wirksamkeit des Tests verbessern, wie zum Beispiel Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, antimikrobielle Mittel usw., können verwendet werden. Diese Zusammensetzungen werden vorzugsweise auch Adenosintriphosphate (ATP) umfassen. Das Komponentengemisch kann in jeder Reihenfolge hinzugefügt werden, welche die Ubiquitin-Ligaseaktivität fördert oder die Identifizierung von Wirkungen der Kandidatenmodulatoren optimiert. In einer alternativen Ausführungsform wird Ubiquitin in einer Reaktions-Pufferlösung bereitgestellt, gefolgt durch Hinzufügen der Ubiquitinierungsenzyme. In einer abwechselnden bevorzugten Ausführungsform wird Ubiquitin in einer Reaktions-Pufferlösung bereitgestellt, ein Kandidatenmodulator wird dann hinzugefügt, gefolgt vom Hinzufügen der Ubiquitinierungsenzyme.

[0221] Im Allgemeinen kann ein Testmittel verwendet werden, das die POSH-Ubiquitin-verwandte Aktivität vermindert, um die POSH-Funktion in vivo zu hemmen, während ein Testmittel, welches die POSH-Ubiquitin-verwandte Aktivität erhöht, verwendet werden kann, um die POSH-Funktion in vivo zu stimulieren. Das Testmittel kann für die Verwendung in vivo, z.B. durch Hinzufügen eines hydrophoben Restes, wie zum Beispiel einem Ester, modifiziert werden.

[0222] Bestimmte Ausführungsformen der Erfindung betreffen Tests zur Identifizierung von Mitteln, die an ein POSH-Polypepid von SEQ ID NO: 2 oder ein Fragment davon binden, umfassend mindestens 20 aufeinanderfolgende Aminosäuren, wahlweise eine besondere Domäne von POSH, wie zum Beispiel eine SH3 oder RING-Domäne. In bevorzugten Ausführungsformen ist ein POSH-Polypeptid ein Polypeptid umfassend die vierte SH3-Domäne von hPOSH (SEQ ID NO: 30). Eine große Vielzahl an Tests kann für diesen Zweck verwendet werden, einschließlich markierten in vitro Protein-Protein-Bindungstests, elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests, Immuntests zur Proteinbindung und ähnliches. Das gereinigte Protein kann auch zur Bestimmung der dreidimensionalen Kristallstruktur verwendet werden, die für intermolekulare Wechselwirkungen verwendet werden kann und zum Entwerfen von Testmitteln. In einer Ausführungsform weist ein Testmittel nach, welche die Interaktion von einem oder mehreren betreffenden POSH-Polypeptiden mit einem POSH-AP hemmen. In einer anderen Ausführungsform weist der Test Mittel nach, welche die intrinsische biologische Aktivität von einem POSH-Polypeptid oder einem POSH-Komplex modulieren, wie zum Beispiel enzymatische Aktivität, Bindung an andere zelluläre Komponenten, zelluläre Kompartimentalisierung und ähnliches.

[0223] In einem Aspekt stellt die Erfindung Verfahren und Zusammensetzungen zur Identifizierung von Zusammensetzungen bereit, welche die Funktion von POSH-Polypeptiden stören. Aufgrund der Rolle der POSH-Polypeptide in der viralen Produktion, sind Zusammensetzungen, welche die Bildung oder Stabilität der Protein-Protein-Interaktionen zwischen POSH-Polypeptiden und den Proteinen stören, mit welchen sie interagieren, wie zum Beispiel POSH-APs und insbesondere POSH-Komplexe, welche ein virales Protein umfassen, Kandidaten-Pharmazeutika für die Behandlung von viralen Infektionen.

[0224] Während man nicht an den Mechanismus gebunden sein möchte, wird postuliert, dass POSH-Polypeptide das Zusammenfügen von Proteinkomplexen fördern, die bei der Freisetzung von Virionen wichtig sind. Komplexe der Erfindung können eine Kombination von einem POSH-Polypeptid und einem oder mehreren der Folgenden umfassen: ein POSH-AP; ein POSH-Polypeptid (wie im Falle von einem POSH-Dimer, ein Heterodimer von zwei unterschiedlichen POSH, Homomultimere und Heteromultimere); ein Gag, insbesondere ein HIV-Gag; eine GTPase (z.B. Rac, Rac1, Rho, Ras); ein E2-Enzym; ein Cullin; ein Clathrin; AP-1, AP-2; ein HSP70; ein HSP90, Brca1, Bard1, Nef, PAK1, PAK2, PAK-Familie, Vav, Cdc42, P13K (z.B. p85 oder p110), Nedd4, src (src-Familie), Tsg101, VASP, RNB6, WASP, N-WASP und KIAA0674, ähnlich zu Spred-2, sowie auch in bestimmten Ausführungsformen Proteine, von welchen bekannt ist, dass sie mit Clathrinbeschichteten Vesikeln und/oder Proteinen in Zusammenhang stehen, die am Protein-Sortierungsweg beteiligt sind.

[0225] Die durch ein POSH-Polypeptid gebildete Komplexart wird von den im Protein vorhandenen Domänen abhängen. Während sie nicht als limitierend gedacht sind, werden nachstehend beispielhafte Domänen von

möglichen interagierenden Proteinen bereitgestellt. Von einer RING-Domäne wird erwartet, dass sie mit Cullinen, E2-Enzymen, AP-1, AP-2 und/oder einem Substrat für die Ubiquitinierung interagiert (z.B. einem Protein umfassend eine Gag L-Domäne). Eine SH3-Domäne kann mit einer Gag-L-Domäne und anderen Proteinen interagieren, welche das Sequenzmotiv P(T/S)AP, RXXP(T/S)AP, PXXDY, PXXP, PPXY oder RXXPXXP aufweisen, wie zum Beispiel eine HIV-Gag-Sequenz wie zum Beispiel RQGPKEPFR, PFRDY, PTAP und RPEPTAP.

[0226] In einem bevorzugten Test für ein antivirales Mittel wird das Testmittel auf seine Fähigkeit bewertet die Bildung eines Komplexes von einem POSH-Polypeptid (insbesondere einem, das die vierte SH3-Domäne von hPOSH enthält – SEQ ID NO: 30) und einem Gag-Polypeptid (insbesondere einem Polypeptid, umfassend einer HIV-L-Domäne) zu stören oder zu hemmen. In einem bevorzugten Test für ein anti-apoptotisches Mittel, wird das Testmittel auf seine Fähigkeit überprüft die Bildung von einem Komplex eines POSH-Polypeptids und einem Rac-Polypeptid, insbesondere einem menschlichen Rac-Polypeptid, wie zum Beispiel Rac1 zu stören oder zu hemmen.

[0227] Eine Vielzahl an Testformaten wird ausreichen und jene, die hierin nicht ausdrücklich beschrieben werden, werden im Lichte der vorliegenden Offenbarung trotzdem von einem Fachmann verstanden werden. Testformate, die sich an solche Bedingungen wie Bildung von Proteinkomplexen, enzymatischer Aktivität und sogar einer POSH-Polypeptid-vermittelten-Membran-Neuanordnung oder Vesikelbildungsaktivität annähern, können in vielen verschiedenen Formen erzeugt werden und umfassen Tests, die auf zellfreien Systemen basieren, z.B. gereinigten Proteinen oder Zelllysaten, sowie auch auf Zellen basierende Tests, die intakte Zellen nützen. Einfache Bindungstests können verwendet werden, um Mittel nachzuweisen, die an POSH binden. Solche Bindungstests können auch Mittel identifizieren, die durch Störung der Interaktion zwischen einem POSH-Polypeptid und einem POSH-interagierenden Protein wirken, oder der Übertragung von Ubiquitin auf ein POSH-AP, oder indem die Bindung von einem POSH-Polypeptid oder Komplex auf ein Substrat gestört wird. Mittel, die getestet werden sollen, können zum Beispiel durch Bakterien, Hefe oder andere Organismen (z.B. natürliche Produkte) hergestellt werden, chemisch produziert (z.B. durch kleine Moleküle, einschließlich Peptidomimetika), oder rekombinant produziert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Testmittel ein kleines organisches Molekül, z.B. ein anderes als ein Peptid oder Oligonucleotid, das ein Molekulargewicht von weniger als etwa 2.000 Daltons aufweist.

[0228] In vielen Arzneistoff-Screeningprogrammen, welche die Banken an Verbindungen und natürliche Extrakte testen, sind Hochdurchsatz-Tests wünschenswert, damit die Zahl der begutachteten Verbindungen in einer bestimmten Zeitdauer maximiert wird. Tests der vorliegenden Erfindung, die in zellfreien Systemen durchgeführt werden, wie sie mit gereinigten oder halb-gereinigten Proteinen oder mit Lysaten entwickelt werden, werden oft als „primäre" Screens bevorzugt, das sie erzeugt werden können, um eine schnelle Entwicklung und einen relativ leichten Nachweis einer Änderung im einem molekularen Ziel zu erlauben, das durch eine Testverbindung vermittelt wird. Darüber hinaus können die Wirkungen der zellulären Toxizität und/oder Bioverfügbarkeit der Testverbindung im Allgemeinen im in vitro System ignoriert werden, der Test ist hingegen hauptsächlich auf die Wirkung des Arzneistoffes auf das molekulare Ziel gerichtet, wie in der Änderung der Bindungsaffinität mit anderen Proteinen oder Veränderungen in enzymatischen Eigenschaften des molekularen Ziels offenkundig sein wird.

[0229] In bevorzugten in vitro Ausführungsformen des vorliegenden Tests, umfasst ein rekonstituierter POSH-Komplex ein rekonstituiertes Gemisch von mindestens halb-gereinigten Proteinen. Mit halb-gereinigt ist gemeint, dass die im rekonstituierten Gemisch verwendeten Proteine vorher von anderen zellulären oder viralen Proteinen abgetrennt wurden. Im Gegensatz zu Zelllysaten sind die Proteine, die an der POSH-Komplexbildung beteiligt sind zum Beispiel im Gemisch mit mindestens 50% Reinheit, relativ zu allen anderen Proteinen im Gemisch vorhanden und sind stärker bevorzugt bei einer Reinheit von 90–95% vorhanden. In bestimmten Ausführungsformen des Testverfahrens, stammt das rekonstituierte Proteingemisch aus dem Mischen von hochgereinigten Proteinen, sodass das rekonstituierte Gemisch im Wesentlichen frei von anderen Proteinen ist (zum Beispiel von zellulärem oder viralem Ursprung), was die Fähigkeit den POSH-Komplex-Zusammenbau und/oder Abbau stören oder sie auf andere Weise ändern könnte.

[0230] Testen der POSH-Komplexe in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Kandidateninhibitors kann in jedem Gefäß erzielt werden, das geeignet ist die Reaktionspartner zu enthalten. Beispiele umfassen Mikrotiterplatten, Teströhrchen und Mikro-Zentrifugenröhrchen.

[0231] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können Arzneistoff-Screeningtests erzeugt werden, welche hemmende Mittel auf der Basis ihrer Fähigkeit nachweisen den Zusammenbau oder die Stabilität

des POSH-Komplexes zu stören. In einem beispielhaften Bindungstest wird die Verbindung von Interesse mit einem Gemisch in Kontakt gebracht, das ein POSH-Polypeptid und mindestens ein interagierendes Polypeptid umfasst. Nachweis und Quantifizierung von POSH-Komplexen stellt Mittel bereit, um die Wirksamkeit einer Verbindung zu bestimmen, die Interaktionen zwischen zwei Polypeptiden zu hemmen (oder zu potenzieren). Die Wirksamkeit der Verbindung kann durch Erzeugung von Dosis-Wirkungskurven aus Daten bewertet werden, die unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen von Testverbindungen erhalten wurden. Darüber hinaus kann auch ein Kontrolltest durchgeführt werden, um eine Grundlinie für den Vergleich bereitzustellen. Im Kontrolltest wird die Bildung von Komplexen in der Abwesenheit der Testverbindung quantifiziert.

[0232] Die Komplexbildung zwischen den POSH-Polypeptiden und einem Substrat-Polypeptid kann durch eine Vielzahl an Techniken nachgewiesen werden, viele davon werden tatsächlich vorstehend beschrieben. Zum Beispiel kann die Modulation in der Bildung von Komplexen zum Beispiel unter Verwendung von nachweisbar markierten Proteinen quantifiziert werden (z.B. radioaktiv markiert, mit Fluoreszenz markiert oder enzymatisch markiert), durch Immuntest oder durch chromatographischen Nachweis. Oberflächen Plasmon-Resonanzsysteme, wie zum Beispiel jene, die von Biacore International AB (Uppsala, Schweden) erhältlich sind, können auch verwendet werden, um Protein-Protein-Interaktion nachzuweisen.

[0233] Oft wird es wünschenswert sein, eines der Polypeptide zu immobilisieren, um die Auftrennung von Komplexen aus nicht in Komplexen vorliegenden Formen von einem der Proteine zu erleichtern, sowie die Automatisierung des Tests anzupassen. In einer illustrativen Ausführungsform kann ein Fusionsprotein bereitgestellt werden, das eine Domäne hinzufügt, die es dem Protein erlaubt an eine unlösliche Matrix gebunden zu werden. Zum Beispiel können GST-POSH-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharoseperlen (Sigma Chemical, St. Louis, MO) oder an Glutathion-derivatisierte Mikrotiterplatten absorbiert werden, die dann mit einem möglichen interagierenden Protein, z.B. einem 35S-markierten Polypeptid und der Testverbindung kombiniert werden und unter Bedingungen inkubiert werden, die für die Komplexbildung zuträglich sind. Nach der Inkubation werden die Perlen gewaschen, um jedes ungebundene interagierende Protein zu entfernen und der Matrix-Perlen-gebundene Radioaktivitätsmarker wird direkt bestimmt (z.B. Perlen werden in Szintillationszähler platziert) oder in den Überstand, nachdem die Komplexe dissoziiert sind, z.B. wenn Mikrotiterplatten verwendet werden. Alternativ können, nachdem das ungebundene Protein weggewaschen wurde, die Komplexe von der Matrix dissoziiert werden, durch ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt werden und die Menge an interagierenden Polypeptid, das in der Matix-gebundenen Fraktion gefunden wird, aus dem Gel unter Verwendung von elektorphoretischen Standardtechniken quantifiziert werden.

[0234] In einer weiteren Ausführungsform können unter Verwendung eines immobilisierten POSH Mittel identifiziert werden, die an ein POSH binden. In einer illustrativen Ausführungsform kann ein Fusionsprotein bereitgestellt werden, das eine Domäne hinzufügt, welche es dem Protein erlaubt an eine unlösliche Matrix gebunden zu sein. Zum Beispiel können GST-POSH-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharoseperlen (Sigma Chemical, St. Louis, MO) absorbiert werden oder Glutathion-derivatisierte Mikrotiterplatten, die dann mit einem möglichen markierten Bindemittel kombiniert werden und unter Bedingungen inkubiert werden, die für die Bindung zuträglich sind. Nach der Inkubation werden die Perlen gewaschen, um alles ungebundene Mittel zu entfernen und die Matrix-Perlen-gebundene Markierung wird direkt bestimmt oder im Überstand, nachdem das gebundene Mittel dissoziiert hat.

[0235] In noch einer weiteren Ausführungsform kann das POSH-Polypeptid und mögliches interagierendes Polypeptid verwendet werden, um einen Interaktions-Trap-Assay (siehe auch, U.S. Patentnummer: 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223–232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046–12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920–924; und Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693–1696) für den anschließenden Nachweis von Mitteln zu erzeugen, welche die Bindung von Proteinen aneinander stören.

[0236] Insbesondere verwendet das Verfahren chimäre Gene, die Hybridproteine exprimieren. Um es zu veranschaulichen, ein erstes Hybridgen, das die Codierungssequenz für eine DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators umfasst, kann im Leserahmen mit der Codierungssequenz für ein „Köder"-Protein fusioniert werden, z.B. ein POSH-Polypeptid von ausreichender Länge, um an ein mögliches interagierendes Protein zu binden. Das zweite Hybridprotein codiert eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne, die im Leserahmen mit dem Gen fusioniert ist, das ein „Fisch"-Protein codiert, z.B. ein mögliches interagierendes Protein von ausreichender Länge, um mit dem POSH-Polypeptidteil des Köder-Fusionsproteins zu interagieren. Wenn die Köder- und Fischproteine zur Interaktion im Stande sind, z.B. einen POSH-Komplex zu bilden, bringen sie zwei Domänen des Transkriptionsaktivators in die nahe Umgebung. Diese Nähe verursacht die Transkription eines Reportergens, das funktionsfähig mit einer Transkriptions-Regulationsstelle verbunden ist, die auf den Transkriptionsaktivator reagiert und die Expression des Reportergens kann nachgewiesen werden und verwendet

werden, um für die Interaktion der Köder- und Fischproteine zu bewerten.

[0237] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren das Bereitstellen einer Wirtszelle, vorzugsweise einer Hefezelle, z.B. Kluyverei lactis, Schizosaccharomyces pombe, Ustilago maydis, Saccharomyces cerevisiae, Neuspora crassa, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Pichia pastoris, Candida tropicalis, und Hansenula polymorpha, obwohl S. cerevisiae oder S. pombe am meisten bevorzugt wird. Die Wirtszelle enthält ein Reportergen, das eine Bindungsstelle für die DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators aufweist, der im Köderprotein verwendet wird, sodass das Reportergen zum Beispiel ein nachweisbares Genprodukt exprimiert, wenn das Gen transkriptionell aktiviert ist. Das erste chimäre Gen kann in einem Chromosom der Wirtszelle vorhanden sein, oder als Teil eines Expressionsvektors. Interaktions-Trap-Assays können auch in Säuger- oder bakteriellen Zelltypen durchgeführt werden.

[0238] Die Wirtszelle enthält auch ein erstes chimäres Gen, das im Stande ist in der Wirtszelle exprimiert zu werden. Das Gen codiert ein chimäres Protein, das eine DNA-Bindungsdomäne umfasst, die das empfängliche Element auf dem Reportergen in der Wirtszelle erkennt, und (ii) ein Köderprotein, wie zum Beispiel eine POSH-Polypeptidsequenz.

[0239] Ein zweites chimäres Gen wird auch bereitgestellt, welches im Stande ist in der Wirtszelle exprimiert zu werden und das „Fisch"-Fusionsprotein codiert. In einer Ausführungsform werden sowohl das erste als auch das zweite chimäre Gen in die Wirtszelle in Form von Plasmiden eingeführt. Vorzugsweise jedoch ist das erste chimäre Gen auf einem Chromosom der Wirtszelle vorhanden und das zweite chimäre Gen wird in die Wirtszelle als Teil eines Plasmids eingeführt.

[0240] Vorzugsweise stammen die DNA-Bindungsdomäne des ersten Hybridproteins und die Transkriptions-Aktivierungsdomäne des zweiten Hybridproteins aus Transkriptionsaktivatoren, die trennbare DNA-Bindungs- und Transkriptions-Aktivierungsdomänen aufweisen. Zum Beispiel ist von diesen getrennten DNA-Bindungs- und Transkriptions-Aktivierungsdomänen bekannt, dass sie in dem Hefe GAL4-Protein gefunden werden und es ist bekannt, dass sie in den Hefe-GCN4 und ADR1-Proteinen gefunden werden. Viele andere Proteine, die an der Transkription beteiligt sind, haben auch getrennte Eindungs- und Transkriptions-Aktivierungdomänen, die sie für die vorliegende Erfindung nützlich machen und umfassen zum Beispiel die LexA und VP16-Proteine. Es wird klar sein, dass andere (im Wesentlichen) trankriptionell inerte DNA-Bindungsdomänen in den Testkonstrukten verwendet werden können; wie zum Beispiel Domänen von ACE1, 1cl, Lac-Repressor, jun oder fos. In einer anderen Ausführungsform können die DNA-Bindungsdomäne und die Transkriptions-Aktivierungsdomäne von unterschiedlichen Proteinen stammen. Die Verwendung der LexA-DNA-Bindungsdomäne gewährleistet bestimmte Vorteile. In Hefe enthält der LexA-Rest zum Beispiel keine Aktivierungsfunktion und hat keinen bekannten Effekt auf die Transkription der Hefegene. Außerdem ermöglicht LexA die Kontrolle über die Sensitivität des Tests auf dem Interaktionsniveau (siehe zum Beispiel die Brent et al. PCT-Veröffentlichung WO94/10300).

[0241] In bevorzugten Ausführungsformen ist jede mit den Köder- oder Fischproteinen in Zusammenhang stehende enzymatische Aktivität inaktiviert, z. B. können dominant-negative oder andere Mutanten von einem POSH-Polypeptid verwendet werden.

[0242] Das veranschaulichende Beispiel weiterführend, verursacht die POSH-Polypeptid-vermittelte Interaktion zwischen den Köder- und Fischproteinen in der Wirtszelle, falls eine besteht, daher, dass die Aktivierungsdomäne die Transkription des Reportergens aktiviert. Das Verfahren wird durch Einführen des ersten chimären Gens und des zweiten chimären Gens in die Wirtszelle durchgeführt und indem diese Zelle Bedingungen unterzogen wird, unter welchen die Köder- und Fisch-Fusionsproteine in einer ausreichenden Quantität exprimiert werden, damit dass das Reportergen aktiviert wird. Die Bildung eines POSH-AP-Komplexes resultiert in einem nachweisbaren Signal, das durch die Expression des Reportergens erzeugt wird. Demgemäß kann die Menge der Komplexbildung in der Anwesenheit einer Testverbindung und in der Abwesenheit einer Testverbindung bewertet werden, indem die Expressionsmenge des Reportergens in jedem Fall nachgewiesen wird. Verschiedene Reporterkonstrukte können in Übereinstimmung mit den Verfahren der Erfindung verwendet werden und umfassen zum Beispiel Reportergene, die ein solches nachweisbares Signal erzeugen, wie ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem enzymatischen Signal, einem fluoreszierenden Signal, einem phosphoreszierenden Signal und Arzneistoffresistenz.

[0243] In noch weiteren Ausführungsformen des vorliegenden Tests wird der POSH-Komplex in ganzen Zellen erzeugt, indem Zellkulturtechniken genützt werden, um den betreffenden Test zu unterstützen. Zum Beispiel kann der POSH-Komplex, wie nachstehend beschrieben, in einem eukaryontischen Zellkultursystem, ein-

schließlich Säuger- und Hefe-Zellen eingesetzt werden. Es wird oft wünschenswert sein ein oder mehrere virale Proteine (z.B. Gag oder Env) in solchen Zellen gemeinsam mit einem betreffenden POSH-Polypeptid zu exprimieren. Es kann auch wünschenswert sein, die Zelle mit einem Virus von Interesse zu infizieren. Vorteile der Erzeugung des betreffenden Tests in einer intakten Zelle umfassen die Fähigkeit Inhibitoren nachzuweisen, die in einer Umgebung funktionell sind, die jener, welche die therapeutische Verwendung des Inhibitors benötigen würde mehr entspricht, einschließlich der Fähigkeit des Mittels Zutritt zu einer Zelle zu erlangen. Darüber hinaus sind bestimmte der in vivo Ausführungsformen des Tests, wie zum Beispiel die nachstehend angeführten Beispiele, für Hochdurchsatz-Analyse von Kandidatenmitteln zugänglich.

[0244] Die Komponenten des POSH-Komplexes können endogen für die Zelle sein und ausgewählt werden, um den Test zu unterstützen. Alternativ können manche oder alle der Komponenten aus exdogenen Quellen stammen. Zum Beispiel können Fusionsproteine durch rekombinante Techniken (wie zum Beispiel über die Verwendung eines Expressionsvektors) in die Zelle eingeführt werden, sowie auch durch Mikroinjektion des Fusionsproteins selbst oder durch mRNA, die das Fusionsprotein codiert.

[0245] In vielen Ausführungsformen wird eine Zelle nach der Inkubation mit einem Kandidatenmittel manipuliert und auf eine POSH-Aktivität überprüft. In bestimmten Ausführungsformen wird eine POSH-Aktivität durch die Produktion von Virusähnlichen Partikeln dargestellt. Wie hierin gezeigt wird, kann ein Mittel, das die POSH-Aktivität stört, eine Verminderung der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln verursachen. In bestimmten Ausführungsformen können POSH-Aktivitäten, ohne Limitierungen, Komplexbildung, Ubiquitinierung und Membran-Fusionsereignisse umfassen (z.B. die Freisetzung von viralen Sprossen oder Fusion von Vesikeln). POSH-Komplexbildung kann durch Immunpräzipitation und Analyse von gleichzeitig immunpräzipitierten Proteinen oder Affinitätsreinigung und Analyse von gleichzeitig gereinigten Proteinen bewertet werden. Auf Fluoreszenzresonanzenergie Transfer (FREI) basierende Tests können auch verwendet werden, um die Komplexbildung zu bestimmen. Fluoreszierende Moleküle, die in große Nähe miteinander gebracht werden, welche die richtigen Emissions- und Anregungs-Spektren aufweisen, können FREI darstellen. Die fluoreszierenden Moleküle werden so ausgewählt, dass das Emissionsspektrum von einem der Moleküle (dem Spendermolekül) mit dem Anregungsspektrum des anderen Moleküls (dem Akzeptormolekül) überlappt. Das Spendermolekül wird durch Licht der geeigneten Intensität innerhalb des Spender-Anregungsspektrums angeregt. Der Spender gibt dann die absorbierte Energie als fluoreszierendes Licht ab. Die fluoreszierende Energie, die es erzeugt, wird durch das Akzeptormolekül gelöscht. FREI kann als eine Reduktion in der Intensität des fluoreszierenden Signals vom Spender, der Reduktion der Lebenszeit des angeregten Stadiums, und/oder der Re-Emission des fluorezierenden Lichts bei den längeren Wellenlängen (niedrigere Energien), die für den Akzeptor charakteristisch sind manifestiert sein. Wenn sich die fluoreszierenden Proteine physikalisch trennen, werden FREI-Effekte vermindert oder eliminiert (U.S. Patentnummer 5.981.200).

[0246] Zum Beispiel wird ein Cyan-fluoreszierendes Protein durch Licht bei ungefähr 425–450 nm Wellenlänge angeregt und emittiert Licht im Bereich von 450–500 nm. Gelb-fluoreszierendes Protein wird durch Licht bei ungefähr 500–525 nm angeregt und gibt Licht bei 525–500 nm ab. Wenn diese beiden Protein in Lösung gegeben werden, kann die Cyan- und gelbe Fluoreszenz getrennt sichtbar gemacht werden. Wenn diese beiden Proteine jedoch in große Nähe miteinander gezwungen werden, werden die fluoreszierenden Eigenschaften durch FREI verändert werden. Das bläuliche Licht, das durch CFP emittiert wird, wird vom gelb-fluoreszierenden Protein absorbiert und als gelbes Licht re-emittiert werden. Das bedeutet, dass, wenn die Proteine mit Licht bei Wellenlängen von 450 nm stimuliert werden, das Cyanemittierte Licht stark reduziert wird und das gelbe Licht, das bei dieser Wellenlänge normalerweise nicht stimuliert wird, stark verstärkt wird. FREI wird üblicherweise durch Messung des Spektrums von emittiertem Licht in Antwort auf die Stimulation mit Licht im Anregungsbereich des Spenders und durch Berechnen einer Rate zwischen dem Spender-emittierten Licht und dem vom Akzeptor-emittierten Licht überwacht. Wenn die Spender:Akzeptor-Emissionsrate hoch ist, findet FREI nicht statt und die beiden fluoreszierenden Proteine sind nicht sehr nahe. Wenn die Spender:Akzeptor-Emission niedrig ist, findet FREI statt und die beiden fluoreszierenden Proteine sind sehr nahe. Auf diese Weise kann die Interaktion zwischen einem ersten und zweiten Polypeptid gemessen werden.

[0247] Das Vorkommen von FREI verursacht auch, dass sich die Fluoreszenz-Lebensdauer der fluorezierenden Spender-Einheit vermindert. Diese Veränderung der Fluoreszenz-Lebensdauer kann unter Verwendung einer Technik gemessen werden, die als Fluoreszenz-Lebensdauer Imaging Technologie (FLIM) bezeichnet wird (Verveer et al. (2000) Science 290:1567–1570; Squire et al. (1999) J. Microsc. 193:36; Verveer et al. (2000) Biophys. J. 78:2127). Globale Analysetechniken zum analysieren von FLIM-Daten sind entwickelt worden. Diese Algorithmen verwenden das Verstehen, dass die fluoreszierende Spender-Einheit nur in einer beschränkten Zahl von Zuständen besteht, jede mit einer unterschiedlichen Fluoreszenz-Lebenszeit. Quantitative Karten von jedem Zustand können auf einer Pixel-bei-Pixel-Basis erzeugt werden.

[0248] Um auf FREI basierende Tests durchzuführen, werden sowohl das POSH-Polypeptid als auch das interagierende Protein von Interesse fluoreszierend markiert. Geeignete fluoreszierende Marker sind, im Lichte der Beschreibung, im Fachgebiet gut bekannt. Beispiele werden nachstehend bereitgestellt, aber auch nicht speziell erwähnte geeignete Marker stehen für den Fachmann zu Verfügung. Fluoreszierende Markierung kann durch Expression eines Polypeptids als ein Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein erreicht werden, zum Beispiel fluoreszierende Proteine, die aus Quallen, Korallen oder anderen Hohltieren isoliert wurden. Beispielhafte fluoreszierende Proteine umfassen die vielen Varianten von grünem fluoreszierendem Protein (GFP) von Aequoria victoria. Varianten können lichter, dunkler sein, oder unterschiedliche Anregungs- und/oder Emissionsspektren aufweisen. Bestimmte Varianten werden so verändert, dass sie nicht länger grün erscheinen und können blau, cyan, gelb oder rot erscheinen (bezeichnet als BFP, CFP, YFP bzw. RFP). Fluoreszierende Proteine können stabil durch eine Vielzahl an kovalenten und nicht kovalenten Bindungen mit Polypeptiden verbunden sein, einschließlich zum Beispiel Peptidbindungen (z.B. Expression als ein Fusionsprotein), chemische Quervernetzung und Biotin-Streptavidin-Kopplung. Für Beispiele an fluorezierenden Proteinen, siehe U.S. Patente 5.625.048; 5.777.079; 6.066,476; 6.124.128; Prasher et al. (1992) Gene, 111:229–233; Heim et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:12501–04; Ward et al. (1982) Photochem. Photobiol., 35:803–808; Levine et al. (1982) Corp. Biochem. Physiol., 72B:77–85; Tershikh et al. (2000) Science 290: 1585–88.

[0249] Andere beispielhafte fluoreszierende Einheiten, die im Fachgebiet gut bekannt sind, umfassen Derivate von Fluorescein, Benzoxadioazol, Coumarin, Eosin, Lucifer-Gelb, Pyridyloxazol und Rhodamin. Diese und viele andere beispielhafte fluoreszierende Einheiten können im Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (2000, Molecular Probes, Inc.), gemeinsam mit Verfahrensweisen zur Modifizierung von Polypeptiden mit solchen Einheiten gefunden werden.

[0250] Beispielhafte Proteine, die fluoreszieren, wenn sie mit einer fluoreszierenden Einheit kombiniert werden, umfassen gelbes fluoreszierendes Protein aus Vibrio fischeri (Baldwin et al. (1990) Biochemistry 29:5509–15), Peridinin-Chlorophyll, ein Bindeprotein aus dem Dinoflagellaten Symbiodinium sp. (Morris et al. (1994) Plant Molecular Biology 24:673–77) und Phycobiliproteine aus marinen Cyanobakterien, wie zum Beispiel Synechococcus, z.B. Phycoerythrin und Phycocyanin (Wilbanks et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:1226–35). Diese Proteine benötigen Flavine, Peridin-Chlorophyll bzw. verschiedene Phycobiline, sowie fluoreszierende Co-Faktoren.

[0251] Auf FREI basierende Tests können in Zell-basierenden Tests und in Zellfreien Tests verwendet werden. Auf FREI basierende Tests sind für Hochdurchsatz-Screeningverfahren zugänglich, einschließlich fluoreszenzaktivierter Zellsortierung und Fluoreszenz-Scanning von Mikrotiter-Arrays.

[0252] In einer weiteren Ausführungsform können die Transkriptmengen in Zellen gemessen werden, die höhere oder niedrigere Mengen an POSH-Aktivität aufweisen, um Gene zu identifizieren, die durch POSH reguliert werden. Promotorregionen für solche Gene (oder größere Teile von solchen Genen) können funktionsfähig mit einem Reportergen verbunden sein und in einem Reportergen-basierenden Test zum Nachweis von Mitteln verwendet werden, welche die POSH-regulierte Genexpression verstärken oder vermindern. Transkriptmengen können in jeder im Fachgebiet bekannten Art bestimmt werden, wie zum Beispiel Northern-Blotting, RT-PCR, Mikroarray, usw. Erhöhte POSH-Aktivität kann zum Beispiel durch Einführen eines starken POSH-Expressionsvektors erzielt werden. Verminderte POSH-Aktivität kann zum Beispiel durch RNAi, Antisense, Ribozym, Gen-Knockout usw. erzielt werden.

[0253] Im Allgemeinen können, wo der Screeningtest ein Bindungstest ist (ob Protein-Protein-Bindung, Mittel-Protein-Bindung usw.) ein oder mehrere Moleküle mit einer Markierung verbunden werden, wo die Markierung direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal liefern kann. Verschiedene Markierungen umfassen Radioisotope, Fluoreszenzstoffe, Chemilumineszenzstoffe, Enzyme, spezifische Bindungsmoleküle, Partikel, z.B. magnetische Partikel und ähnliches. Spezifische Bindungsmoleküle umfassen Paare, wie zum Beispiel Biotin und Streptavidin, Digoxin und Antidigoxin usw. Für die spezifischen Bindungsmitglieder, würden die komplementären Mitglieder normal mit einem Molekül markiert werden, das, in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren, den Nachweis gewährleistet.

[0254] Eine Vielzahl von anderen Reagenzien kann im Screeningtest eingeschlossen sein. Diese umfassen Reagenzien wie Salze, neutrale Proteine, z.B. Albumin, Detergentien, usw., die verwendet werden, um die optimale Protein-Protein-Bindung zu unterstützen und/oder unspezifische Hintergrundwechselwirkungen zu vermindern. Reagenzien, welche die Effizienz des Tests verbessern, wie zum Beispiel Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, anti-mikrobielle Mittel usw. können verwendet werden. Das Gemisch an Komponenten wird

in irgendeiner Reihenfolge hinzugefügt, welche die notwendige Bindung gewährleistet. Inkubationen werden bei einer beliebigen geeigneten Temperatur durchgeführt, üblicherweise zwischen 4°C und 40°C. Die Inkubationszeitdauer wird für die optimale Aktivität ausgewählt, kann aber auch optimiert werden, um ein schnelles Hochdurchsatz-Screening zu erleichtern.

[0255] In bestimmten Ausführungsformen kann ein Testmittel auf seine Fähigkeit bewertet werden die Lokalisierung von einem POSH-Polypeptid zu stören, z.B. die POSH-Lokalisierung in den Nucleus und/oder das Golgi-Netzwerk zu verhindern.

10. Zusammensetzungen zur Behandlung von viralen Erkrankungen

[0256] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Zusammensetzungen zur Verwendung als Medikamente für die Behandlung oder Therapie von viralen Erkrankungen bereit und insbesondere Erkrankungen, die durch Hüllen-Viren, retroide Viren und RNA-Viren hervorgerufen werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Retroviren, Rhabdoviren, Lentiviren und Filoviren. Bevorzugte Therapeutika der Erfindung wirken durch Unterbrechen der biologischen Aktivität von einem POSH-Polypeptid oder POSH-Komplex in der viralen Reifung.

[0257] Beispielhafte Therapeutika der Erfindung umfassen Nucleinsäuretherapien wie zum Beispiel RNAi-Konstrukte. Andere POSH-Therapeutika umfassen Polypeptide, Peptidomimetika, Antikörper und kleine Moleküle. Antisense-Therapien der Erfindung umfassen Verfahren zum Einführen von Antisense-Nucleinsäuren, zur Störung der Expression von POSH-Polypeptiden oder Proteinen, die für die POSH-Funktion notwendig sind.

[0258] RNAi-Therapien umfassen Verfahren zum Einführen von RNAi-Konstrukten, um die Expression von POSH-Polypeptiden oder Proteinen herunterzuregulieren, die für die POSH-Funktion notwendig sind. Beispielhafte RNAi-Therapeutika umfassen jede der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25.

[0259] Therapeutische Polypeptide können durch Entwerfen von Polypeptiden erzeugt werden, um bestimmte Proteindomänen nachzuahmen, die bei der Bildung von POSH-Komplexen wichtig sind, wie zum Beispiel SH3 oder RING-Domänen. Zum Beispiel wird ein Polypeptid, umfassend eine POSH-SH3-Domäne, wie zum Beispiel die SH3-Domäne wie sie in SEQ ID NO: 30 dargelegt ist, für die Bindung an eine POSH-SH3-Domäne konkurrieren und wird daher störend auf die Bindung eines Partnerproteins wirken. In einer Ausführungsform kann ein Bindungspartner Gag sein. In einer anderen Ausführungsform kann ein Bindungspartner Rac sein. In einer weiteren Ausführungsform kann ein Polypeptid, das einer L-Domäne ähnelt die Rekrutierung von Gag zum POSH-Komplex stören.

[0260] Im Hinblick auf die Beschreibung sind Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die auf Epitope von POSH und auf mit POSH interagierende Proteine gerichtet sind, im Fachgebiet bekannt. Antikörper können in Zellen in einer Vielzahl an Verfahren eingeführt werden. Ein beispielhaftes Verfahren umfasst die Erzeugung einer Nucleinsäure, die einen einzelkettigen Antikörper codiert, der im Stande ist einen POSH-Komplex zu stören. Eine solche Nucleinsäure kann mit einem Antikörper konjugiert werden, der an Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen bindet. Es wird überlegt, dass, in bestimmten Ausführungsformen, der Antikörper auf virale Proteine abzielen kann, die auf der Oberfläche von infizierten Zellen vorhanden sind und die Nucleinsäure auf diese Weise nur in die infizierten Zellen liefert. Einmal an die Zielzellenoberfläche gebunden wird der Antikörper durch Endocytose aufgenommen und die konjugierte Nucleinsäure wird transkribiert und translatiert, um einen einzelkettigen Antikörper zu produzieren, der mit dem Ziel-POSH-Komplex interagiert und ihn stört. Nucleinsäuren, die den gewünschten Einzelketten-Antikörper exprimieren können auch unter Verwendung einer Vielzahl von herkömmlicheren Techniken, wie zum Beispiel viraler Transfektion (z.B. unter Verwendung eines Adenovirussystems) oder Liposomen-vermittelter Transfektion, in die Zellen eingeführt werden.

[0261] Kleine Moleküle können für ihre Fähigkeit identifiziert werden die Bildung von POSH-Komplexen wie vorstehend beschrieben zu modulieren.

[0262] Im Hinblick auf die Lehren hierin wird ein Fachmann verstehen, dass die Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung auf einen weiten Bereich an Viren anwendbar sind, wie zum Beispiel retroide Viren und RNA-Viren. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf retroide Viren anwendbar. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung ferner auf Retroviren (Retroviridae) anwendbar. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf Lentiviren, einschließlich der Primaten-Lentivirusgruppe anwendbar.

[0263] Während es nicht dazu gedacht ist einschränkend zu sein, umfassen relevante Retroviren: C-Typ-Retrovirus, das im Northern Pike Lymphosarkom verursacht, das C-Typ-Retrovirus, das Nerz infiziert, das Ziegen-Lentivirus, das Schafe infiziert, das infektiöse Pferde Anämievirus (EIAV), das C-Typ-Retrovirus, das Schweine infiziert, das Vogel Leukose Sarcoma Virus (ALSV), das Katzen Leukämievirus (FeLV), das Katzen Aids Virus, das Rinder-Leukämievirus (BLV), das Simian Leukämievirus (SLV), das Simian Immundefizienzvirus (SIV), das menschliche T-Zell-Leukämievirus Typ-I (HTLV-1), das menschliche T-Zell-Leukämievirus Typ-II (HTLV-II), das menschliche Immundefizienzvirus Typ-2 (HIV-2) und menschliches Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1).

[0264] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sind ferner auf RNA-Viren anwendbar, einschließlich ssRNA negativ-Strangviren. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung anwendbar auf Mononegavirales, einschließlich Filoviren. Filoviren umfassen ferner Ebolaviren und Marburg-Viren.

[0265] Andere RNA-Viren umfassen Picornaviren, wie zum Beispiel Enterovirus, Poliovirus, Coxsackievirus und Hepatitis A Virus, die Caliciviren, einschließlich Norwalk-ähnliche Viren, die Rhabdoviren, einschließlich Tollwutvirus, die Togaviren, einschließlich Alphaviren, Semliki-Forestvirus, Denguevirus, Gelbfiebervirus, und Rubellavirus, die Orthomyxoviren, einschließlich Typ A, B und C Influenzaviren, die Bunyaviren, einschließlich dem Rift-Valley-Fiebervirus und das Hantavirus, die Filoviren wie zum Beispiel Ebolavirus und Marburgvirus und die Paramyxoviren, einschließlich Mumpsvirus und Masernvirus. Zusätzliche Viren, die behandelt werden können, umfassen Herpesviren.

11. Wirksame Dosierung

[0266] Toxizität und therapeutische Wirksamkeit von solchen Verbindungen kann durch pharmazeutische Standard-Verfahren in Zellkulturen oder Testtieren, z.B. zur Bestimmung der LD_{50} (der lethalen Dosis für 50% der Population) und der ED_{50} (der therapeutisch effizienten Dosis in 50% der Population) bestimmt werden. Die Dosisrate zwischen toxischem und therapeutischem Effekt ist der therapeutische Index und er kann als die Rate LD_{50}/ED_{50} ausgedrückt werden. Verbindungen, die große therapeutische Indizes aufweisen, werden bevorzugt. Obwohl Verbindungen, die toxische Nebenwirkungen zeigen verwendet werden können, sollte man mit dem Transfersystem, das solche Verbindungen an die Stelle des befallenen Gewebes abzielt vorsichtig sein, um den möglichen Schaden für nicht infizierte Zellen zu minimieren und dadurch Nebenwirkungen zu reduzieren.

[0267] Die von den Zellkulturtests und Tierstudien erhaltenen Daten können bei der Formulierung eines Dosisbereichs zur Verwendung im Menschen verwendet werden. Die Dosierung von solchen Verbindungen liegt vorzugsweise innerhalb des Bereichs von zirkulierenden Konzentrationen, welche die ED_{50} mit wenig oder keiner Toxizität umfassen. Die Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs, abhängig von der angewandten Dosierungsform und dem genützten Verabreichungsweg variieren. Für jede verwendete Verbindung, die in dem Verfahren der Erfindung verwendet wird, kann die therapeutisch effektive Dosis anfänglich aus Zellkulturtest beurteilt werden. Eine Dosis kann in Tiermodellen formuliert werden, um einen zirkulierenden Plasmakonzentrationsbereich zu erzielen, der die IC_{50} beinhaltet (d.h. die Konzentration der Testverbindung, welche die halbmaximale Hemmung der Symptome erzielt), wie sie in der Zellkultur bestimmt wurde. Eine solche Information kann verwendet werden, um nützliche Dosierungen in Menschen genauer zu bestimmen. Mengen im Plasma können zum Beispiel durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gemessen werden.

12. Rezeptur und Verwendung

[0268] Arzneistoffe zur Verwendung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung können in herkömmlicher Weise unter Verwendung von einem oder mehreren physiologisch verträglichen Trägern oder Hilfsstoffen formuliert werden.

[0269] Die Verbindungen und ihre physiologisch verträglichen Salze und Lösungsmittel können daher zur Verabreichung durch z.B. Injektion, Inhalation oder Insufflation (entweder durch den Mund oder die Nase) oder für orale, bukkale, parenterale oder rektale Verabreichung, formuliert werden.

[0270] Eine beispielhafte Zusammensetzung der Erfindung umfasst eine RNAi, die mit einem Verabreichungssystem, wie zum Beispiel einem Liposomensystem gemischt ist und umfasst wahlweise einen verträglichen Hilfsstoff. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zusammensetzung für topische Verabreichung für z.B. Herpesvirus-Infektionen verabreicht.

[0271] Für eine solche Therapie kann die Verbindung der Erfindung für eine Vielzahl an Verabreichungs-Chargen, einschließlich systemischer und topischer oder lokalisierter Verabreichung formuliert werden. Techniken und Formulierungen können im Allgemeinen in Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Esston, PA, gefunden werden. Für die systemische Verabreichung wird eine Injektion bevorzugt, einschließlich intramuskulär, intravenös, intraperitoneal und subkutan. Zur Injektion können die Verbindungen der Erfindung in flüssigen Lösungen formuliert werden, vorzugsweise in physiologisch kompatiblen Puffern, wie zum Beispiel Hank-Lösung oder Ringer-Lösung. Außerdem können die Verbindungen in fester Form formuliert und wieder aufgelöst werden oder sofort vor der Verwendung suspendiert werden. Lyophilisierte Formen sind auch eingeschlossen.

[0272] Für die orale Verabreichung können die Arzneimittel zum Beispiel die Form von Tabletten oder Kapseln annehmen, die durch herkömmliche Mittel mit pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen, wie zum Beispiel Bindemitteln (z.B. vorgelatinisierter Maisstärke, Polyvinylpyrrolidone oder Hydroxypropylmethylzellulose); Füllmitteln (z.B. Lactose, mikrokristalline Zellulose oder Calciumhydrogenphosphat); Gleitmitteln (z.B. Magnesiumstearat, Talk oder Silica); Mitteln, die das Auflösen fördern (z.B. Kartoffelstärke oder Natrium-Stärke-Glycolat); oder Benetzungsmitteln (z.B. Natrium-Lauryl-Sulfat). Die Tabletten können durch Verfahren beschichtet werden, die im Fachgebiet gut bekannt sind. Flüssige Präparate für die orale Verabreichung können zum Beispiel die Form von Lösungen, Sirupen oder Suspensionen annehmen, oder sie können als ein trockenes Produkt zur Zusammensetzung mit Wasser oder anderen geeigneten Vehikeln vor der Verwendung in Kontakt gebracht werden. Solche flüssigen Präparate können durch herkömmliche Mittel wie pharmazeutisch verträglichen Zusatzstoffen, wie zum Beispiel Suspendierungsmittel (z.B. Sorbitolsirup, Zellulosederivate oder hydrogenierte essbare Fette); emulgierende Mittel (z.B. Lecithin oder Acacia); nicht-wässrige Vehikel (z.B. Ationdöl, ölige Ester, Ethylalkohol oder fraktionierte Pflanzenöle); und Konservierungsmittel (z.B. Methyl oder Propyl-p-Hydroxybenzoate oder Sorbinsäure) hergestellt werden. Die Präparate können, wo angebracht, auch Puffersalze, Geschmacksstoffe, Farbstoffe oder Süßungsmittel enthalten.

[0273] Präparate für die orale Verabreichung können in geeigneter Weise formuliert werden, um die kontrollierte Freisetzung der aktiven Verbindung zu ergeben. Für die buccale Verabreichung können die Zusammensetzungen die Form von Tabletten oder Pastillen annehmen, die in einer herkömmlichen Weise formuliert werden. Zur Verabreichung durch Inhalation werden die Verbindungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung herkömmlich in einer Aerosol-Spray-Darreichungsform aus unter Druck stehenden Verpackungen oder einem Sprüher verabreicht, mit der Verwendung eines geeigneten Treibmittel, z.B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlenstoffdioxid oder einem anderen geeigneten Gas. Im Falle eines unter Druck stehenden Aerosols kann die Dosierungseinheit durch Bereitstellen eines Ventils bestimmt werden, um eine abgemessene Menge zu verabreichen. Kapseln und Patronen z.B. aus Gelatine, zur Verwendung in einem Inhalator oder Pulver-Zerstäuber, können so formuliert sein, dass sie ein Pulvergemisch der Verbindung und eine geeignete Pulverbasis, wie zum Beispiel Lactose oder Stärke enthalten.

[0274] Die Verbindungen können für parenterale Verabreichung durch Injektion formuliert werden, z.B. durch Bolus-Injektion oder kontinuierliche Infusion. Rezepturen zur Injektion können in einer Dosis-abhängigen Form, z.B. in Ampullen oder in Multi-Dosierungskontainern, mit einem hinzugefügten Konservierungsstoff präsentiert werden. Die Zusammensetzungen können solche Formen wie Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in öligen oder wässrigen Trägern annehmen und können formulatorische Mittel wie suspendierende, stabilisierende und/oder dispergierende Mittel enthalten. Alternativ kann der aktive Wirkstoff in Pulverform vorliegen, zur Konstitution mit einem geeigneten Träger, z.B. steriles Pyrogen-freies Wasser vor der Verwendung.

[0275] Die Verbindungen können auch in rektalen Zusammensetzungen, wie zum Beispiel Zäpfchen oder Retentions-Klistiere formuliert werden, die z.B. herkömmliche Zäpfchengrundlagen wie Kakaobutter oder andere Glyceride enthalten.

[0276] Zusätzlich zu den vorher beschriebenen Rezepturen können die Verbindungen auch als ein Depotpräparat formuliert werden. Solche lang wirkenden Formulierungen können durch Implantation (zum Beispiel subkutan oder intramuskulär) oder durch intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Zum Beispiel können solche Verbindungen mit geeigneten polymeren oder hydrophoben Materialien formuliert werden (zum Beispiel als eine Emulsion in einem verträglichen Öl) oder Eisen-Austauschharzen oder als schwer lösliche Derivate, zum Beispiel als ein schwer lösliches Salz.

[0277] Systemische Verabreichung kann auch über die Schleimhaut oder Haut erfolgen. Für Verabreichung über die Schleimhaut oder die Haut, werden Durchdringungsmittel in der Formulierung verwendet, die für die zu durchdringende Barriere geeignet sind. Solche Durchdringungsmittel sind im Fachgebiet allgemein bekannt

und umfassen, zum Beispiel für die Verabreichung über die Schleimhaut, Bilesalze und Derivate von Fusidinsäure, zusätzlich können Detergentien verwendet werden, um die Durchdringung zu erleichtern. Verabreichung über die Schleimhaut kann über Nasenspray oder unter Verwendung von Zäpfchen stattfinden. Für die topische Verabreichung werden die Oligomere der Erfindung in Salben, Balsame, Gele oder Cremen formuliert, wie sie im Fachgebiet allgemein bekannt sind. Eine Waschlösung kann lokal verwendet werden, um eine Verletzung oder Entzündung zu behandeln, um die Heilung zu beschleunigen.

[0278] Die Zusammensetzungen können, falls erwünscht in einer Verpackungs- oder Spendervorrichtung präsentiert werden, die eine oder mehrere Formen an Dosierungseinheiten enthalten kann, welche den aktiven Bestandteil enthalten. Die Packung kann zum Beispiel Metall- oder Plastikfolie enthalten, wie zum Beispiel eine Klarsichtverpackung. Die Packungs- oder Spendervorrichtung kann von Anweisungen zur Verabreichung begleitet sein.

[0279] Für Therapien, welche die Verabreichung von Nucleinsäuren umfassen, können die Oligomere der Erfindung für eine Vielzahl an Verabreichungsarten formuliert werden, einschließlich systemischer und topischer oder lokalisierter Verabreichung. Techniken und Formulierungen können allgemein in Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Esston, PA., gefunden werden. Für die systemisch Verabreichung wird Injektion bevorzugt, einschließlich intramuskulärer, intravenöser, intraperitonealer und subkutaner Injektion, die Oligomere der Erfindung können in flüssige Lösungen formuliert sein, vorzugsweise in physiologisch verträgliche Puffer, wie zum Beispiel Hank-Lösung oder Ringer-lösung. Zusätzlich können die Oligomere in fester Form formuliert werden und direkt vor der Verwendung nochmals aufgelöst oder suspendiert werden. Lyophilisierte Formen sind auch eingeschlossen.

[0280] Systemische Verabreichung kann auch über die Schleimhaut oder Haut erfolgen, oder die Verbindungen können oral verabreicht werden. Für die Verabreichung über die Schleimhaut oder Haut werden Durchdringungsmittel in der Rezeptur verwendet, die geeignet sind die Barriere zu durchdringen. Solche Durchdringungsmittel sind im Fachgebiet allgemein bekannt und umfassen zum Beispiel für die Verabreichung über die Schleimhaut, Bilesalze und Derivate von Fusidinsäure. Außerdem können Detergentien verwendet werden, um die Durchdringung zu erleichtern. Verabreichung über die Schleimhaut kann durch Nasensprays oder unter Verwendung von Zäpfchen stattfinden. Für die orale Verabreichung werden die Oligomere in herkömmliche orale Verabreichungsformen wie zum Beispiel Kapseln, Tabletten oder Stärkungsmittel formuliert. Zur topischen Verabreichung werden die Oligomere der Erfindung in Salben, Balsame, Gele oder Cremes formuliert, wie sie im Fachgebiet allgemein bekannt sind.

ERLÄUTERUNGEN

[0281] Die nun allgemein beschriebene Erfindung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele leichter verstanden werden, die hier nur Veranschaulichungszwecke von bestimmten Aspekten und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung einbezogen werden und nicht dazu gedacht sind die Erfindung einzuschränken.

BEISPIELE

1. Rolle von POSH in Virus-ähnlicher Partikel (VLP)-Sprossung

1. Ziel:

[0282] Verwendung von RNAi zur Hemmung der POSH-Genexpression und Vergleich der Effizienz von viraler Sprossung und GAG-Expression und Prozessierung von behandelten und unbehandelten Zellen.

2. Untersuchungsplan:

[0283] HeLa SS-6 Zellen werden mit mRNA-spezifischer RNAi zum Knockdown der Zielproteine infiziert. Nachdem maximale Verminderung des Zielproteins durch RNAi nach 48 Stunden erzielt ist, werden die Zellen zweimal transfiziert – zuerst, um die Ziel-mRNAs zu vermindern und anschließend, um das virale Gag-Protein zu exprimieren. Die zweite Transfektion wird mit pNLenv (Plasmid, das HIV codiert) und mit geringen Mengen an RNAi durchgeführt, um den Knockdown des Zielproteins während der Zeit der Gag-Expression beizubehalten, sowie die Sprossung von VLPs. Die Reduktion in mRNA-Mengen aufgrund des RNAi-Effekts wird durch RT-PCR-Amplifikation der Ziel-mRNA bewiesen.

3. Verfahren, Materialien, Lösungen

a. Verfahren

i. Transfektionen gemäß dem Protokoll des Herstellers und wie im Verfahren beschrieben.
ii. Protein bestimmt durch den Bradfordtest.
iii. SDS-PAGE im Hoeffer-MiniVE-Elektrophoresesystem. Transfer in nassem Bio-Rad Mini-Protean II Transfersystem. Blotts sichtbar gemacht unter Verwendung des Typhoonsystems und ImageQuant Software (ABbiotech)

[0284]

b. Materialien

Material	Hersteller	Katalog#	Chargen#
Lipofektamin (LF2000)	Life Technologies	11668-019	1112496
OptiMEM	Life Technologies	31985-047	3063119
RNAi Lamin A/C	selbst	13	
RNAi TSG101 688	selbst	65	
RNAi Posh 524	selbst	81	
PlenvI 1PTAP	selbst	148	
PlenvI 1ATAP	selbst	149	
Anti-p24 polclonaler Antikörper	Seramun		A-0236/5-10-01
Anti-Kaninchen Cy5 konjugierter Antikörper	Jackson	144-175-115	48715
10% Acrylamid Tris-Glycin SDS-PAGE-Gel	Life Technologies	NP0321	1081371
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell	401353	BA-83
NuPAGE 20 × Tranferpuffer	Life Technologies	NP0006-1	224365
0,45 µm Filter	Schleicher & Schuell	10462100	CS1018-1

c. Lösungen

Lysepuffer	Verbindung	Konzentration
	Tris-HCl pH 7.6	50mM
	$MgCl_2$	5mM
	NaCl	150mM
	Glyzerin	10%
	EDTA	1mM
	EGTA	1mM
	ASB-14 (sofort vor Verwendung hinzufügen)	1%
6 × Probenpuffer	Tris-HCl, pH = 6.8	1M
	Glyzerin	30%
	SDS	10%
	DTT	9.3%
	Bromphenolblau	0.012%
TBS-T	Tris pH = 7.6	20mM
	NaCl	137mM
	Tween-20	0.1%

4. Verfahren

[0285]

a. Plan

Tag				
1	2	3	4	5
Plattieren der Zellen	Transfektion I (nur RNAi)	Passagieren der Zellen (1:3)	Transfektion II (RNAi und pN-lenv) (12 Uhr)	RNA für PCR extrahieren (nach Transfektion)
			RNA für RT-PCR extrahieren (vor Transfektion)	VLPs und Zellen ernten

b. Tag 1

[0286] Plattieren von HeLa SS-6-Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen bei Konzentrationen von 5×10^5 Zellen/Vertiefung.

c. Tag 2

[0287] 2 Stunden vor der Transfektion ersetze Wachstumsmedium mit 2 ml Wachstumsmedium ohne Antibiotika.

Transfektion I:

					RNAi	A	B
					[20µM]	OPtiMEM	LF2000-Mix
Reaktion	RNAi-Name	TAGDA#	Reaktion	RNAi [nM]	µl	(µl)	(µl)
1	Lamin A/C	13	2	50	12.5	500	500
2	Lamin A/C	13	1	50	6.25	250	250
3	TSG101 688	65	2	20	5	500	500
5	Posh 524	81	2	50	12.5	500	500

Transfektionen:

[0288] Herstellen des LF2000-Mix : 250 µl OptiMEM + 5 µl LF2000 für jede Reaktion.

[0289] Mischen durch 5-maliges Umdrehen. Inkubieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

[0290] Erzeugung einer RNA-Verdünnung in OptiMEM (Tabelle 1, Spalte A).

[0291] Tropfenweises Hinzufügen des LF2000-Mix zu der von verdünnten RNA (Tabelle 1, Spalte B). Mischen durch vorsichtiges Vortexen. Inkubation bei Raumtemperatur für 25 Minuten, zugedeckt mit Aluminiumfolie.

[0292] Tropfenweises Hinzufügen von 500 µl Transfektionsgemisch zu den Zellen und Mischen durch Hin- und Herschaukeln.

[0293] Inkubieren über Nacht.

d. Tag 3

[0294] Splitten 1:3 nach 24 Stunden. (Ausplattieren von 4 Vertiefungen für jede Reaktion, außer Reaktion 2, die in 3 Vertiefungen ausplattiert wird).

e. Tag 4

[0295] 2 Stunden vor der Transfektion wird das Medium mit DMEM-Wachstumsmedium ohne Antibiotika ersetzt.

Transfektion II:

				A	B	C	D
Reaktion	RNAi-Name	TAGDA#	Plasmid-Reaktionen(µg/µl	Plasmid für 2.4 Plasmid µg (µl)	RNAi [20µM] für 10nM (µl)	OPtiMEM (µl)	LF2000-Mix (µl)
1	Lamin A/C	13	PTAP 3	3.4	3.75	750	750
2	Lamin A/C	13	PTAP 3	2.5	3.75	750	750
3	TSG101 688	65	PTAP 3	3.4	3.75	750	750
5	Posh 524	81	PTAP 3	3.4	3.75	750	750

[0296] Herstellen des LF2000-Mix : 250 µl OptiMEM + 5 µl LF2000 für jede Reaktion.

[0297] Mischen durch 5-maliges Umdrehen. Inkubieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

[0298] Erzeugung von RNA+DNA, die in OptiMEM (Transfektion II, A+B+C) verdünnt ist. Tropfenweises Hinzufügen des LF2000-Mix (Transfektion II, D) zu verdünnter RNA+DNA, vorsichtiges Mischen durch Vortexen und Inkubieren für 1 Stunde, während es mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt wird.

[0299] Hinzufügen von LF2000 und DNA+RNA zu den Zellen, 500 µl/Vertiefung, Mischen durch vorsichtiges Schaukeln und Inkubieren über Nacht.

f. Tag 5

[0300] Sammeln der Proben für den VLP-Test (ungefähr 24 Stunden nach der Transfektion) durch das folgende Verfahren (Zellen aus einer Vertiefung von jeder Probe werden für den RNA-Test durch RT-PCR entnommen).

g. Zellextrakte

i. Pelletieren der schwebenden Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten, 3000UpM bei 40°C), der Überstand wird aufbewahrt (Fortsetzen mit Überstand sofort in Schritt h), verbleibende Zellen werden in das Medium gekratzt, das in der Vertiefung verbleibt und werden zu dem entsprechenden Zellpellet der schwebenden Zellen hinzugefügt und für 5 Minuten, 18000pM bei 40°C zentrifugiert.
ii. Zweimaliges Waschen des Zellpellets mit eiskaltem PBS.
iii. Resuspendieren des Zellpellets in 100 µl Lysepuffer und Inkubation für 20 Minuten auf Eis.
iv. Zentrifugieren bei 14.000 UpM für 15 Minuten. Überführen des Überstands in ein sauberes Röhrchen. Das ist das Zellextrakt.
v. Herstellen von 10 µl Zellextraktproben für SOS-PAGE durch Hinzufügen von SDS-PAGE-Probenpuffer auf 1 × und Kochen für 10 Minuten. Entfernen eines Aliquots der verbleibenden Probe für die Proteinbestimmung, um das gesamte anfängliche Ausgangsmaterial zu bestätigen. Aufbewahren des verbleibenden Zellextraktes bei –80°C.

h. Reinigung von VPLs aus dem Zellmedium

i. Filtrieren des Überstandes von Schritt g durch einen 0,45 µm Filter.
ii. Zentrifugation des Überstandes bei 14.000 UpM bei 40°C für mindestens 2 Stunden.
iii. Vorsichtiges Absaugen des Überstands.
iv. Resuspendieren des VLP-Pellets in heißem (für mindestens 10 Minuten auf 100°C gewärmt) 1 × Probenpuffer.
v. Kochen der Proben für 10 Minuten, 100°C.

i. Western-Blot-Analyse

i. Laufen aller Proben aus den Schritten A und B auf Tris-Glycin SDS-PAGE 10% (120V für 1,5 Stunden).
ii. Übertragen der Proben auf eine Nitrozellulosemembran (65V für 1,5 Stunden).
iii. Färben der Membran mit Ponceau S-Lösung.
iv. Blockieren mit 10% Magermilch in TBS-T für 1 Stunde.
v. Inkubieren mit anti-p24-Kaninchen 1:500 in TBS-T über Nacht.
vi. 3-mal Waschen mit TBS-T für 7 Minuten bei jeder Waschung.
vii. Inkubation mit dem sekundären anti-Kaninchen Antikörper cy5 1:500 für 30 Minuten.
viii. 5-mal Waschen für 10 Minuten in TBS-T.
ix. Betrachten im Typhoon-Gel Imaging System (Molecular Dynamics/APBiotech) für ein Fluoreszenzsignal.

[0301] Ergebnisse werden in den Fig. 11–Fig. 13 gezeigt.

2. Beispielhafte POSH RT-PCR-Primer und siRNA-Duplex

[0302]

RT-PCR Primer

	Name	Position	Sequenz
Senseprimer	POSH-271	271	5' CTTGCCTTGCCAG-CATAC 3' (SEQ ID NO:12)
Anti-Sense-Primer	POSH-926c	926C	5' CTGCCAGCATT-CCTTCAG 3' (SEQ ID NO:13)

siRNA-Dupex:		
siRNA-Nummer:	153	
siRNA-Name:	POSH-230	
Position in mRNA	426–446	
Zielsequenz:	5' AACAGAGGCCTTGG-AAACCTG 3'	SEQ ID NO: 14
siRNA Sensestrang:	5' dTdTCAGAGGCCUUGG-AAACCUG 3'	SEQ ID NO: 15
siRNA Antisensestrang:	5'dTdTCAGGUUUCCAAGGC-CUCUG 3'	SEQ ID NO: 16
siRNA-Nummer:	155	
siRNA-Name:	POSH-442	
Position in mRNA	638–658	
Zielsequenz:	5' AAAGAGCCTGGA-GACCTTAAA 3'	SEQ ID NO: 17
siRNA Sensestrang:	5' ddTdTAGAGCCUGGAGAC-CUUAAA 3'	SEQ ID NO: 18
siRNA Antisensestrang:	5' ddTdTUUUAAGGUCUC-CAGGCUCU 3'	SEQ ID NO: 19
siRNA-Nummer:	157	
siRNA-Name:	POSH-U111	
Position in in RNA:	2973–2993	
Zielsequenz:	5' AAGGATTGGTATGT-GACTCTG 3'	SEQ ID NO: 20
siRNA Sensestrang:	5' dTdTGGAUUGGUAUGUGA-CUCUG 3'	SEQ ID NO: 21
siRNA Antisensestrang:	5' dTdTCAGAGUCACAUACCA-AUCC 3'	SEQ ID NO: 22
siRNA-Nummer:	159	
siRNA-Name:	POSH-U410	
Position in mRNA	3272–3292	
Zielsequenz:	5' AAGCTGGAT-TATCTCCTGTTG 3'	SEQ ID NO: 23
siRNA Sensestrang:	5' ddTdTGCUGGAUUAUCUC-CUGUUG 3'	SEQ ID NO: 24
siRNA Antisensestrang:	5' ddTdTCAACAGGAGAUAAUC-CAAGC 3'	SEQ ID NO: 25

3. Wirkungen von POSH RNAi auf die HIV-Freisetzung: Kinetiken

A1. Transfektionen

1. Einen Tag vor der Transfektion werden Zellen bei einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/Vertiefung in 15 cm Platten ausplattiert.

2. Zwei Stunden vor der Transfektion wird das Zellmedium mit 20 ml komplettem DMEM ohne Antibiotika ersetzt.
3. DNA-Verdünnung: für jede Transfektion werden 62.5 µl RNAi in 2.5 ml OptiMEM gemäß der nachstehenden Tabelle verdünnt. RNAi-Stammlösung ist 20 µM (empfohlene Konzentration: 50 nM, Verdünnung in Gesamtmedium-Menge 1:400).
4. LF 2000 Verdünnung für jede Transfektion werden 50 µl Lipofektamin 2000 Reagenz in 2,5 ml OptiMEM verdünnt.
5. Inkubation der verdünnten RNAi und LF 2000 für 5 Minuten bei RT.
6. Mischen der verdünnten RNAi mit verdünnter LF2000 und Inkubation für 20–25 Minuten bei RT.
7. Hinzufügen des Gemisch zu den Zellen (tropfenweise) und Inkubation für 24 Stunden bei 37°C in einem CO_2-Inkubator.
8. Einen Tag nach der RNAi-Transfektion werden die Zellen gesplittet (in komplettem MEM-Medium auf 2 15cm Platten und einer Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen).
9. Einen Tag nach dem Splitten der Zellen wird die HIV-Transfektion gemäß SP 30-012-01 durchgeführt.
10. 6 Stunden nach der HIV-Transfektion wird das Medium mit komplettem MEM-Medium ausgetauscht.

*Es ist wichtig die RT-PCR für POSH durchzuführen, um den vollständigen Knockdown sicherzustellen.

(i) A2. Gesamt RNA-Reinigung.

1. Ein Tag nach der Transfektion werden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen.
2. Zellen werden in 2.3 ml/200 µl (für 15 cm Platte/1 Vertiefung von einer Platte mit 6 Vertiefungen) Tri-Reagens gekratzt (mit sterilen Kratzern) und bei –70°C eingefroren (RNA-Reinigung und RT-PCR wird durch Molekularbiologieeinheiten durchgeführt) Ablagenummer A16 – Proben für RT.

[0303]

Behandlung	Chase-Zeit (Stunden)	Fraktion	Markierung
a) Kontrolle = WT	1	Zellen VLP	A1 A1 V
	2	Zellen VLP	A2 A2 V
	3	Zellen VLP	A3 A3 V
	4	Zellen VLP	A4 A4 V
	5	Zellen VLP	A5 A5 V
b) POSH + WT	1	Zellen VLP	B1 B1 V
	2	Zellen VLP	B2 B2 V
	3	Zellen VLP	B3 B3 V
	4	Zellen VLP	B4 B4 V
	5	Zellen VLP	B5 B5 V

c) B. Markierung

1. Entnahme des Hungermediums, Auftauen und auf 37°C stellen.
2. Zellen in Wachstumsmedium kratzen und vorsichtig in 15 ml konische Röhrchen überführen.
3. Zentrifugieren bei 1800 UpM für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um die Zellen zu pelletieren.
4. Absaugen des Überstandes und Stehenlassen des Röhrchens für 10 Sekunden. Entfernen des Restes des Überstands mit einer 200 µl Pipetman.

5. Vorsichtiges Hinzufügen von 10 ml warmen Hungermedium und vorsichtiges Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette, hinauf und hinunter, nur umdrehen könnte das Zellpellet nicht auflösen).
6. Transfer der Zellen in 10 ml Röhrchen und Platzieren in den Inkubator für 60 Minuten. Eppendorf-Thermomixer wird auf 37°C gestellt.
7. Zentrifugieren bei 1800 UpM für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um die Zellen zu pelletieren.
8. Absaugen des Überstands und Stehenlassen für 10 Sekunden. Entfernen des restlichen Überstands mit einem 200 µl Pipetman.
9. Ausschneiden einer 200 µl Spitze vom Ende und vorsichtiges Resuspendieren der Zellen (–1,5 × 10^7 Zellen in 150 µl RPMI ohne Met, aber man muss versuchen nicht über 250 µl zu kommen, wenn man mehr Zellen hat) in 150 µl Hungermedium. Überführen der Zellen in ein Eppendorfröhrchen und Platzieren in den Thermomixer. Warten für 10 Sekunden und Überführen des Rests der Zellen aus dem 10 ml Röhrchen in das Eppendorfröhrchen, falls nötig hinzufügen von weiteren 50 µl, um den Rest der Zellen auszuspülen (alle Proben sollten das gleiche Volumen der Markierungsreaktion aufweisen!).
10. Pulse: Hinzufügen von 50 µl an ^{35}S-Methionin (spezifische Aktivität 14,2 µCi/µl), Röhrchen fest verschließen und in den Thermomixer geben. Mix-Geschwindigkeit auf die Niedrigste setzen (700 UpM) und Inkubieren für 25 Minuten.
11. Beenden des Pulse durch Hinzufügen von 1 ml eiskaltem Chase/Stoppmedium. Röhrchen sehr vorsichtig dreimal schütteln und die Zellen bei 6000 UpM für 6 Sekunden pelletieren.
12. Entfernen des Überstandes mit einer 1 ml Spitze. Vorsichtiges Hinzufügen von 1 ml eiskaltem Chase/Stoppmedium zu den pelletierten Zellen und vorsichtiges Umdrehen, um sie zu resuspendieren.
13. Chase: Überführen aller Röhrchen in den Thermomixer und Inkubieren für die benötigte Chase-Zeit (830:1,2,3,4 und 5 Stunden; 828: 3 nur 3 Stunden). Am Ende der gesamten Chase-Zeit Platzieren der Röhrchen auf Eis, Hinzufügen von 1 ml eiskaltem Chase/Stopp und Pelletieren der Zellen für 1 Minute bei 14.000 UpM. Entfernen des Überstands und Überführen des Überstands in ein zweites Eppendorf-Röhrchen. Einfrieren des Zellpellets bei –80°C, bis alle Röhrchen fertig sind.
14. Zentrifugieren der Überstände für 2 Stunden bei 14.000 UpM, 4°C. Sehr vorsichtige Entnehmen des Überstands, 20 µl im Röhrchen belassen (markiert als V) und bei –80°C bis zu Ende des Zeitverlauf einfrieren.

***Alle Schritte werden auf Eis mit eiskalten Puffern ausgeführt.

15. Wenn der Zeitverlauf vorüber ist werden alle Röhrchen von –80°C entfernt. Lysieren des VLP-Pellets (von Schritt 14) und des Zellpellets (Schritt 13) durch Hinzufügen von 500 µl Lysepuffer (siehe Lösungen), gut durch dreimaliges hinauf und hinunter pipettieren resuspendieren. Inkubieren auf Eis für 15 Minuten und Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge für 15 Minuten bei 4°C, 14.000 UpM. Entfernen des Überstands in ein frisches Röhrchen. Pellet verwerfen.
16. Durchführen einer Immunpräzipitation mit anti-p14-Schaf für alle Proben.

Abschnitt 1.02 C. Immunpräzipitation

1. Vorklärung: Hinzufügen von 15 µl ImmunoPure PlusG (Pierce) zu allen Proben. Rotieren für 1 Stunde in einem Zyklusgerät bei 4°C, Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C und Überführen in ein neues Röhrchen zur IP.
2. Hinzufügen von 20µl an p24-Protein G zu allen Proben, das mit Perlen konjugiert ist und Inkubieren für 4 Stunden in einem Zyklusgerät bei 4°C.
3. Nach den Immunpräzipitationen Überführen aller Immunpräzipitationen in ein frisches Röhrchen.
4. Perlen einmal mit einem Hochsalzpuffer waschen, einmal mit Puffer mit mittlerer Salzkonzentration und einmal mit Puffer mit niedriger Salzkonzentration. Nach jeder Zentrifugation nicht die gesamte Lösung entfernen, sondern 50 µl Lösung auf den Perlen belassen. Nach dem letzten Abzentrifugieren den Überstand vorsichtig mit einer Ladungsspitze entfernen und ~ 10 µl Lösung belassen.
5. Hinzufügen von 20 µl 2 × SDS-Probenpuffer zu jedem Röhrchen. Aufheizen auf 70°C für 10 Minuten.
6. Proben werden auf 10% SDS-PAGE aufgetrennt.
7. Gel wird in 25% Ethanol und 10% Essigsäure für 15 Minuten fixiert.
8. Abgießen der Fixierungslösung und durchtränken der Gele mit Amplify-Lösung (NAMP 100 Amersham) für 15 Minuten.
9. Trocknen der Gele auf einer Wärmeplatte (60–80°C) unter Vakuum.
10. Exponieren der Gele auf einem Screen für 2 Stunden und scannen.

4. Effekt von siRNA gegen menschliches POSH auf die Produktion von infektiösem Virus aus HeLa-Zellen

[0304] Der folgende Plan ist gemäß dem Standard siRNA-Transfektionprotokoll: Plan:

Tage

1	2	3	4	5,5
HeLa-Zellen ausplattieren	RNAi transfizieren	hoch splitten (1:3)	siRNA+HIV-1_{NL4-3} transfizieren	Virus ernten und Infektiositätstest starten, Proben für Western-Blot entnehmen

[0305] Als siRNA wurde das Folgende verwendet:
– #13 (= Laminkontrolle)
– #153 (=menschliche POSH Ub-Ligase)

Tag 3 (ein Tag nach den ersten siRNA-Transfektionen):

– HeLa-Zellen wurden geerntet, nochmals 1:3 in frischem DMEM gesplittet und in T75 Flaschen geimpft.

Tag 4:

– Medium wurde entfernt, frisches DMEM-Medium wurde hinzugefügt und die Zellen wurden nochmals, in Kombination mit einer der folgenden HIV-1-Expressionsplasmide, mit siRNA transfiziert:
– Env– (HIV-1_{NL4-3} (Adachi et al., 1986) mit Deletion im env-Gen, erlaubt die Expression von Env nicht, aber die von anderen HIV-1 Proteinen), und VSV-G (CMV-getriebener Expressionsvektor für vesikuläres-Stomatitis-G-Protein). Diese Kombination erlaubt Einzelrunden-Infektion, da Nachkommenviren nach Infektionen mit VSV-G Pseudotypisierten Viren frei von Env-Glycoproteinen sind.
– Env+(HIV-1_{NL4-3} Wildtyp) für mehrfache Infektionsrunden.

[0306] Beachte: Beide Konstrukte Env– und Env+ enthielten EGFP und wurden in den offenen nef-Leserahmen von HIV-1_{NL4-3} cloniert. Auf diese Weise können alle transfizierten Zellen oder infizierte Zellen mit aktiver Virus-Genexpression durch Autofluoreszenz nachgewiesen werden (basierend auf T. Fukunori et al. 2000, Lenardo et al., 2002).

[0307] Zur Kontrolle wurde eine T25 Flasche mit GFP-N1 transfiziert (ein CMV-Expressionsvektor für einfaches GFP).

Tag 5:

– Die Transfektionseffizienz wurde durch Zählen der fluoreszierenden Zellen in der GFP-N1 transfizierten Kultur unter Verwendung von FACS-Analyse geschätzt.

Tag 5,5:

– 36 Stunden nach der zweiten Transfektion wurde Virus geerntet. Virus Stocklösungen wurden wie folgt erzeugt: HeLa-Zellen wurden abgekratzt und Virus-enthaltende Überstände wurden durch Zentrifugation geklärt (1.000 × g, 5 Minuten) und durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert, um verbleibende Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Stocklösungen wurden aliquotiert und bei –80°C eingefroren. Für biochemische Analysen wurden Virionen von Aliquots der Überstände pelletiert (99 Minuten, 14.000 UpM, 4°C) und lysiert (gemäß Ott et al., 2002). Proben von Zellen und Virusfraktionen wurden durch Western-Blot unter Verwendung von anti-CA-Antikörpern analysiert.
– Für einen Infektiositätstest wurden serielle Verdünnungen von Virusstocklösungen in RPMI-Medium erzeugt und verwendet, um Jurkat-Zellen zu infizieren.
– 3 Tage nach der Infektion wurde der Prozentsatz an infizierten Zellen in parallelen Kulturen durch FACS-Analysen geschätzt. Alle Infektionsexperimente wurden in 3 parallelen Kulturen in Platten mit 96 Vertiefungen angesetzt (basierend auf Bolton et al., 2002).
– Zur Kontrolle wurde eine Kultur mit Zellkulturüberstand aus Zellen inkubiert, die mit GFP-N1 infiziert wa-

ren. Keine fluoreszierenden Zellen wurden nachgewiesen, was die Abwesenheit von unspezifischer Färbung auf Zellen mit GFP von den Virus-Erzeugerzellen beweist.

[0308] Bemerkung: Während der Virusproduktion wurde kein toxischer Effekt (anders als manche mit HIV in Zusammenhang stehende cytopathische Effekte) in mit menschlichem POSH-transfizierten Kulturen beobachtet, wenn es mit Lamintransfizierten Kulturen verglichen wird.

[0309] In Fig. 19 gezeigte Ergebnisse demonstrieren, dass der Knockdown von POSH in Vier-Log-Reduktion von HIV-1-Infektiosität resultiert.

5. Effekt des Knockingdown von menschlichem POSH auf PTAP- und PPEY-vermittelte Virusfreisetzung

[0310] Am ersten Tag des Experiments wurden HeLa SS6-zellen in eine Platte mit 6 Vertiefungen mit 5×10^5 Zellen/Vertiefung ausplattiert. Die Zellen wurden am zweiten Tag mit LF2000-Reagens und mit den folgenden RNAis transfiziert: Lamin, TSG101 und hPOSH (50 nM/Vertiefung). Am dritten Tag wurden die Zellen 1:2 gesplittet. Die Zellen wurden am vierten Tag wieder (mit LF2000-Reagens) mit einer unterstützenden Dosis (10 nM/Vertiefung) der gleichen RNAis und DNA (1 µg/Vertiefung) transfiziert: Lamin mit PTAP, Lamin mit ATAP, Lamin mit PPEY, TSG101 mit PTAP, TSG101 mit PPEY, TSG101 mit ATAP, hPOSH mit PTAP, hPOSH mit PPEY und hPOSH mit ATAP. 24 Stunden später wird der Überstand von VLPs zentrifugiert und Protein aus den Zellen extrahiert. Alle Proben werden auf ein 12% Tris-Glyceringel geladen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit αp24 inkubiert.

[0311] Ergebnisse, die in Fig. 20 gezeigt werden, demonstrieren, dass der hemmende Effekt der viralen Freisetzung des Kockingdown des menschlichen POSH unabhängig vom spezifischen HIV L-Domänenmotiv ist. Mit anderen Worten scheint menschliches POSH sowohl bei der PTAP- als auch bei der PPEY-vermittelten viralen Freisetzung wichtig zu sein. Das deutet darauf hin, dass die Hemmung der menschlichen POSH-Menge/Aktivität möglicherweise gegen die Hemmung der Infektiosität von irgendeinem Virus wirksam sein kann, das PTAP oder PPEY-Motive enthält. HIV (enthält PTAP) und Ebolavirus (enthält PPEY) sind Beispiele von solchen Viren.

6. Effekt von RING und SH3-Deletionen auf HIV-1-Freisetzung

[0312] HeLa-Zellen wurden sequentiell transfiziert (innerhalb von 48 Stunden) mit einem Deletionskonstrukt von menschlichem POSH und pNLenv-1. Die in diesen Experimenten verwendeten Deletionskonstrukte waren: dRING (RING-Domänendeletion), $dSH_3$4 (4. SH_3-Domänendeletion), $dSH_3$1 (1. SH_3-Domänendeletion) und $dSH_3$3 (3. SH_3-Domänendeletion). Als Kontrolle wurden HeLa-Zellen auch sequentiell mit Schein- und pNLenv-1, bzw. Schein- und pNLenv-1ATAP transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen Pulse-Chase-Studien unterzogen. Virale Proteine wurden aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und die pelletierten Virionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie analysiert. Positionen der beiden Haupt-CA-Produkte, p24 und p25 werden durch Doppelpfeile angezeigt. Die Rate von Pr55-Prozessierung wurde durch Berechnung der Rate von CA im Vergleich mit Pr55 berechnet, das intrazellulär bei unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen wurde. Die in Fig. 21 gezeigten Ergebnisse zweigen, dass RING-Deletion in hPOSH, verglichen mit ATAP-Mutantenkontrolle, zu einer vollständigen Hemmung der Sprossung führt. Die $SH_3$4-Domänendeletion hat den gleichen Effekt wie die RING-Deletion.

7. In vitro Test von menschlicher POSH-Selbst-Ubiquitinierung

[0313] Rekombinantes hPOSH wurde mit ATP in der Anwesenheit von E1, E2 und Ubiquitin, wie in jeder Spur angezeigt, inkubiert. Nach Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurden die Reaktionen durch Hinzufügen von SDS-PAGE-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden anschließend in einem 10% Polyacrylamidgel aufgelöst. Die aufgetrennten Proben wurden dann auf Nitrozellulose übertragen und einer Immunblotanalyse mit einem anti-Ubiquitin-polyclonalen Antikörper unterzogen. Die Wanderungsposition der Molekulargewichtsmarker wird rechts angezeigt.

[0314] Poly-Ub: Ub-hPOSH-Konjugate, die als hohe Molekulargewichte nachgewiesen werden, werden nur in Reaktionen herangezogen, die E1, E2 und Ubiquitin enthielten. hPOSH-176 und hPOSH-178 sind ein kurzes und ein langes Derivat (jeweils) von bakteriell exprimierte hPOSH; C, Kontrolle E3.

Artikel II. Ziel

1. Test-ur-Nachweise mit einer Ur-Kette als Funktion von E3 (HRD1) und POSH selbst-Ubiquitinierung.
2. Test Boston Biochem Reagenzien.

Artikel III. Materialien

1. E1-Rekombinante aus Baculovirus
2. E2 Ubch 5c aus Bakterien
3. Ub
4. POSH#178 (1–361) gst fusionsgereinigt aber abgebaut
5. POSH#176 (1–269) gst fusionsgereinigt aber abgebaut
6. hsHRD1 lösliche Ring-enthaltende Region
5. Buffer × 12 (Tris 7,6 40 mM, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ATP 2µm)
6. Verdünnungspuffer (Tris 7,6 40 mM, DTT 1 mM, Ovalbumin 1 µg/µl)

[0315]

Protokoll

	0.1µg/lµl	0.5µg/lµl	5µg/lµl	0.4µg/lµl	2.5µg/lµl	0.8µg/lµl	
	E1	E2	Ub	176	178	Hrd1	B×12
-E1 (E2+176)	-------	0.5	0.5	1	------	------	10
-E2 (E1+176)	1	------	0.5	1	------	------	9.5
-ub (E1+E2+176)	1	0.5	-------	1	------	------	9.5
Sektion 3.01 E1+E2+176+Ub	1	0.5	0.5	1		------	9
-E1 (E2+178)	------	0.5	0.5	------	1	-------	10
-E2 (E1+178)	1	-----	0.5	------	1	-------	9.5
-ub (E1+E2+178)	1	0.5	-----	------	1	-------	9.5

Artikel IV. E1+E2+178+Ub	1	0.5	0.5	------	1	------1	9
Hrd1,E1+E2+Ub	1	0.5	0.5	------	-----	1	8.5

1. Inkubieren für 30 Minuten bei 37°C
2. Laufen auf 12% SDS-PAGE-Gel und Transfer auf Nitrozellulosemembran
3. Inkubation mit anti-Ub-Antikörper

[0316] Die in Fig. 22 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass menschliches POSH Ubiquitinligaseaktivität aufweist.

8. Co-Immunpräzipitation von hPOSH mit myc-tagged aktivierten (V12) und dominant-negativen (N17) Rac 1

[0317] HeLa-Zellen wurden mit Kombinationen von myc-Rac1 V12 oder N17 und hPOSHdelRING-V5 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion (Effizienz 80% wie gemessen durch GFP) wurden die Zellen gesammelt, mit PBS gewaschen und in hypotonischen Lysepuffer aufgeschwollen (10 mM HEPES pH = 7,9, 15 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2mM $MgCl_2$, 1 mM DTT und Proteasehemmer). Die Zellen wurden durch 10 Schläge mit dem Dounce-Homogenisator lysiert und bei 3000 × g für 10 Minuten zentrifugiert, um Überstand (Fraktion 1) und Kerne zu ergeben. Die Kerne wurden mit Fraktion 2-Puffer gewaschen (0,2% NP-40, 10 mM HEPES pH-Wert = 7,9, 40 mM KCl, 5% Glyzerin), um periphere Proteine zu entfernen. Kerne wurden herunter zentrifugiert und der Überstand gesammelt (Fraktion 2). Nucleare Proteine wurden in Fraktion 3-Puffer (20 mM HEPES pH-Wert = 7,9, 0,42 M KCl, 25% Glyzerin, 0,1 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) durch Rotieren für 30 Minuten im kalten eluiert. Unlösliche Proteine wurden bei 14.000 × g herunter zentrifugiert und in Fraktion

4-Puffer (1% Fos-Cholin 14, 50 mM HEPES pH-Wert = 7,9, 150 mM NaCl, 10% Glyzerin, 1 mM EDTA, 1,5 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT) aufgelöst. Die Hälfte des Gesamtextraktes wurde gegen Protein A-Sepharose für 1,5 Stunden vorgeklärt und für eine IP mit 1 µg anti-myc (9E10, Roche 1-667-149) und Protein A-Sepharose für 2 Stunden verwendet. Immunkomplexe wurden ausgiebig gewaschen und in SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Gele wurden gelaufen und die Proteine wie in **Fig. 23** zum Immunblot auf Nitrozellulose elektro-transferiert. Endogenes POSH und transfiziertes hPOSHdeIRING-V5 wurden als ein Komplex mit Myc-Rac1 V12/N17 präzipitiert.

9. Knockdown von hPOSH schließt HIV-Viruspartikel in intrazellulären Vesikeln ein.

[0318] HIV-Virusfreisetzung wurde durch Elektronenmikroskopie nach siRNA und Volllängen-HIV-Plasmid-Transfektion (welchem, die für die Hülle codierenden Region fehlt) analysiert. Reife Viren werden durch Zellen sezerniert, die mit HIV-Plasmid und nicht-relvanter siRNA infiziert sind (Kontrolle, unteres Feld). Knockdown von Tsg101 Protein resultierte in einem Sprossungsdefekt, die Viren, die freigesetzt wurden, wiesen einen unreifen Phänotyp auf (oberes Feld). Knockdown von hPOSH-Mengen resultierte in der Akkumulation von Viren innerhalb der Zelle in intrazellulären Vesikeln (mittleres Feld). Die in **Fig. 24** gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hemmung von hPOSH HIV-Viruspartikel in intrazellulären Partikeln einschließt. Nachdem die Anreicherung von HIV-Partikeln in der Zelle den Zelltod beschleunigt, zerstört die Hemmung von hPOSH daher ein HIV-Reservoir, indem es die mit HIV infizierten Zellen tötet.

10. POSH liegt an zwei Stellen, eine in den Kernen und eine im Golgi (C). Nach der HIV-Transfektion wird die Rekrutierung von POSH in den Golgi verstärkt (D)

[0319] HeLa- und 293T-Zellen werden mit pNenv-1 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit primären Antikörpern gegen POSH, gemeinsam mit entweder anti-p24 Gag (B) oder einem der Organellenmarker wie folgt inkubiert: BiP – endoplasmatisches Retikulum (Daten nicht gezeigt), GM130- Golgi, (C,D) Nucleoporin-Kernmatix (E, F) und Histon H1- Nucleus (Daten nicht gezeigt). Zwei unterschiedliche Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper wurden verwendet. Spezifische Signale wurden durch Laser-Scanning konfokale Mikroskopie erhalten und einzelne Signale wurden übereinander gelegt, um ihre relativen Positionen zu bewerten. Wie in **Fig. 7** gezeigt, liegt POSH (A) im Nucleus und co-lokalisiert teilweise, nach der Transfektion außerhalb des Nucleus, wahrscheinlich in die Kernmatix (B), mit dem HIV-1 Gag.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Proteologics, Inc.

<120> POSH Nucleinsäure, Polypeptide und darauf bezogene Verfahren

<130> PC/P12555EP

<140> EP02257796.9
<141> 11.11.2002

<150> 10/293965
<151> 12.11.2002

<150> 60/345846
<151> 09.11.2001

<160> 35

<170> PatentIn Version 3.2

<210> 1
<211> 2667
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

atggatgaat cagccttgtt ggatcttttg gagtgtccgg tgtgtctaga gcgccttgat 60
gcttctgcga aggtcttgcc ttgccagcat acgttttgca agcgatgttt gctggggatc 120
gtaggttctc gaaatgaact cagatgtccc gagtgcagga ctcttgttgg ctcgggtgtc 180
gaggagcttc ccagtaacat cttgctggtc agacttctgg atggcatcaa acagaggcct 240
tggaaacctg gtcctggtgg gggaagtggg accaactgca caaatgcatt aaggtctcag 300
agcagcactg tggctaattg tagctcaaaa gatctgcaga gctcccaggg cggacagcag 360
cctcgggtgc aatcctggag ccccccagtg aggggtatac ctcagttacc atgtgccaaa 420
gcgttataca actatgaagg aaaagagcct ggagacctta aattcagcaa aggcgacatc 480
atcattttgc gaagacaagt ggatgaaaat tggtaccatg gggaagtcaa tggaatccat 540
ggctttttcc ccaccaactt tgtgcagatt attaaaccgt tacctcagcc cccacctcag 600
tgcaaagcac tttatgactt tgaagtgaaa gacaaggaag cagacaaaga ttgccttcca 660
tttgcaaagg atgatgttct gactgtgatc cgaagagtgg atgaaaactg ggctgaagga 720
atgctggcag acaaaatagg aatatttcca atttcatatg ttgagtttaa ctcggctgct 780
aagcagctga tagaatggga taagcctcct gtgccaggag ttgatgctgg agaatgttcc 840
tcggcagcag cccagagcag cactgcccca aagcactccg acaccaagaa gaacaccaaa 900
aagcggcact ccttcacttc cctcactatg gccaacaagt cctcccaggc atcccagaac 960
cgccactcca tggagatcag ccccctgtc ctcatcagct ccagcaaccc cactgctgct 1020
gcacggatca gcgagctgtc tgggctctcc tgcagtgccc cttctcaggt tcatataagt 1080
accaccgggt taattgtgac cccgccccca agcagcccag tgacaactgg cccctcgttt 1140
actttcccat cagatgttcc ctaccaagct gcccttggaa ctttgaatcc tcctcttcca 1200
ccacccccctc tcctggctgc cactgtcctt gcctccacac caccaggcgc caccgccgcc 1260

gctgctgctg ctggaatggg accgaggccc atggcaggat ccactgacca gattgcacat 1320
ttacggccgc agactcgccc cagtgtgtat gttgctatat atccatacac tcctcggaaa 1380
gaggatgaac tagagctgag aaaaggggag atgtttttag tgtttgagcg ctgccaggat 1440
ggctggttca aagggacatc catgcatacc agcaagatag gggttttccc tggcaattat 1500
gtggcaccag tcacaagggc ggtgacaaat gcttcccaag ctaaagtccc tatgtctaca 1560
gctggccaga caagtcgggg agtgaccatg gtcagtcctt ccacggcagg agggcctgcc 1620
cagaagctcc agggaaatgg cgtggctggg agtcccagtg ttgtccccgc agctgtggta 1680
tcagcagctc acatccagac aagtcctcag gctaaggtct tgttgcacat gacggggcaa 1740
atgacagtca accaggcccg caatgctgtg aggacagttg cagcgcacaa ccaggaacgc 1800
cccacggcag cagtgacacc catccaggta cagaatgccg ccggcctcag ccctgcatct 1860
gtgggcctgt cccatcactc gctggcctcc ccacaacctg cgcctctgat gccaggctca 1920
gccacgcaca ctgctgccat cagtatcagt cgagccagtg cccctctggc ctgtgcagca 1980
gctgctccac tgacttcccc aagcatcacc agtgcttctc tggaggctga gcccagtggc 2040
cggatagtga ccgttctccc tggactcccc acatctcctg acagtgcttc atcagcttgt 2100
gggaacagtt cagcaaccaa accagacaag gatagcaaaa aagaaaaaaa gggtttgttg 2160
aagttgcttt ctggcgcctc cactaaacgg aagccccgcg tgtctcctcc agcatcgccc 2220
accctagaag tggagctggg cagtgcagag cttcctctcc agggagcggt ggggcccgaa 2280
ctgccaccag gaggtggcca tggcagggca ggctcctgcc ctgtggacgg ggacggaccg 2340
gtcacgactg cagtggcagg agcagccctg gcccaggatg cttttcatag gaaggcaagt 2400
tccctggact ccgcagttcc catcgctcca cctcctcgcc aggcctgttc ctccctgggt 2460
cctgtcttga atgagtctag acctgtcgtt tgtgaaaggc acagggtggt ggtttcctat 2520
cctcctcaga gtgaggcaga acttgaactt aaagaaggag atattgtgtt tgttcataaa 2580
aaacgagagg atggctggtt caaaggcaca ttacaacgta atgggaaaac tggccttttc 2640
ccaggaagct ttgtggaaaa catatga 2667

<210> 2
<211> 888
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Glu Ser Ala Leu Leu Asp Leu Leu Glu Cys Pro Val Cys Leu
1 5 10 15

Glu Arg Leu Asp Ala Ser Ala Lys Val Leu Pro Cys Gln His Thr Phe
20 25 30

Cys Lys Arg Cys Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Arg Asn Glu Leu Arg
35 40 45

```
Cys Pro Glu Cys Arg Thr Leu Val Gly Ser Gly Val Glu Glu Leu Pro
    50                  55                  60

Ser Asn Ile Leu Leu Val Arg Leu Leu Asp Gly Ile Lys Gln Arg Pro
65                  70                  75                  80

Trp Lys Pro Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asn Cys Thr Asn Ala
                85                  90                  95

Leu Arg Ser Gln Ser Ser Thr Val Ala Asn Cys Ser Ser Lys Asp Leu
            100                 105                 110

Gln Ser Ser Gln Gly Gly Gln Gln Pro Arg Val Gln Ser Trp Ser Pro
        115                 120                 125

Pro Val Arg Gly Ile Pro Gln Leu Pro Cys Ala Lys Ala Leu Tyr Asn
    130                 135                 140

Tyr Glu Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Lys Phe Ser Lys Gly Asp Ile
145                 150                 155                 160

Ile Ile Leu Arg Arg Gln Val Asp Glu Asn Trp Tyr His Gly Glu Val
                165                 170                 175

Asn Gly Ile His Gly Phe Phe Pro Thr Asn Phe Val Gln Ile Ile Lys
            180                 185                 190

Pro Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Cys Lys Ala Leu Tyr Asp Phe Glu
        195                 200                 205

Val Lys Asp Lys Glu Ala Asp Lys Asp Cys Leu Pro Phe Ala Lys Asp
    210                 215                 220

Asp Val Leu Thr Val Ile Arg Arg Val Asp Glu Asn Trp Ala Glu Gly
225                 230                 235                 240

Met Leu Ala Asp Lys Ile Gly Ile Phe Pro Ile Ser Tyr Val Glu Phe
                245                 250                 255

Asn Ser Ala Ala Lys Gln Leu Ile Glu Trp Asp Lys Pro Pro Val Pro
            260                 265                 270

Gly Val Asp Ala Gly Glu Cys Ser Ser Ala Ala Ala Gln Ser Ser Thr
        275                 280                 285

Ala Pro Lys His Ser Asp Thr Lys Lys Asn Thr Lys Lys Arg His Ser
    290                 295                 300

Phe Thr Ser Leu Thr Met Ala Asn Lys Ser Ser Gln Ala Ser Gln Asn
305                 310                 315                 320
```

```
Arg His Ser Met Glu Ile Ser Pro Pro Val Leu Ile Ser Ser Ser Asn
                325                 330                 335

Pro Thr Ala Ala Ala Arg Ile Ser Glu Leu Ser Gly Leu Ser Cys Ser
            340                 345                 350

Ala Pro Ser Gln Val His Ile Ser Thr Thr Gly Leu Ile Val Thr Pro
        355                 360                 365

Pro Pro Ser Ser Pro Val Thr Thr Gly Pro Ser Phe Thr Phe Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Val Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Gly Thr Leu Asn Pro Pro Leu Pro
385                 390                 395                 400

Pro Pro Pro Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Ala Ser Thr Pro Pro Gly
                405                 410                 415

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Met Gly Pro Arg Pro Met Ala
            420                 425                 430

Gly Ser Thr Asp Gln Ile Ala His Leu Arg Pro Gln Thr Arg Pro Ser
        435                 440                 445

Val Tyr Val Ala Ile Tyr Pro Tyr Thr Pro Arg Lys Glu Asp Glu Leu
    450                 455                 460

Glu Leu Arg Lys Gly Glu Met Phe Leu Val Phe Glu Arg Cys Gln Asp
465                 470                 475                 480

Gly Trp Phe Lys Gly Thr Ser Met His Thr Ser Lys Ile Gly Val Phe
                485                 490                 495

Pro Gly Asn Tyr Val Ala Pro Val Thr Arg Ala Val Thr Asn Ala Ser
            500                 505                 510

Gln Ala Lys Val Pro Met Ser Thr Ala Gly Gln Thr Ser Arg Gly Val
        515                 520                 525

Thr Met Val Ser Pro Ser Thr Ala Gly Gly Pro Ala Gln Lys Leu Gln
    530                 535                 540

Gly Asn Gly Val Ala Gly Ser Pro Ser Val Val Pro Ala Ala Val Val
545                 550                 555                 560

Ser Ala Ala His Ile Gln Thr Ser Pro Gln Ala Lys Val Leu Leu His
                565                 570                 575

Met Thr Gly Gln Met Thr Val Asn Gln Ala Arg Asn Ala Val Arg Thr
            580                 585                 590
```

Val Ala Ala His Asn Gln Glu Arg Pro Thr Ala Ala Val Thr Pro Ile
595 600 605

Gln Val Gln Asn Ala Ala Gly Leu Ser Pro Ala Ser Val Gly Leu Ser
610 615 620

His His Ser Leu Ala Ser Pro Gln Pro Ala Pro Leu Met Pro Gly Ser
625 630 635 640

Ala Thr His Thr Ala Ala Ile Ser Ile Ser Arg Ala Ser Ala Pro Leu
645 650 655

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Pro Leu Thr Ser Pro Ser Ile Thr Ser Ala
660 665 670

Ser Leu Glu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ile Val Thr Val Leu Pro Gly
675 680 685

Leu Pro Thr Ser Pro Asp Ser Ala Ser Ser Ala Cys Gly Asn Ser Ser
690 695 700

Ala Thr Lys Pro Asp Lys Asp Ser Lys Lys Glu Lys Lys Gly Leu Leu
705 710 715 720

Lys Leu Leu Ser Gly Ala Ser Thr Lys Arg Lys Pro Arg Val Ser Pro
725 730 735

Pro Ala Ser Pro Thr Leu Glu Val Glu Leu Gly Ser Ala Glu Leu Pro
740 745 750

Leu Gln Gly Ala Val Gly Pro Glu Leu Pro Pro Gly Gly Gly His Gly
755 760 765

Arg Ala Gly Ser Cys Pro Val Asp Gly Asp Gly Pro Val Thr Thr Ala
770 775 780

Val Ala Gly Ala Ala Leu Ala Gln Asp Ala Phe His Arg Lys Ala Ser
785 790 795 800

Ser Leu Asp Ser Ala Val Pro Ile Ala Pro Pro Pro Arg Gln Ala Cys
805 810 815

Ser Ser Leu Gly Pro Val Leu Asn Glu Ser Arg Pro Val Val Cys Glu
820 825 830

Arg His Arg Val Val Val Ser Tyr Pro Pro Gln Ser Glu Ala Glu Leu
835 840 845

Glu Leu Lys Glu Gly Asp Ile Val Phe Val His Lys Lys Arg Glu Asp
850 855 860

Gly Trp Phe Lys Gly Thr Leu Gln Arg Asn Gly Lys Thr Gly Leu Phe
865 870 875 880

Pro Gly Ser Phe Val Glu Asn Ile
885

<210> 3
<211> 5128
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ctgagagaca ctgcgagcgg cgagcgcggt ggggccgcat ctgcatcagc cgccgcagcc 60
gctgcggggc cgcgaacaaa gaggaggagc cgaggcgcga gagcaaagtc tgaaatggat 120
gttacatgag tcattttaag ggatgcacac aactatgaac atttctgaag atttttctc 180
agtaaagtag ataaagatgg atgaatcagc cttgttggat cttttggagt gtccggtgtg 240
tctagagcgc cttgatgctt ctgcgaaggt cttgccttgc cagcatacgt tttgcaagcg 300
atgtttgctg gggatcgtag gttctcgaaa tgaacttaga tgtcccgagt gcaggactct 360
tgttggctcg ggtgtcgagg agcttcccag taacatcttg ctggtcagac ttctggatgg 420
catcaaacag aggccttgga aacctggtcc tggtggggga agtgggacca actgcacaaa 480
tgcattaagg tctcagagca gcactgtggc taattgtagc tcaaaagatc tgcagagctc 540
ccagggcgga cagcagcctc gggtgcaatc ctggagcccc ccagtgaggg gtatacctca 600
gttaccatgt gccaaagcgt tatacaacta tgaaggaaaa gagcctggag accttaaatt 660
cagcaaaggc gacatcatca ttttgcgaag acaagtggat gaaaattggt accatgggga 720
agtcaatgga atccatggct ttttccccac caactttgtg cagattatta aaccgttacc 780
tcagccccca cctcagtgca aagcacttta tgactttgaa gtgaaagaca aggaagcaga 840
caaagattgc cttccatttg caaaggatga tgttctgact gtgatccgaa gagtggatga 900
aaactgggct gaaggaatgc tggcagacaa aataggaata tttccaattt catatgttga 960
gtttaactcg gctgctaagc agctgataga atgggataag cctcctgtgc caggagttga 1020
tgctggagaa tgttcctcgg cagcagccca gagcagcact gccccaaagc actccgacac 1080
caagaagaac accaaaaagc ggcactcctt cacttccctc actatggcca acaagtcctc 1140
ccaggcatcc cagaaccgcc actccatgga gatcagcccc cctgtcctca tcagctccag 1200
caaccccact gctgctgcac ggatcagcga gctgtctggg ctctcctgca gtgccccttc 1260
tcaggttcat ataagtacca ccgggttaat tgtgaccccg cccccaagca gcccagtgac 1320
aactggcccc tcgtttactt tcccatcaga tgttccctac caagctgccc ttggaacttt 1380
gaatcctcct cttccaccac cccctctcct ggctgccact gtccttgcct ccacaccacc 1440
aggcgccacc gccgccgctg ctgctgctgg aatgggaccg aggcccatgg caggatccac 1500
tgaccagatt gcacatttac ggccgcagac tcgccccagt gtgtatgttg ctatatatcc 1560
atacactcct cggaaagagg atgaactaga gctgagaaaa ggggagatgt ttttagtgtt 1620

tgagcgctgc caggatggct ggttcaaagg gacatccatg cataccagca agataggggt 1680
tttccctggc aattatgtgg caccagtcac aagggcggtg acaaatgctt cccaagctaa 1740
agtccctatg tctacagctg gccagacaag tcggggagtg accatggtca gtccttccac 1800
ggcaggaggg cctgcccaga agctccaggg aaatggcgtg gctgggagtc ccagtgttgt 1860
ccccgcagct gtggtatcag cagctcacat ccagacaagt cctcaggcta aggtcttgtt 1920
gcacatgacg gggcaaatga cagtcaacca ggcccgcaat gctgtgagga cagttgcagc 1980
gcacaaccag gaacgcccca cggcagcagt gacacccatc caggtacaga atgccgccgg 2040
cctcagccct gcatctgtgg gcctgtccca tcactcgctg gcctccccac aacctgcgcc 2100
tctgatgcca ggctcagcca cgcacactgc tgccatcagt atcagtcgag ccagtgcccc 2160
tctggcctgt gcagcagctg ctccactgac ttccccaagc atcaccagtg cttctctgga 2220
ggctgagccc agtggccgga tagtgaccgt tctccctgga ctccccacat ctcctgacag 2280
tgcttcatca gcttgtggga acagttcagc aaccaaacca gacaaggata gcaaaaaaga 2340
aaaaaagggt ttgttgaagt tgctttctgg cgcctccact aaacggaagc cccgcgtgtc 2400
tcctccagca tcgcccaccc tagaagtgga gctgggcagt gcagagcttc ctctccaggg 2460
agcggtgggg cccgaactgc caccaggagg tggccatggc agggcaggct cctgccctgt 2520
ggacggggac ggaccggtca cgactgcagt ggcaggagca gccctggccc aggatgcttt 2580
tcataggaag gcaagttccc tggactccgc agttcccatc gctccacctc ctcgccaggc 2640
ctgttcctcc ctgggtcctg tcttgaatga gtctagacct gtcgtttgtg aaaggcacag 2700
ggtggtggtt tcctatcctc ctcagagtga ggcagaactt gaacttaaag aaggagatat 2760
tgtgtttgtt cataaaaaac gagaggatgg ctggttcaaa ggcacattac aacgtaatgg 2820
gaaaactggc cttttcccag gaagctttgt ggaaaacata tgaggagact gacactgaag 2880
aagcttaaaa tcacttcaca caacaaagta gcacaaagca gtttaacaga aagagcacat 2940
ttgtggactt ccagatggtc aggagatgag caaaggattg gtatgtgact ctgatgcccc 3000
agcacagtta ccccagcgag cagagtgaag aagatgtttg tgtgggtttt gttagtctgg 3060
attcggatgt ataaggtgtg ccttgtactg tctgatttac tacacagaga aacttttttt 3120
ttttttaaag atatatgact aaaatggaca attgtttaca aggcttaact aatttatttg 3180
ctttttaaa cttgaacttt tcgtataata gatacgttct ttggattatg attttaagaa 3240
attattaatt tatgaaatga taggtaagga gaagctggat tatctcctgt tgagagcaag 3300
agattcgttt tgacatagag tgaatgcatt ttcccctctc ctcctccctg ctaccattat 3360
attttggggt tatgttttgc ttctttaaga tagaaatccc agttctctaa tttggttttc 3420
ttctttggga aaccaaacat acaaatgaat cagtatcaat tagggcctgg ggtagagaga 3480
cagaaacttg agagaagaga agttagtgat tccctctctt tctagtttgg taggaatcac 3540
cctgaagacc tagtcctcaa tttaattgtg tgggttttta attttcctag aatgaagtga 3600
ctgaaacaat gagaaagaat acagcacaac ccttgaacaa aatgtattta gaaatatatt 3660

tagttttata gcagaagcag ctcaattgtt tggttggaaa gtaggggaaa ttgaagttgt 3720
agtcactgtc tgagaatggc tatgaagcgt catttcacat tttaccccaa ctgacctgca 3780
tgcccaggac acaagtaaaa catttgtgag atagtggtgg taagtgatgc actcgtgtta 3840
agtcaaaggc tataagaaac actgtgaaaa gttcatattc atccattgtg attctttccc 3900
cacgtcttgc atgtattact ggattcccac agtaatatag actgtgcatg gtgtgtatat 3960
ttcattgcga tttcctgtta agatgagttt gtactcagaa ttgaccaatt caggaggtgt 4020
aaaaataaac agtgttctct tctctacccc aaagccacta ctgaccaagg tctcttcagt 4080
gcactcgctc cctctctggc taaggcatgc attagccact acacaagtca ttagtgaaag 4140
tggtctttta tgtcctccca gcagacagac atcaaggatg agttaaccag gagactactc 4200
ctgtgactgt ggagctctgg aaggcttggt gggagtgaat ttgcccacac cttacaattg 4260
tggcaggatc cagaagagcc tgtcttttta tatccattcc ttgatgtcat tggcctctcc 4320
caccgatttc attacggtgc cacgcagtca tggatctggg tagtccggaa aacaaaagga 4380
gggaagacag cctggtaatg aataagatcc ttaccacagt tttctcatgg gaaatacata 4440
ataaaccctt tcatcttttt ttttttcctt taagaattaa aactgggaaa tagaaacatg 4500
aactgaaaag tcttgcaatg acaagaggtt tcatggtctt aaaaagatac tttatatggt 4560
tgaagatgaa atcattccta aattaacctt ttttttaaaa aaaaacaatg tatattatgt 4620
tcctgtgtgt tgaatttaaa aaaaaaaaat actttacttg gatattcatg taatatataa 4680
aggtttggtg aaatgaactt tagttaggaa aaagctggca tcagctttca tctgtgtaag 4740
ttgacaccaa tgtgtcataa tattctttat tttgggaaat tagtgtattt tataaaaatt 4800
ttaaaaagaa aaaagactac tacaggttaa gataattttt ttacctgtct tttctccata 4860
ttttaagcta tgtgattgaa gtacctctgt tcatagtttc ctggtataaa gttggttaaa 4920
atttcatctg ttaatagatc attaggtaat ataatgtatg ggttttctat tggtttttg 4980
cagacagtag agggagattt tgtaacaagg gcttgttaca cagtgatatg gtaatgataa 5040
aattgcaatt tatcactcct tttcatgtta ataatttgag gactggataa aaggtttcaa 5100
gattaaaatt tgatgttcaa acctttgt 5128

<210> 4
<211> 2331
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4

ctgagagaca ctgcgagcgg cgagcgcggt ggggccgcat ctgcatcagc cgccgcagcc 60
gctgcggggc cgcgaacaaa gaggaggagc cgaggcgcga gagcaaagtc tgaaatggat 120
gttacatgag tcattttaag gatgcacaca actatgaaca tttctgaaga ttttttctca 180
gtaaagtaga taaagatgga tgaatcagcc ttgttggatc ttttggagtg tccggtgtgt 240
ctagagcgcc ttgatgcttc tgcgaaggtc ttgccttgcc agcatacgtt ttgcaagcga 300

tgtttgctgg ggatcgtagg ttctcgaaat gaactcagat gtcccgagtg caggactctt 360
gttggctcgg gtgtcgagga gcttcccagt aacatcttgc tggtcagact tctggatggc 420
atcaaacaga ggccttggaa acctggtcct ggtgggggaa gtgggaccaa ctgcacaaat 480
gcattaaggt ctcagagcag cactgtggct aattgtagct caaaagatct gcagagctcc 540
cagggcggac agcagcctcg ggtgcaatcc tggagccccc cagtgagggg tatacctcag 600
ttaccatgtg ccaaagcgtt atacaactat gaaggaaaag agcctggaga ccttaaattc 660
agcaaaggcg acatcatcat tttgcgaaga caagtggatg aaaattggta ccatggggaa 720
gtccaatggaa tccatggctt tttccccacc aactttgtgc agattattaa accgttacct 780
cagcccccac ctcagtgcaa agcactttat gactttgaag tgaaagacaa ggaagcagac 840
aaagattgcc ttccatttgc aaaggatgat gttctgactg tgatccgaag agtggatgaa 900
aactgggctg aaggaatgct ggcagacaaa ataggaatat ttccaatttc atatgttgag 960
tttaactcgg ctgctaagca gctgatagaa tgggataagc ctcctgtgcc aggagttgat 1020
gctggagaat gttcctcggc agcagcccag agcagcactg ccccaaagca ctccgacacc 1080
aagaagaaca ccaaaaagcg gcactccttc acttccctca ctatggccaa caagtcctcc 1140
caggcatccc agaaccgcca ctccatggag atcagccccc ctgtcctcat cagctccagc 1200
aaccccactg ctgctgcacg gatcagcgag ctgtctgggc tctcctgcag tgcccccttct 1260
caggttcata taagtaccac cgggttaatt gtgaccccgc ccccaagcag cccagtgaca 1320
actggccccct cgtttacttt cccatcagat gttccctacc aagctgcccct tggaactttg 1380
aatcctcctc ttccaccacc ccctctcctg gctgccactg tccttgcctc cacaccacca 1440
ggcgccaccg ccgccgctgc tgctgctgga atgggaccga ggcccatggc aggatccact 1500
gaccagattg cacatttacg gccgcagact cgccccagtg tgtatgttgc tatatatcca 1560
tacactcctc ggaaagagga tgaactagag ctgagaaaag gggagatgtt tttagtgttt 1620
gagcgctgcc aggatggctg gttcaaaggg acatccatgc ataccagcaa gataggggtt 1680
ttccctggca attatgtggc accagtcaca agggcggtga caaatgcttc ccaagctaaa 1740
gtccctatgt ctacagctgg ccagacaagt cggggagtga ccatggtcag tccttccacg 1800
gcaggagggc ctgcccagaa gctccaggga aatggcgtgg ctgggagtcc cagtgttgtc 1860
cccgcagctg tggtatcagc agctcacatc cagacaagtc ctcaggctaa ggtcttgttg 1920
cacatgacgg ggcaaatgac agtcaaccag gcccgcaatg ctgtgaggac agttgcagcg 1980
cacaaccagg aacgccccac ggcagcagtg acacccatcc aggtacagaa tgccgccggc 2040
ctcagccctg catctgtggg cctgtcccat cactcgctgg cctccccaca acctgcgcct 2100
ctgatgccag gctcagccac gcacactgct gccatcagta tcagtcgagc cagtgccccct 2160
ctggcctgtg cagcagctgc tccactgact tccccaagca tcaccagtgc ttctctggag 2220
gctgagccca gtggccggat agtgaccgtt ctccctggac tccccacatc tcctgacagt 2280
gcttcatcag cttgtgggaa cagttcagca accaaaccag acaaggatag c 2331

<210> 5
<211> 712
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Met Asp Glu Ser Ala Leu Leu Asp Leu Leu Glu Cys Pro Val Cys Leu
1               5                  10                  15

Glu Arg Leu Asp Ala Ser Ala Lys Val Leu Pro Cys Gln His Thr Phe
            20                  25                  30

Cys Lys Arg Cys Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Arg Asn Glu Leu Arg
        35                  40                  45

Cys Pro Glu Cys Arg Thr Leu Val Gly Ser Gly Val Glu Glu Leu Pro
    50                  55                  60

Ser Asn Ile Leu Leu Val Arg Leu Leu Asp Gly Ile Lys Gln Arg Pro
65                  70                  75                  80

Trp Lys Pro Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asn Cys Thr Asn Ala
                85                  90                  95

Leu Arg Ser Gln Ser Ser Thr Val Ala Asn Cys Ser Ser Lys Asp Leu
            100                 105                 110

Gln Ser Ser Gln Gly Gly Gln Gln Pro Arg Val Gln Ser Trp Ser Pro
        115                 120                 125

Pro Val Arg Gly Ile Pro Gln Leu Pro Cys Ala Lys Ala Leu Tyr Asn
    130                 135                 140

Tyr Glu Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Lys Phe Ser Lys Gly Asp Ile
145                 150                 155                 160

Ile Ile Leu Arg Arg Gln Val Asp Glu Asn Trp Tyr His Gly Glu Val
                165                 170                 175

Asn Gly Ile His Gly Phe Phe Pro Thr Asn Phe Val Gln Ile Ile Lys
            180                 185                 190

Pro Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Cys Lys Ala Leu Tyr Asp Phe Glu
        195                 200                 205

Val Lys Asp Lys Glu Ala Asp Lys Asp Cys Leu Pro Phe Ala Lys Asp
    210                 215                 220

Asp Val Leu Thr Val Ile Arg Arg Val Asp Glu Asn Trp Ala Glu Gly
225                 230                 235                 240
```

Met Leu Ala Asp Lys Ile Gly Ile Phe Pro Ile Ser Tyr Val Glu Phe
245 250 255

Asn Ser Ala Ala Lys Gln Leu Ile Glu Trp Asp Lys Pro Pro Val Pro
260 265 270

Gly Val Asp Ala Gly Glu Cys Ser Ser Ala Ala Ala Gln Ser Ser Thr
275 280 285

Ala Pro Lys His Ser Asp Thr Lys Lys Asn Thr Lys Lys Arg His Ser
290 295 300

Phe Thr Ser Leu Thr Met Ala Asn Lys Ser Ser Gln Ala Ser Gln Asn
305 310 315 320

Arg His Ser Met Glu Ile Ser Pro Pro Val Leu Ile Ser Ser Ser Asn
325 330 335

Pro Thr Ala Ala Ala Arg Ile Ser Glu Leu Ser Gly Leu Ser Cys Ser
340 345 350

Ala Pro Ser Gln Val His Ile Ser Thr Thr Gly Leu Ile Val Thr Pro
355 360 365

Pro Pro Ser Ser Pro Val Thr Thr Gly Pro Ser Phe Thr Phe Pro Ser
370 375 380

Asp Val Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Gly Thr Leu Asn Pro Pro Leu Pro
385 390 395 400

Pro Pro Pro Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Ala Ser Thr Pro Pro Gly
405 410 415

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Met Gly Pro Arg Pro Met Ala
420 425 430

Gly Ser Thr Asp Gln Ile Ala His Leu Arg Pro Gln Thr Arg Pro Ser
435 440 445

Val Tyr Val Ala Ile Tyr Pro Tyr Thr Pro Arg Lys Glu Asp Glu Leu
450 455 460

Glu Leu Arg Lys Gly Glu Met Phe Leu Val Phe Glu Arg Cys Gln Asp
465 470 475 480

Gly Trp Phe Lys Gly Thr Ser Met His Thr Ser Lys Ile Gly Val Phe
485 490 495

Pro Gly Asn Tyr Val Ala Pro Val Thr Arg Ala Val Thr Asn Ala Ser
500 505 510

Gln Ala Lys Val Pro Met Ser Thr Ala Gly Gln Thr Ser Arg Gly Val
515 520 525

Thr Met Val Ser Pro Ser Thr Ala Gly Gly Pro Ala Gln Lys Leu Gln
530 535 540

Gly Asn Gly Val Ala Gly Ser Pro Ser Val Val Pro Ala Ala Val Val
545 550 555 560

Ser Ala Ala His Ile Gln Thr Ser Pro Gln Ala Lys Val Leu Leu His
565 570 575

Met Thr Gly Gln Met Thr Val Asn Gln Ala Arg Asn Ala Val Arg Thr
580 585 590

Val Ala Ala His Asn Gln Glu Arg Pro Thr Ala Ala Val Thr Pro Ile
595 600 605

Gln Val Gln Asn Ala Ala Gly Leu Ser Pro Ala Ser Val Gly Leu Ser
610 615 620

His His Ser Leu Ala Ser Pro Gln Pro Ala Pro Leu Met Pro Gly Ser
625 630 635 640

Ala Thr His Thr Ala Ala Ile Ser Ile Ser Arg Ala Ser Ala Pro Leu
645 650 655

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Pro Leu Thr Ser Pro Ser Ile Thr Ser Ala
660 665 670

Ser Leu Glu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ile Val Thr Val Leu Pro Gly
675 680 685

Leu Pro Thr Ser Pro Asp Ser Ala Ser Ser Ala Cys Gly Asn Ser Ser
690 695 700

Ala Thr Lys Pro Asp Lys Asp Ser
705 710

<210> 6
<211> 4182
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6

atttcatatg ttgagtttaa ctcggctgct aagcagctga tagaatggga taagcctcct 60

gtgccaggag ttgatgctgg agaatgttcc tcggcagcag cccagagcag cactgcccca 120

aagcactccg acaccaagaa gaacaccaaa aagcggcact ccttcacttc cctcactatg 180

gccaacaagt cctcccaggc atcccagaac cgccactcca tggagatcag ccccccctgtc 240

ctcatcagct ccagcaaccc cactgctgct gcacggatca gcgagctgtc tgggctctcc 300

tgcagtgccc cttctcaggt tcatataagt accaccgggt taattgtgac cccgccccca 360
agcagcccag tgacaactgg cccctcgttt actttcccat cagatgttcc ctaccaagct 420
gcccttggaa ctttgaatcc tcctcttcca ccacccccтc tcctggctgc cactgtcctt 480
gcctccacac caccaggcgc caccgccgct gctgctgctg ctggaatggg accgaggccc 540
atggcaggat ccactgacca gattgcacat ttacggccgc agactcgccc cagtgtgtat 600
gttgctatat atccatacac tcctcggaaa gaggatgaac tagagctgag aaaaggggag 660
atgtttttag tgtttgagcg ctgccaggat ggctggttca aagggacatc catgcatacc 720
agcaagatag gggttttccc tggcaattat gtggcaccag tcatcaaggg ggtgacaaat 780
gcttcccaag ctaaagtccc tatgtctaca gctggccaga caagtcgggg agtgaccatg 840
gtcagtcctt ccacggcagg agggcctgcc cagaagctcc agggaaatgg cgtggctggg 900
agtcccagtg ttgtccccgc agctgtggta tcagcagctc acatccagac aagtcctcag 960
gctaaggtct tgttgcacat gacggggcaa atgacagtca accaggcccg caatgctgtg 1020
aggacagttg cagcgcacaa ccaggaacgc cccacggcag cagtgacacc catccaggta 1080
cagaatgccg ccggcctcag ccctgcatct gtgggcctgt cccatcactc gctggcctcc 1140
ccacaacctg cgcctctgat gccaggctca gccacgcaca ctgctgccat cagtatcagt 1200
cgagccagtg cccctctggc ctgtgcagca gctgctccac tgacttcccc aagcatcacc 1260
agtgcttctc tggaggctga gcccagtggc cggatagtga ccgttctccc tggactcccc 1320
acatctcctg acagtgcttc atcagcttgt gggaacagtt cagcaaccaa accagacaag 1380
gatagcaaaa aagaaaaaaa gggtttgttg aagttgcttt ctggcgcctc cactaaacgg 1440
aagccccgcg tgtctcctcc agcatcgccc accctagaag tggagctggg cagtgcagag 1500
cttcctctcc agggagcggt ggggcccgaa ctgccaccag gaggtggcca tggcagggca 1560
ggctcctgcc ctgtggacgg ggacggaccg gtcacgactg cagtggcagg agcagccctg 1620
gcccaggatg cttttcatag gaaggcaagt tccctggact ccgcagttcc catcgctcca 1680
cctcctcgcc aggcctgttc ctccctgggt cctgtcttga atgagtctag acctgtcgtt 1740
tgtgaaaggc acagggtggt ggtttcctat cctcctcaga gtgaggcaga acttgaactt 1800
aaagaaggag atattgtgtt tgttcataaa aaacgagagg atggctggtt caaaggcaca 1860
ttacaacgta atgggaaaac tggccttttc ccaggaagct ttgtggaaaa catatgagga 1920
gactgacact gaagaagctt aaaatcactt cacacaacaa agtagcacaa agcagtttaa 1980
cagaaagagc acatttgtgg acttccagat ggtcaggaga tgagcaaagg attggtatgt 2040
gactctgatg ccccagcaca gttaccccag cgagcagagt gaagaagatg tttgtgtggg 2100
ttttgttagt ctggattcgg atgtataagg tgtgccttgt actgtctgat ttactacaca 2160
gagaaacttt ttttttttтt taagatatat gactaaaatg gacaattgtt tacaaggctt 2220
aactaattta tttgcttttt taaacttgaa cttttcgtat aatagatacg ttctttggat 2280
tatgatttta agaaattatt aatttatgaa atgataggta aggagaagct ggattatctc 2340

ctgttgagag caagagattc gttttgacat agagtgaatg cattttcccc tctcctcctc 2400
cctgctacca ttatattttg gggttatgtt ttgcttcttt aagatagaaa tcccagttct 2460
ctaatttggt tttcttcttt gggaaaccaa acatacaaat gaatcagtat caattagggc 2520
ctggggtaga gagacagaaa cttgagagaa gagaagttag tgattccctc tctttctagt 2580
ttggtaggaa tcaccctgaa gacctagtcc tcaatttaat tgtgtgggtt tttaattttc 2640
ctagaatgaa gtgactgaaa caatgagaaa gaatacagca caacccttga acaaaatgta 2700
tttagaaata tatttagttt tatagcagaa gcagctcaat tgtttggttg gaaagtaggg 2760
gaaattgaag ttgtagtcac tgtctgagaa tggctatgaa gcgtcatttc acattttacc 2820
ccaactgacc tgcatgccca ggacacaagt aaaacatttg tgagatagtg gtggtaagtg 2880
atgcactcgt gttaagtcaa aggctataag aaacactgtg aaaagttcat attcatccat 2940
tgtgattctt tccccacgtc ttgcatgtat tactggattc ccacagtaat atagactgtg 3000
catggtgtgt atatttcatt gcgatttcct gttaagatga gtttgtactc agaattgacc 3060
aattcaggag gtgtaaaaat aaacagtgtt ctcttctcta ccccaaagcc actactgacc 3120
aaggtctctt cagtgcactc gctccctctc tggctaaggc atgcattagc cactacacaa 3180
gtcattagtg aaagtggtct tttatgtcct cccagcagac agacatcaag gatgagttaa 3240
ccaggagact actcctgtga ctgtggagct ctggaaggct tggtgggagt gaatttgccc 3300
acaccttaca attgtggcag gatccagaag agcctgtctt tttatatcca ttccttgatg 3360
tcattggcct ctcccaccga tttcattacg gtgccacgca gtcatggatc tgggtagtcc 3420
ggaaaacaaa aggagggaag acagcctggt aatgaataag atccttacca cagttttctc 3480
atgggaaata cataataaac cctttcatct ttttttttt cctttaagaa ttaaaactgg 3540
gaaatagaaa catgaactga aaagtcttgc aatgacaaga ggtttcatgg tcttaaaaag 3600
atactttata tggttgaaga tgaaatcatt cctaaattaa cctttttttt aaaaaaaaac 3660
aatgtatatt atgttcctgt gtgttgaatt taaaaaaaaa aaatacttta cttggatatt 3720
catgtaatat ataaaggttt ggtgaaatga actttagtta ggaaaaagct ggcatcagct 3780
ttcatctgtg taagttgaca ccaatgtgtc ataatattct ttatttttggg aaattagtgt 3840
attttataaa aattttaaaa agaaaaaaga ctactacagg ttaagataat ttttttacct 3900
gtctttttctc catattttaa gctatgtgat tgaagtacct ctgttcatag tttcctggta 3960
taaagttggt taaaatttca tctgttaata gatcattagg taatataatg tatgggtttt 4020
ctattggttt tttgcagaca gtagagggag attttgtaac aagggcttgt tacacagtga 4080
tatggtaatg ataaaattgc aatttatcac tccttttcat gttaataatt tgaggactgg 4140
ataaaaggtt tcaagattaa aatttgatgt tcaaaccttt gt 4182

<210> 7
<211> 638
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 7

```
Ile Ser Tyr Val Glu Phe Asn Ser Ala Ala Lys Gln Leu Ile Glu Trp
1               5                  10                  15

Asp Lys Pro Pro Val Pro Gly Val Asp Ala Gly Glu Cys Ser Ser Ala
            20                  25                  30

Ala Ala Gln Ser Ser Thr Ala Pro Lys His Ser Asp Thr Lys Lys Asn
        35                  40                  45

Thr Lys Lys Arg His Ser Phe Thr Ser Leu Thr Met Ala Asn Lys Ser
    50                  55                  60

Ser Gln Ala Ser Gln Asn Arg His Ser Met Glu Ile Ser Pro Pro Val
65                  70                  75                  80

Leu Ile Ser Ser Ser Asn Pro Thr Ala Ala Ala Arg Ile Ser Glu Leu
                85                  90                  95

Ser Gly Leu Ser Cys Ser Ala Pro Ser Gln Val His Ile Ser Thr Thr
            100                 105                 110

Gly Leu Ile Val Thr Pro Pro Pro Ser Ser Pro Val Thr Thr Gly Pro
        115                 120                 125

Ser Phe Thr Phe Pro Ser Asp Val Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Gly Thr
    130                 135                 140

Leu Asn Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu
145                 150                 155                 160

Ala Ser Thr Pro Pro Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Met
                165                 170                 175

Gly Pro Arg Pro Met Ala Gly Ser Thr Asp Gln Ile Ala His Leu Arg
            180                 185                 190

Pro Gln Thr Arg Pro Ser Val Tyr Val Ala Ile Tyr Pro Tyr Thr Pro
        195                 200                 205

Arg Lys Glu Asp Glu Leu Glu Leu Arg Lys Gly Glu Met Phe Leu Val
    210                 215                 220

Phe Glu Arg Cys Gln Asp Gly Trp Phe Lys Gly Thr Ser Met His Thr
225                 230                 235                 240

Ser Lys Ile Gly Val Phe Pro Gly Asn Tyr Val Ala Pro Val Thr Arg
                245                 250                 255

Ala Val Thr Asn Ala Ser Gln Ala Lys Val Pro Met Ser Thr Ala Gly
            260                 265                 270
```

Gln Thr Ser Arg Gly Val Thr Met Val Ser Pro Ser Thr Ala Gly Gly
275 280 285

Pro Ala Gln Lys Leu Gln Gly Asn Gly Val Ala Gly Ser Pro Ser Val
290 295 300

Val Pro Ala Ala Val Val Ser Ala Ala His Ile Gln Thr Ser Pro Gln
305 310 315 320

Ala Lys Val Leu Leu His Met Thr Gly Gln Met Thr Val Asn Gln Ala
325 330 335

Arg Asn Ala Val Arg Thr Val Ala Ala His Asn Gln Glu Arg Pro Thr
340 345 350

Ala Ala Val Thr Pro Ile Gln Val Gln Asn Ala Ala Gly Leu Ser Pro
355 360 365

Ala Ser Val Gly Leu Ser His His Ser Leu Ala Ser Pro Gln Pro Ala
370 375 380

Pro Leu Met Pro Gly Ser Ala Thr His Thr Ala Ala Ile Ser Ile Ser
385 390 395 400

Arg Ala Ser Ala Pro Leu Ala Cys Ala Ala Ala Ala Pro Leu Thr Ser
405 410 415

Pro Ser Ile Thr Ser Ala Ser Leu Glu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ile
420 425 430

Val Thr Val Leu Pro Gly Leu Pro Thr Ser Pro Asp Ser Ala Ser Ser
435 440 445

Ala Cys Gly Asn Ser Ser Ala Thr Lys Pro Asp Lys Asp Ser Lys Lys
450 455 460

Glu Lys Lys Gly Leu Leu Lys Leu Leu Ser Gly Ala Ser Thr Lys Arg
465 470 475 480

Lys Pro Arg Val Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Glu Val Glu Leu
485 490 495

Gly Ser Ala Glu Leu Pro Leu Gln Gly Ala Val Gly Pro Glu Leu Pro
500 505 510

Pro Gly Gly Gly His Gly Arg Ala Gly Ser Cys Pro Val Asp Gly Asp
515 520 525

Gly Pro Val Thr Thr Ala Val Ala Gly Ala Ala Leu Ala Gln Asp Ala
530 535 540

```
Phe His Arg Lys Ala Ser Ser Leu Asp Ser Ala Val Pro Ile Ala Pro
545                 550                 555                 560

Pro Pro Arg Gln Ala Cys Ser Ser Leu Gly Pro Val Leu Asn Glu Ser
                565                 570                 575

Arg Pro Val Val Cys Glu Arg His Arg Val Val Val Ser Tyr Pro Pro
            580                 585                 590

Gln Ser Glu Ala Glu Leu Glu Leu Lys Glu Gly Asp Ile Val Phe Val
        595                 600                 605

His Lys Lys Arg Glu Asp Gly Trp Phe Lys Gly Thr Leu Gln Arg Asn
    610                 615                 620

Gly Lys Thr Gly Leu Phe Pro Gly Ser Phe Val Glu Asn Ile
625                 630                 635
```

<210> 8
<211> 3206
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8

```
gggcagcggg ctcggcgggg ctgcatctac cagcgctgcg gggccgcgaa caaaggcgag     60
cagcggaggc gcgagagcaa agtctgaaat ggatgttaca tgaatcactt taagggctgc    120
gcacaactat gaacgttctg aagccgtttt ctcactaaag tcactcaaga tggatgagtc    180
tgccttgttg gaccttctgg agtgccctgt gtgtctagaa cgcctggatg cttccgcaaa    240
ggtcttaccc tgccagcata ccttttgcaa acgctgtttg ctggggattg tgggttcccg    300
gaatgaactc agatgtcccg aatgccggac tcttgttggc tctggggtcg acgagctccc    360
cagtaacatc ctactggtca gacttctgga tggcatcaag cagaggcctt ggaaacccgg    420
ccctggtggg ggcggcggga ccacctgcac aaacacatta agggcgcagg gcagcactgt    480
ggttaattgt ggctcgaaag atctgcagag ctcccagtgt ggacagcagc ctcgggtgca    540
agcctggagc cccccagtga ggggaatacc tcagttaccg tgtgccaaag cattatataa    600
ctacgaagga aaagagcccg gagaccttaa gttcagcaaa ggcgacacca tcattctgcg    660
ccgacaggtg gatgagaatt ggtaccacgg ggaagtcagc ggggtccacg gcttttccc     720
cactaacttc gtgcagatca tcaaaccttt acctcagccc ccgcctcagt gcaaagcact    780
ttacgacttt gaagtgaaag acaaggaagc tgacaaagat tgccttccct tcgcaaagga    840
cgacgtactg accgtgatcc gcagagtgga tgaaaactgg gctgaaggaa tgctggcaga    900
taaaatagga atatttccaa tttcatacgt ggagtttaac tcagctgcca agcagctgat    960
agagtgggat aagcctcccg tgccaggagt ggacacggca gaatgccccc cagcgacggc   1020
gcagagcacc tctgcctcaa agcaccccga caccaagaag aacaccagga agcgacactc   1080
```

cttcacctcc ctcaccatgg ccaacaagtc ttcccagggg tcccagaacc gccactccat 1140
ggagatcagc cctcctgtgc tcatcagttc cagcaacccc acagccgcag cccgcatcag 1200
cgaactgtcc gggctctcct gcagcgcccc gtctcaggtc catataagca ccactgggtt 1260
aattgtgacc ccacccccta gcagcccggt gacaactggc cctgcgttca cgttcccttc 1320
agatgtcccc taccaagctg cccttggaag tatgaatcct ccacttcccc cacccccctct 1380
cctggcggcc accgtactcg cctccacccc gtcaggcgct actgctgctg ttgctgctgc 1440
tgctgccgcc gccgccgctg ctggaatggg acccaggcct gtgatggggt cctctgaaca 1500
gattgcacat ttacggcctc agactggtcc cagtgtatat gttgctatat atccgtacac 1560
tccccggaag gaagacgaac tggagctgag gaaaggggag atgtttttgg tgtttgagcg 1620
ttgccaggac ggctggtaca aagggacatc gatgcatacc agcaagatag gcgttttccc 1680
tggcaactat gtggcgcccg tcacaagggc ggtgacgaat gcctcccaag ctaaagtctc 1740
tatgtctact gcgggtcagg caagtcgcgg ggtgaccatg gtcagccctt ccactgcagg 1800
aggacctaca cagaagcccc aaggaaacgg cgtggccgga aatcccagcg tcgtccccac 1860
ggctgtggtg tcagcagctc atatccagac aagtcctcag gctaaggtcc tgctgcacat 1920
gtctgggcag atgacagtca atcaggcccg caatgctgtg aggacagttg cagcacatag 1980
ccaggaacgc cccacagcag cagtgactcc catccaggtc cagaatgccg cctgccttgg 2040
tcctgcatcc gtgggcctgc cccatcattc tctggcctcc caacctctgc ctccaatggc 2100
gggtcctgct gcccacggtg ctgccgtcag catcagtcga accaatgccc ccatggcctg 2160
cgctgcaggg gcttctctgg cctccccaaa tatgaccagt gccatgttgg agacagagcc 2220
cagtggtcgc acagtgacca tcctccctgg actccccaca tctccagaga gtgctgcatc 2280
agcgtgtggg aacagttcag ctgggaaacc agacaaggac agtaagaaag aaaaaaaggg 2340
cctactgaag ctgctttctg gtgcctccac caaacgcaag ccccgagtct cccctccagc 2400
atcacctacc ctggatgtgg agctgggtgc tggggaggct cccttgcagg gagcagtagg 2460
tcctgagctg ccgctagggg gcagccacgg cagagtgggg tcatgcccca cagatggtga 2520
tggtccagtg gccgctggaa cagcagccct agcccaggat gccttccacc gcaagacaag 2580
ctccctggac tccgcagtgc ccattgctcc accacctcgc caggcctgct cctccctggg 2640
cccagtcatg aatgaggccc ggcctgttgt ttgtgaaagg cacagggtgg tggtttccta 2700
ccctcctcag agtgaggccg aacttgaact caaggaagga gatattgtgt ttgttcataa 2760
gaaacgagag gacggctggt tcaaaggcac gttacagagg aatgggaaga ctggcctttt 2820
cccagggagc tttgtggaaa acatctgaga agacgggaca cggagaaagc ttatcatcac 2880
accacgtgtg actaaagagc acaaagcagt ttcatagaaa gagcacatct gtggacttcc 2940
agatcttcaa gaaccgagca gaagatgggc acctgactcc agagccccgg cctggttacc 3000
ccaggggcag agggaaggag gacacacctg tgtgggttcc gtctctctgg gttctgatgt 3060
gtaaagtgtg ccttgtaatg tctaatggac tttacagata aatgtctttt ttttttaaag 3120

atgtataact aaaatggaca attgtttaca aggcttaact aatttatttg ctttttaaa 3180

acttgaactt tcttgtaata gcaaat 3206

<210> 9
<211> 892
<212> Protein
<213> Mus musculus

<400> 9

Met Asp Glu Ser Ala Leu Leu Asp Leu Leu Glu Cys Pro Val Cys Leu
1 5 10 15

Glu Arg Leu Asp Ala Ser Ala Lys Val Leu Pro Cys Gln His Thr Phe
20 25 30

Cys Lys Arg Cys Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Arg Asn Glu Leu Arg
35 40 45

Cys Pro Glu Cys Arg Thr Leu Val Gly Ser Gly Val Asp Glu Leu Pro
50 55 60

Ser Asn Ile Leu Leu Val Arg Leu Leu Asp Gly Ile Lys Gln Arg Pro
65 70 75 80

Trp Lys Pro Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Asn Thr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Gly Ser Thr Val Val Asn Cys Gly Ser Lys Asp Leu
100 105 110

Gln Ser Ser Gln Cys Gly Gln Gln Pro Arg Val Gln Ala Trp Ser Pro
115 120 125

Pro Val Arg Gly Ile Pro Gln Leu Pro Cys Ala Lys Ala Leu Tyr Asn
130 135 140

Tyr Glu Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Lys Phe Ser Lys Gly Asp Thr
145 150 155 160

Ile Ile Leu Arg Arg Gln Val Asp Glu Asn Trp Tyr His Gly Glu Val
165 170 175

Ser Gly Val His Gly Phe Phe Pro Thr Asn Phe Val Gln Ile Ile Lys
180 185 190

Pro Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Cys Lys Ala Leu Tyr Asp Phe Glu
195 200 205

Val Lys Asp Lys Glu Ala Asp Lys Asp Cys Leu Pro Phe Ala Lys Asp
210 215 220

```
Asp Val Leu Thr Val Ile Arg Arg Val Asp Glu Asn Trp Ala Glu Gly
225                 230                 235                 240

Met Leu Ala Asp Lys Ile Gly Ile Phe Pro Ile Ser Tyr Val Glu Phe
                245                 250                 255

Asn Ser Ala Ala Lys Gln Leu Ile Glu Trp Asp Lys Pro Pro Val Pro
            260                 265                 270

Gly Val Asp Thr Ala Glu Cys Pro Ser Ala Thr Ala Gln Ser Thr Ser
        275                 280                 285

Ala Ser Lys His Pro Asp Thr Lys Lys Asn Thr Arg Lys Arg His Ser
    290                 295                 300

Phe Thr Ser Leu Thr Met Ala Asn Lys Ser Ser Gln Gly Ser Gln Asn
305                 310                 315                 320

Arg His Ser Met Glu Ile Ser Pro Pro Val Leu Ile Ser Ser Ser Asn
                325                 330                 335

Pro Thr Ala Ala Ala Arg Ile Ser Glu Leu Ser Gly Leu Ser Cys Ser
            340                 345                 350

Ala Pro Ser Gln Val His Ile Ser Thr Thr Gly Leu Ile Val Thr Pro
        355                 360                 365

Pro Pro Ser Ser Pro Val Thr Thr Gly Pro Ala Phe Thr Phe Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Val Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Gly Ser Met Asn Pro Pro Leu Pro
385                 390                 395                 400

Pro Pro Pro Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Ala Ser Thr Pro Ser Gly
                405                 410                 415

Ala Thr Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
            420                 425                 430

Met Gly Pro Arg Pro Val Met Gly Ser Ser Glu Gln Ile Ala His Leu
        435                 440                 445

Arg Pro Gln Thr Arg Pro Ser Val Tyr Val Ala Ile Tyr Pro Tyr Thr
    450                 455                 460

Pro Arg Lys Glu Asp Glu Leu Glu Leu Arg Lys Gly Glu Met Phe Leu
465                 470                 475                 480

Val Phe Glu Arg Cys Gln Asp Gly Trp Tyr Lys Gly Thr Ser Met His
                485                 490                 495
```

Thr Ser Lys Ile Gly Val Phe Pro Gly Asn Tyr Val Ala Pro Val Thr
500 505 510

Arg Ala Val Thr Asn Ala Ser Gln Ala Lys Val Ser Met Ser Thr Ala
515 520 525

Gly Gln Ala Ser Arg Gly Val Thr Met Val Ser Pro Ser Thr Ala Gly
530 535 540

Gly Pro Thr Gln Lys Pro Gln Gly Asn Gly Val Ala Gly Asn Pro Ser
545 550 555 560

Val Val Pro Thr Ala Val Val Ser Ala Ala His Ile Gln Thr Ser Pro
565 570 575

Gln Ala Lys Val Leu Leu His Met Ser Gly Gln Met Thr Val Asn Gln
580 585 590

Ala Arg Asn Ala Val Arg Thr Val Ala Ala His Ser Gln Glu Arg Pro
595 600 605

Thr Ala Ala Val Thr Pro Ile Gln Val Gln Asn Ala Ala Cys Leu Gly
610 615 620

Pro Ala Ser Val Gly Leu Pro His His Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu
625 630 635 640

Pro Pro Met Ala Gly Pro Ala Ala His Gly Ala Ala Val Ser Ile Ser
645 650 655

Arg Thr Asn Ala Pro Met Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ser Leu Ala Ser
660 665 670

Pro Asn Met Thr Ser Ala Met Leu Glu Thr Glu Pro Ser Gly Arg Thr
675 680 685

Val Thr Ile Leu Pro Gly Leu Pro Thr Ser Pro Glu Ser Ala Ala Ser
690 695 700

Ala Cys Gly Asn Ser Ser Ala Gly Lys Pro Asp Lys Asp Ser Lys Lys
705 710 715 720

Glu Lys Lys Gly Leu Leu Lys Leu Leu Ser Gly Ala Ser Thr Lys Arg
725 730 735

Lys Pro Arg Val Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Asp Val Glu Leu
740 745 750

Gly Ala Gly Glu Ala Pro Leu Gln Gly Ala Val Gly Pro Glu Leu Pro
755 760 765

Leu Gly Gly Ser His Gly Arg Val Gly Ser Cys Pro Thr Asp Gly Asp
770 775 780

Gly Pro Val Ala Ala Gly Thr Ala Ala Leu Ala Gln Asp Ala Phe His
785 790 795 800

Arg Lys Thr Ser Ser Leu Asp Ser Ala Val Pro Ile Ala Pro Pro Pro
805 810 815

Arg Gln Ala Cys Ser Ser Leu Gly Pro Val Met Asn Glu Ala Arg Pro
820 825 830

Val Val Cys Glu Arg His Arg Val Val Val Ser Tyr Pro Pro Gln Ser
835 840 845

Glu Ala Glu Leu Glu Leu Lys Glu Gly Asp Ile Val Phe Val His Lys
850 855 860

Lys Arg Glu Asp Gly Trp Phe Lys Gly Thr Leu Gln Arg Asn Gly Lys
865 870 875 880

Thr Gly Leu Phe Pro Gly Ser Phe Val Glu Asn Ile
885 890

<210> 10
<211> 3149
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 10

catttgtatc cgcttggcca cgagctttgg ctgcacttgg caaacttaat aaattaaaca 60
ttgaatcctg cctattgcaa cgataatata atctgattta gtgcattaag aacgacaagt 120
agcgattata atagtagatt ttagcatttg agctaaattt atttcccaac cgcgtcttgg 180
gattgcgtat gcgtgagcca gtacctgcat gtgtgtgtgt tttggaatgt ggccctgcac 240
gaaattcaaa tagtgaccat ccttgagatt ttgcatactg gcaagatgga cgagcacacg 300
ttaaacgacc tgttggagtg ctccgtgtgt cttgagcgac tggacaccac atcgaaggtg 360
ctgccatgcc agcacacctt ctgccgcaaa tgcttgcagg acattgtggc cagtcagcac 420
aagttgcgat gcccggagtg ccgcatcctg gtctcttgca aaattgatga gctgcctcca 480
aacgtcttgc tgatgcgaat cttagaaggc atgaaacaaa atgcagcagc tggcaaagga 540
gaagaaaagg gagaggagac tgaaacacag ccggaaaggg ccaaacctca gccgccagcg 600
gaatcagtgg ccccgcctga caaccaacta ctccagctgc agtcacatca gcaatctcat 660
cagccggctc gtcacaagca acgtcgattt ctactccccc acgcctatgc cctctttgac 720
ttcgcctccg gtgaagccac cgatctaaag ttcaagaaag gggatctgat actgatcaag 780
catcgcatcg acaacaactg gtttgtgggt caagcgaatg gtcaggaggg cacatttccc 840
atcaactacg tcaaggtatc ggttccgctg cccatgccgc agtgcattgc catgtatgac 900

tttaagatgg ggcccaacga cgaggaggga tgcctcgaat ttaagaaaag cactgtaata 960
caggtaatgc gccgagttga tcataattgg gcagaaggac gaattggcca gaccatcgga 1020
atctttccaa tagcattcgt tgagctgaat gcagcggcca aaaagctgtt ggacagcggg 1080
ctacacaccc atccattctg ccatccaccg aagcaacagg ggcagcgggc ccttcctccg 1140
gttccagtta ttgatcccac ggtggtcacg gaatccagtt cgggatcctc caattccacg 1200
ccgggcagca gcaattcaag ctccacatcc agctcgaata actgcagtcc gaatcaccaa 1260
atctcactgc cgaatacccc ccaacatgta gtagcttccg gatcggcgtc tgttcgtttc 1320
cgtgacaagg gagcaaagga gaaacgccac tcactaaatg ctttgctggg aggaggagct 1380
ccattaagtc tgctgcagac caaccgccat tcggctgaaa ttcttagcct gccccatgaa 1440
ctaagccgct tggaagtttc cagctcaaca gctctaaaac ccacgtcagc cccacagaca 1500
tcgcgtgtac ttaagaccac tgttcagcag cagatgcaac cgaatttacc ctggggatac 1560
ttagccctgt tcccatacaa accacgccaa acggatgagc tggaattaaa aaagggttgt 1620
gtttacattg tgaccgaacg atgtgtggac ggttggttca agggaaaaaa ctggttggac 1680
atcactggag tgttcccggg caactacctg acgcccctgc gcgcccgcga ccagcagcag 1740
ttaatgcatc aatggaaata tgttccccaa aatgcagacg cccagatggc acaagtacag 1800
cagcatccag ttgcaccaga tgtgcgactc aacaacatgc tgtccatgca accgcctgat 1860
ttgccacctc gtcagcagca ggctaccgcc acgaccacca gttgctctgt gtggtcgaaa 1920
ccagtggagg cgctgttcag cagaaaatcg gagcccaagc ctgaaactgc cacagcttcg 1980
actacgagca gcagttcctc tggagcagtg ggacttatga ggagattaac tcacatgaaa 2040
acacgctcca aatctccggg agcgtccttg cagcaagttc cgaaagaagc tattagcaca 2100
aatgtggaat ttacaacaaa cccatcagct aaattgcatc cagtacatgt aagatccggc 2160
tcgtgcccca gtcagctgca gcacagtcaa ccgctcaatg aaactccagc agccaagaca 2220
gcggcacaac aacagcagtt cctacccaag cagctgcctt ccgcttctac gaacagcgtt 2280
tcgtacggat cgcaacgcgt gaaaggaagc aaggaacgtc ctcacttgat ttgcgcgaga 2340
caatcattag atgcagctac atttcgcagt atgtacaaca atgccgcgtc gccgccgcca 2400
cctactactt ccgtggcccc agctgtctac gccggcggtc agcaacaggt gattcctgga 2460
ggtggagcgc aatcccagtt gcatgccaat atgattattg cacccagcca tcggaagtcg 2520
cacagcctag atgcgagtca tgtgctgagt cccagcagca atatgatcac ggaggcggcc 2580
attaaggcca gcgccaccac taagtctcct tactgcacga gggaaagtcg attccgctgc 2640
attgtgccgt atccaccaaa cagtgacatt gaactagagc tacatttggg cgacattatc 2700
tacgtccagc ggaagcagaa gaacggctgg tataagggca cccatgcccg tacccacaaa 2760
accgggctgt tccccgcctc ctttgttgaa ccggattgtt aggaaagtta tggttcaaac 2820
tagaatttat taagcgaaat tccaaattac ttgtctaaaa ggattcaatc gtcggtctat 2880
tcgggcttcc aaatacgcaa tctcatattt ctcttttcaa aaaagaaacc gttttgtact 2940

cttccaatcg aatgggcagc tcgccgttgt actttttttat acaatgcttg atcaaaatag 3000

gctagccatg taagacttag ggaacagtta cttaagcctt agcgattagt tagctagaga 3060

aataatctaa ccgatccttg tgccctctac aaagttattt gtaatatacg atactcagta 3120

ataaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 3149

<210> 11
<211> 838
<212> Protein
<213> Drosophila melanogaster

<400> 11

Met Asp Glu His Thr Leu Asn Asp Leu Leu Glu Cys Ser Val Cys Leu
1 5 10 15

Glu Arg Leu Asp Thr Thr Ser Lys Val Leu Pro Cys Gln His Thr Phe
20 25 30

Cys Arg Lys Cys Leu Gln Asp Ile Val Ala Ser Gln His Lys Leu Arg
35 40 45

Cys Pro Glu Cys Arg Ile Leu Val Ser Cys Lys Ile Asp Glu Leu Pro
50 55 60

Pro Asn Val Leu Leu Met Arg Ile Leu Glu Gly Met Lys Gln Asn Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Lys Gly Glu Glu Lys Gly Glu Glu Thr Glu Thr Gln Pro
85 90 95

Glu Arg Ala Lys Pro Gln Pro Pro Ala Glu Ser Val Ala Pro Pro Asp
100 105 110

Asn Gln Leu Leu Gln Leu Gln Ser His Gln Gln Ser His Gln Pro Ala
115 120 125

Arg His Lys Gln Arg Arg Phe Leu Leu Pro His Ala Tyr Ala Leu Phe
130 135 140

Asp Phe Ala Ser Gly Glu Ala Thr Asp Leu Lys Phe Lys Lys Gly Asp
145 150 155 160

Leu Ile Leu Ile Lys His Arg Ile Asp Asn Asn Trp Phe Val Gly Gln
165 170 175

Ala Asn Gly Gln Glu Gly Thr Phe Pro Ile Asn Tyr Val Lys Val Ser
180 185 190

Val Pro Leu Pro Met Pro Gln Cys Ile Ala Met Tyr Asp Phe Lys Met
195 200 205

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

Ile Gln Val Met Arg Arg Val Asp His Asn Trp Ala Glu Gly Arg Ile
225 230 235 240

Gly Gln Thr Ile Gly Ile Phe Pro Ile Ala Phe Val Glu Leu Asn Ala
245 250 255

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

His Pro Pro Lys Gln Gln Gly Gln Arg Ala Leu Pro Pro Val Pro Val
275 280 285

Ile Asp Pro Thr Val Val Thr Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ser
290 295 300

Thr Pro Gly Ser Ser Asn Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Asn Asn Cys
305 310 315 320

Ser Pro Asn His Gln Ile Ser Leu Pro Asn Thr Pro Gln His Val Val
325 330 335

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Val Arg Phe Arg Asp Lys Gly Ala Lys Glu
340 345 350

Lys Arg His Ser Leu Asn Ala Leu Leu Gly Gly Gly Ala Pro Leu Ser
355 360 365

Leu Leu Gln Thr Asn Arg His Ser Ala Glu Ile Leu Ser Leu Pro His
370 375 380

Glu Leu Ser Arg Leu Glu Val Ser Ser Ser Thr Ala Leu Lys Pro Thr
385 390 395 400

Ser Ala Pro Gln Thr Ser Arg Val Leu Lys Thr Thr Val Gln Gln Gln
405 410 415

Met Gln Pro Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Leu Ala Leu Phe Pro Tyr Lys
420 425 430

Pro Arg Gln Thr Asp Glu Leu Glu Leu Lys Lys Gly Cys Val Tyr Ile
435 440 445

Val Thr Glu Arg Cys Val Asp Gly Trp Phe Lys Gly Lys Asn Trp Leu
450 455 460

Asp Ile Thr Gly Val Phe Pro Gly Asn Tyr Leu Thr Pro Leu Arg Ala
465 470 475 480

Arg Asp Gln Gln Gln Leu Met His Gln Trp Lys Tyr Val Pro Gln Asn
485 490 495

Ala Asp Ala Gln Met Ala Gln Val Gln Gln His Pro Val Ala Pro Asp
500 505 510

Val Arg Leu Asn Asn Met Leu Ser Met Gln Pro Pro Asp Leu Pro Pro
515 520 525

Arg Gln Gln Gln Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ser Cys Ser Val Trp Ser
530 535 540

Lys Pro Val Glu Ala Leu Phe Ser Arg Lys Ser Glu Pro Lys Pro Glu
545 550 555 560

Thr Ala Thr Ala Ser Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly
565 570 575

Leu Met Arg Arg Leu Thr His Met Lys Thr Arg Ser Lys Ser Pro Gly
580 585 590

Ala Ser Leu Gln Gln Val Pro Lys Glu Ala Ile Ser Thr Asn Val Glu
595 600 605

Phe Thr Thr Asn Pro Ser Ala Lys Leu His Pro Val His Val Arg Ser
610 615 620

Gly Ser Cys Pro Ser Gln Leu Gln His Ser Gln Pro Leu Asn Glu Thr
625 630 635 640

Pro Ala Ala Lys Thr Ala Ala Gln Gln Gln Gln Phe Leu Pro Lys Gln
645 650 655

Leu Pro Ser Ala Ser Thr Asn Ser Val Ser Tyr Gly Ser Gln Arg Val
660 665 670

Lys Gly Ser Lys Glu Arg Pro His Leu Ile Cys Ala Arg Gln Ser Leu
675 680 685

Asp Ala Ala Thr Phe Arg Ser Met Tyr Asn Asn Ala Ala Ser Pro Pro
690 695 700

Pro Pro Thr Thr Ser Val Ala Pro Ala Val Tyr Ala Gly Gly Gln Gln
705 710 715 720

Gln Val Ile Pro Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gln Leu His Ala Asn Met
725 730 735

Ile Ile Ala Pro Ser His Arg Lys Ser His Ser Leu Asp Ala Ser His
740 745 750

Val Leu Ser Pro Ser Ser Asn Met Ile Thr Glu Ala Ala Ile Lys Ala
755 760 765

Ser Ala Thr Thr Lys Ser Pro Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Arg Phe Arg
770 775 780

Cys Ile Val Pro Tyr Pro Pro Asn Ser Asp Ile Glu Leu Glu Leu His
785 790 795 800

Leu Gly Asp Ile Ile Tyr Val Gln Arg Lys Gln Lys Asn Gly Trp Tyr
805 810 815

Lys Gly Thr His Ala Arg Thr His Lys Thr Gly Leu Phe Pro Ala Ser
820 825 830

Phe Val Glu Pro Asp Cys
835

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Sense-Primer

<400> 12
cttgccttgc cagcatac 18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Anti-Sense-Primer

<400> 13
ctgccagcat tccttcag 18

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Zielsequenz

<400> 14
aacagaggcc ttggaaacct g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Sensestrang

<400> 15
ttcagaggcc uuggaaaccu g 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Anti-Sensestrang

<400> 16
ttcagguuuc caaggccucu g 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Zielsequenz

<400> 17
aaagagcctg gagaccttaa a 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Sensestrang

<400> 18
ttagagccug gagaccuuaa a 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Anti-Sensestrang

<400> 19
ttuuuaaggu cuccaggcuc u 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Zielsequenz

<400> 20
aaggattggt atgtgactct g 21

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Sensestrang

<400> 21
ttggaauugg uaugugacuc ug 22

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Antisensestrang

<400> 22
ttcagaguca cauaccaauc c 21

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Zielsequenz

<400> 23
aagctggatt atctcctgtt g 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Sensestrang

<400> 24
ttgcuggauu aucuccuguu g 21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> siRNA-Antisensestrang

<400> 25
ttcaacagga gauaauccag c 21

<210> 26
<211> 41
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 26

Cys	Pro	Val	Cys	Leu	Glu	Arg	Leu	Asp	Ala	Ser	Ala	Lys	Val	Leu	Pro
1				5				10						15	

Cys	Gln	His	Thr	Phe	Cys	Lys	Arg	Cys	Leu	Leu	Gly	Ile	Val	Gly	Ser				

20 25 30

Arg Asn Glu Leu Arg Cys Pro Glu Cys
35 40

<210> 27
<211> 56
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Cys Ala Lys Ala Leu Tyr Asn Tyr Glu Gly Lys Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

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

Glu Asn Trp Tyr His Gly Glu Val Asn Gly Ile His Gly Phe Phe Pro
35 40 45

Thr Asn Phe Val Gln Ile Ile Lys
50 55

<210> 28
<211> 60
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Gln Cys Lys Ala Leu Tyr Asp Phe Glu Val Lys Asp Lys Glu Ala
1 5 10 15

Asp Lys Asp Cys Leu Pro Phe Ala Lys Asp Asp Val Leu Thr Val Ile
20 25 30

Arg Arg Val Asp Glu Asn Trp Ala Glu Gly Met Leu Ala Asp Lys Ile
35 40 45

Gly Ile Phe Pro Ile Ser Tyr Val Glu Phe Asn Ser
50 55 60

<210> 29
<211> 58
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Val Tyr Val Ala Ile Tyr Pro Tyr Thr Pro Arg Lys Glu Asp Glu
1 5 10 15

Leu Glu Leu Arg Lys Gly Glu Met Phe Leu Val Phe Glu Arg Cys Gln
20 25 30

Asp Gly Trp Phe Lys Gly Thr Ser Met His Thr Ser Lys Ile Gly Val
35 40 45

Phe Pro Gly Asn Tyr Val Ala Pro Val Thr
50 55

<210> 30
<211> 57
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Arg His Arg Val Val Val Ser Tyr Pro Pro Gln Ser Glu Ala Glu
1 5 10 15

Leu Glu Leu Lys Glu Gly Asp Ile Val Phe Val His Lys Lys Arg Glu
20 25 30

Asp Gly Trp Phe Lys Gly Thr Leu Gln Arg Asn Gly Lys Thr Gly Leu
35 40 45

Phe Pro Gly Ser Phe Val Glu Asn Ile
50 55

<210> 31
<211> 121
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31

tgtccggtgt gtctagagcg ccttgatgct tctgcgaagg tcttgccttg ccagcatacg 60
ttttgcaagc gatgtttgct ggggatcgta ggttctcgaa atgaactcag atgtcccgag 120
t 121

<210> 32
<211> 165
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32

ccatgtgcca aagcgttata caactatgaa ggaaaagagc ctggagacct taaattcagc 60
aaaggcgaca tcatcatttt gcgaagacaa gtggatgaaa attggtacca tggggaagtc 120
aatggaatcc atggcttttt ccccaccaac tttgtgcaga ttatt 165

<210> 33
<211> 177
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33

cctcagtgca aagcacttta tgactttgaa gtgaaagaca aggaagcaga caaagattgc 60
cttccatttg caaaggatga tgttctgact gtgatccgaa gagtggatga aaactgggct 120
gaaggaatgc tggcagacaa ataggaata tttccaattt catatgttga gtttaac 177

<210> 34
<211> 171
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 34

agtgtgtatg ttgctatata tccatacact cctcggaaag aggatgaact agagctgaga 60

aaaggggaga tgtttttagt gtttgagcgc tgccaggatg gctggttcaa agggacatcc 120

atgcatacca gcaagatagg ggttttccct ggcaattatg tggcaccagt c 171

<210> 35
<211> 171
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35

gaaaggcaca gggtggtggt ttcctatcct cctcagagtg aggcagaact tgaacttaaa 60

gaaggagata ttgtgtttgt tcataaaaaa cgagaggatg gctggttcaa aggcacatta 120

caacgtaatg ggaaaactgg ccttttccca ggaagctttg tggaaaacat a 171

1

Patentansprüche

1. Isolierte Nucleinsäure, umfassend die Nucleinsäuresequenz bestehend aus SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3.

2. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine Transkriptionsregulatorsequenz funktionell verbunden mit der Nucleotidsequenz, sodass die Nucleinsäure geeignet für die Verwendung als Expressionsvektor wird.

3. Expressionsvektor, umfassend eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2.

4. Wirtszelle, transfiziert mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 3.

5. Wirtszelle nach Anspruch 4, wobei die Zelle das menschliche POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 exprimiert.

6. Gereinigtes rekombinantes menschliches POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 exprimiert von der Wirtszelle nach Anspruch 5.

7. Verfahren zur Produktion eines rekombinanten POSH-Polypeptids der SEQ ID NO: 2, umfassend das Züchten der Zelle nach Anspruch 4 in einem Zellkulturmedium, das für die Expression des POSH-Polypeptids geeignet ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, weiterhin umfassend ein Aufreinigungsverfahren, um die Reinheit des POSH-Polypeptids zu erhöhen.

9. Nucleinsäure, die ein Fusionsprotein codiert, wobei die Nucleinsäure eine erste Nucleinsäuresequenz und eine zweite Nucleinsäuresequenz umfasst, wobei die erste Nucleinsäuresequenz eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 ist, und wobei die zweite Nucleinsäuresequenz ein heterologes Polypeptid codiert und wobei die erste Nucleinsäuresequenz und die zweite Nucleinsäuresequenz so angeordnet sind, dass sie ein Fusionsprotein codieren.

10. Nucleinsäure nach Anspruch 9, wobei das heterologe Polypeptid (i) eine nachweisbare Markierung oder (ii) eine Matrix-bindende Domäne ist.

11. siRNA, die zwischen 15 und 30 aufeinanderfolgende Nucleotide einer Nucleinsäuresequenz besitzt, die auf RNA-Ebene identisch mit einer Sequenz der SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 ist, und welche, wenn in eine Zelle eingebracht, den Spiegel einer menschlichen POSH-mRNA und/oder eines menschlichen POSH-Polypeptids verringert, und fähig ist, die Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in der Zelle zu hemmen, wobei die siRNA eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, und 25.

12. siRNA nach Anspruch 11, wobei ein Duplex gebildet wird zwischen SEQ ID NO: 15 und 16; SEQ ID NO: 18 und 19; SEQ ID NO: 21 und 22; oder SEQ ID NO: 24 und 25.

13. Zusammensetzung, umfassend eine siRNA nach Anspruch 11 oder 12 und eine zusätzliche Komponente aus der Gruppe bestehend aus einem Liposom und einem pharmazeutisch wirksamen Exzipienten.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, formuliert für topische Anwendung.

15. Isoliertes Polypeptid, bestehend aus einer Aminosäuresequenz, die identisch mit SEQ ID NO: 2 ist.

16. Polypeptid nach Anspruch 15, wobei das Polypeptid ein Fusionsprotein ist.

17. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei das Fusionsprotein in einem Zwei-Hybrid-Screening-Assay funktioniert.

18. Verfahren zur Identifizierung eines antiviralen Wirkstoffes, umfassend: Bereitstellung des menschlichen POSH-Polypeptids der SEQ ID NO: 2 oder eines Fragments davon, welches mindestens 20 aufeinanderfolgende Aminosäuren enthält, und eines Test-Wirkstoffs; und Identifizierung eines Test-Wirkstoffs, der mit dem POSH-Polypeptid oder einem Fragment davon interagiert, wobei der Test-Wirkstoff fähig ist, die durch POSH verursachte Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln zu hemmen.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das POSH-Polypeptid in einer Zelle exprimiert wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das POSH-Polypeptid ein gereinigtes Polypeptid ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei das POSH-Polypeptidfragment eine Domäne umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: einer SH3-Domäne und einer RING-Domäne.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Test-Wirkstoff an eine Domäne bindet, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: einer SH3 Domäne und einer RING Domäne.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei der Test-Wirkstoff ein Polypeptid, ein Antikörper, ein kleines Molekül oder ein Peptidomimetikum ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei der Test-Wirkstoff, der mit dem POSH-Polypeptid oder einem Fragment davon interagiert, die Reifung eines Virus mit PT AP- oder PPEY-Motiv verringert.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Interaktion mit dem POSH-Polypeptid oder einem Fragment davon die Interaktion zwischen dem POSH- und einem Gag-Polypeptid verringert.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Gag-Polypeptid ein HIV p24 ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei das Gag-Polypeptid ein Aminosäuremotiv umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe-bestehend aus PXXP, PPXY, RXXPXXP, RPDPTAP, RPLPVAP, RPEPTAP und RPEPTAPPEE.

28. Verfahren zur Identifizierung eines antiviralen Wirkstoffs, umfassend: Bereitstellung einer POSH-Nucleinsäure der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 und eines Test-Wirkstoffs; und Identifizierung eines Test-Wirkstoffes, der an die POSH-Nucleinsäure bindet.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der Test-Wirkstoff eine Ribonucleinsäure, ein Antisense-Oligonucleotid, ein RNAi-Konstrukt, ein DNA-Enzym oder ein Ribozym ist.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, wobei die Bindung des Test-Wirkstoffs an die POSH-Nucleinsäure den Spiegel des POSH-Transkripts verringert.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 30, wobei der antivirale Wirkstoff wirksam gegen ein Virus ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: einem retroiden Virus und einem RNA-Virus.

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei a) das retroide Virus ein Lentivirus ist; b) das retroide Virus ein HIV1-Lentivirus ist; c) das RNA-Virus ein Filovirus ist; oder d) das RNA-Virus ein Ebola-Filovirus ist.

33. Arzneimittel für die Verwendung in der Medizin, umfassend eine siRNA, die zwischen 15 und 30 aufeinanderfolgende Nucleotide einer Nucleinsäuresequenz umfasst, die auf RNA-Ebene identisch mit einer Sequenz der SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 ist, und welche, wenn in eine Zelle eingebracht, den Spiegel einer menschlichen POSH-mRNA und/oder eines menschlichen POSH-Polypeptids verringert, und fähig ist, die Produktion von virus-ähnlichen Partikeln in der Zelle zu hemmen.

34. Arzneimittel nach Anspruch 33, wobei die siRNA ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25.

35. Verfahren zur Bewertung des antiviralen Potentials eines Wirkstoffs, umfassend: (i) Infektion eines transgenen nicht-menschlichen Tieres, umfassend eine Vielzahl von Zellen, die ein oder mehrere rekombinante Konstrukte des menschlichen POSH-Gens der SEQ ID NO: 1 enthalten, welche das menschliche POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 exprimieren, das einen POSH-Funktionsverlust-Phänotyp abschwächt, mit einem retroiden Virus oder einem RNA-Virus; (ii) Inkontaktbringen des transgenen nicht-menschlichen Tiers von Schritt (i) mit einem Test-Wirkstoff, und (iii) Vergleichen der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in einer Probe von dem behandelten Tier mit der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in einer Probe von einem unbehandelten transgenen Tier oder einem transgenen Tier, das mit einem Kontroll-Wirkstoff behandelt wurde, wobei der Unterschied in der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in dem behandelten Tier relativ zu der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln bei Fehlen von Behandlung oder Behandlung mit einem Kontroll-Wirkstoff das antivirale Potential der Testverbindung anzeigt.

36. Verfahren zur Bewertung einer antiviralen Aktivität einer Testverbindung, umfassend: (i) Infektion eines nicht-menschlichen transgenen Tieres, umfassend eine Vielzahl von Zellen, die ein oder mehrere rekombinante Konstrukte des menschlichen POSH-Gens der SEQ ID NO: 1 enthalten, welche das menschliche POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 exprimieren, das einen POSH-Funktionsverlust-Phänotyp abschwächt, die Keimbahn- und somatische Zellen besitzen, die das menschliche POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 exprimieren, oder eine Probe von Zellen, die davon abgeleitet sind, mit einem retroiden Virus oder einem RNA-Virus; (ii) Inkontaktbringen des nicht-menschlichen transgenen Tiers oder der Zellprobe von Schritt (i) mit einem Test-Wirkstoff, und (iii) Bestimmung der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in einer Probe von dem transgenen Tier oder in der Zellprobe, wobei eine statistisch signifikante Abnahme in der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln relativ zu der Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln bei Fehlen des Test-Wirkstoffs anzeigt, dass die Test-Verbindung ein potentieller antiviraler Wirkstoff ist.

37. Verfahren nach Anspruch 35 oder 36, wobei: a) das retroide Virus ein Lentivirus ist; b) das retroide Virus ein HIV1-Lentivirus ist; c) das RNA-Virus ein Filovirus ist; oder d) das RNA-Virus ein Ebola-Filovirus ist.

38. Verwendung eines RNAi-Konstrukts, das eine Ubiquitin-bezogene Aktivität eines POSH-Polypeptids der SEQ ID NO: 2 oder eines Fragments davon hemmt, für die Herstellung einer therapeutischen Zusammensetzung zur Hemmung viraler Reifung.

39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei das POSH-Polypeptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 2, 5, 7, 9 und 11 und Fragmenten, umfassend mindestens 20 aufeinanderfolgende Aminosäuren aus einer der SEQ ID NOs: 2, 5, 7, 9 und 11.

40. Verwendung nach Anspruch 38, umfassend die Hemmung der Aktivität der RING-Domäne des POSH-Polypeptids.

41. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 bis 40, wobei das RNAi-Konstrukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25.

42. Verwendung nach Anspruch 38, umfassend die Hemmung der viralen Reifung eines retroiden Virus

oder eines RNA-Virus.

43. Verwendung nach Anspruch 42, wobei: a) das retroide Virus ein Lentivirus ist; b) das retroide Virus ein HIV1-Lentivirus ist; c) das RNA-Virus ein Filovirus ist; oder d) das RNA-Virus ein Ebola-Filovirus ist.

44. Verfahren zum Testen einer Ubiquitin-bezogenen Aktivität eines POSH-Polypeptids oder eines Fragments davon, wobei beide, das Polypeptid und die Fragmente, codiert sind von Nucleinsäuren, die an die menschliche POSH-DNA der SEQ ID NO: 1 hybridisieren, und Ubiquitin-Ligase-Aktivität bewahren, umfassend: Erzeugung eines Gemischs, das mit der Ubiquitin-bezogenen Aktivität kompatibel ist, umfassend: ein Ubiquitin, ein E1, ein E2 und das POSH-Polypeptid oder Fragment davon, und Feststellen, ob das Ubiquitin an das POSH-Polypeptid oder Fragment davon bindet.

45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei das POSH-Polypeptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 2, 5, 7, 9, 11 und 26.

46. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, wobei das Ubiquitin nachweisbar markiert ist.

47. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, wobei das POSH-Polypeptid nachweisbar markiert ist.

48. Verfahren nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Markierung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Radioisotopen, fluoreszierenden Verbindungen, Enzymen und Enzym-Cofaktoren.

49. Assay für die Identifizierung eines Inhibitors einer Ubiquitin-bezogenen Aktivität eines POSH-Polypeptids, umfassend: (i) Bereitstellen eines Gemisches umfassend ein Ubiquitin, E2 und ein POSH-Polypeptid der SEQ ID NO: 2 oder ein Fragment davon unter Bedingungen, die die Ubiquitinierung des POSH-Polypeptids fördern; (ii) Inkontaktbringen des Ubiquitin-verbindenden Systems mit einem Test-Wirkstoff; (iii) Messen eines Grades der Ubiquitinierung des POSH-Polypeptids in der Anwesenheit des Test-Wirkstoffs; und (iv) Vergleichen des gemessenen Grades der Ubiquitinierung in Anwesenheit des Test-Wirkstoffs mit einem geeigneten Referenzwert, wobei eine Abnahme der Ubiquitinierung des POSH-Polypeptids in Anwesenheit des zu prüfenden Wirkstoffs einen Inhibitor der Ubiquitinierung des regulatorischen Proteins anzeigt.

50. Assay nach Anspruch 49, wobei das Ubiquitin zur Verfügung gestellt wird in einer Form, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: einem nicht konjugierten Ubiquitin, in welchem Fall das Ubiquitin-verbindende System zusätzlich ein E1 und Adenosintriphosphat umfasst, einem aktivierten E1: Ubiquitin-Konjugat und einem aktivierten E2: Ubiquitinthioester.

51. Assay nach Anspruch 49 oder 50, wobei das Ubiquitin nachweisbar markiert ist.

52. Assay nach Anspruch 49 oder 50, wobei das POSH-Polypeptid nachweisbar markiert ist.

53. Therapeutische Zusammensetzung, umfassend einen POSH-Inhibitor bestehend aus einem RNAi-Konstrukt der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 oder 25, oder ein Polypeptid der SEQ ID NO: 30, und einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.

54. Therapeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53, wobei der Inhibitor die Interaktion zwischen einem POSH-Polypeptid und POSH-AP unterbricht und/oder die Ubiquitin-bezogene Aktivität eines POSH-Polypeptids hemmt.

55. Therapeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53, wobei der Inhibitor das Polypeptid von SEQ ID NO: 30 ist.

56. Therapeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53, wobei das RNAi-Konstrukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25.

57. Verwendung eines Wirkstoffs, der die POSH-Aktivität hemmt, bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25 und 30, für die Herstellung einer therapeutischen Zusammensetzung zur Hemmung viraler Infektion.

58. Verwendung nach Anspruch 57, wobei der Wirkstoff die Interaktion zwischen einem POSH-Polypeptid und einem POSH-AP hemmt.

59. Verwendung nach Anspruch 57, wobei der Wirkstoff die Ligase-Aktivität hemmt.

60. Ubiquitiniertes POSH-Polypeptid, umfassend die Polypeptidsequenz der SEQ ID NO: 2 oder ein Fragment davon.

61. Verwendung einer siRNA, die zwischen 15 und 30 aufeinanderfolgende Nucleotide einer Nucleinsäuresequenz besitzt, die auf RNA-Ebene identisch mit einer Sequenz der SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 ist, und welche, wenn in eine Zelle eingebracht, den Spiegel einer menschlichen POSH-mRNA und/oder eines menschlichen POSH-Polypeptids verringert, und fähig ist, die Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln in der Zelle zu hemmen, in der Herstellung eines Medikaments für die Hemmung von POSH-Aktivität während viraler Reifung.

62. Verwendung nach Anspruch 61, wobei die siRNA ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der SEQ ID NOs: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 und 25.

Es folgen 28 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1: Menschliche POSH-Codierungssequenz (SEQ ID NO: 1)

ATGGATGAATCAGCCTTGTTGGATCTTTTGGAGTGTCCGGTGTGTCTAGAGCGCCTTGATGCTTCTGCGA
AGGTCTTGCCTTGCCAGCATACGTTTTGCAAGCGATGTTTGCTGGGGATCGTAGGTTCTCGAAATGAACT
CAGATGTCCCGAGTGCAGGACTCTTGTTGGCTCGGGTGTCGAGGAGCTTCCCAGTAACATCTTGCTGGTC
AGACTTCTGGATGGCATCAAACAGAGGCCTTGGAAACCTGGTCCTGGTGGGGGAAGTGGGACCAACTGCA
CAAATGCATTAAGGTCTCAGAGCAGCACTGTGGCTAATTGTAGCTCAAAAGATCTGCAGAGCTCCCAGGG
CGGACAGCAGCCTCGGGTGCAATCCTGGAGCCCCCCAGTGAGGGGTATACCTCAGTTACCATGTGCCAAA
GCGTTATACAACTATGAAGGAAAAGAGCCTGGAGACCTTAAATTCAGCAAAGGCGACATCATCATTTTGC
GAAGACAAGTGGATGAAAATTGGTACCATGGGGAAGTCAATGGAATCCATGGCTTTTTCCCCACCAACTT
TGTGCAGATTATTAAACCGTTACCTCAGCCCCCACCTCAGTGCAAAGCACTTTATGACTTTGAAGTGAAA
GACAAGGAAGCAGACAAAGATTGCCTTCCATTTGCAAAGGATGATGTTCTGACTGTGATCCGAAGAGTGG
ATGAAAACTGGGCTGAAGGAATGCTGGCAGACAAAATAGGAATATTTCCAATTTCATATGTTGAGTTTAA
CTCGGCTGCTAAGCAGCTGATAGAATGGGATAAGCCTCCTGTGCCAGGAGTTGATGCTGGAGAATGTTCC
TCGGCAGCAGCCCAGAGCAGCACTGCCCCAAAGCACTCCGACACCAAGAAGAACACCAAAAAGCGGCACT
CCTTCACTTCCCTCACTATGGCCAACAAGTCCTCCCAGGCATCCCAGAACCGCCACTCCATGGAGATCAG
CCCCCCTGTCCTCATCAGCTCCAGCAACCCCACTGCTGCTGCACGGATCAGCGAGCTGTCTGGGCTCTCC
TGCAGTGCCCCTTCTCAGGTTCATATAAGTACCACCGGGTTAATTGTGACCCCGCCCCCAAGCAGCCCAG
TGACAACTGGCCCCTCGTTTACTTTCCCATCAGATGTTCCCTACCAAGCTGCCCTTGGAACTTTGAATCC
TCCTCTTCCACCACCCCCTCTCCTGGCTGCCACTGTCCTTGCCTCCACACCACCAGGCGCCACCGCCGCC
GCTGCTGCTGCTGGAATGGGACCGAGGCCCATGGCAGGATCCACTGACCAGATTGCACATTTACGGCCGC
AGACTCGCCCCAGTGTGTATGTTGCTATATATCCATACACTCCTCGGAAAGAGGATGAACTAGAGCTGAG
AAAAGGGGAGATGTTTTTAGTGTTTGAGCGCTGCCAGGATGGCTGGTTCAAAGGGACATCCATGCATACC
AGCAAGATAGGGGTTTTCCCTGGCAATTATGTGGCACCAGTCACAAGGGCGGTGACAAATGCTTCCCAAG
CTAAAGTCCCTATGTCTACAGCTGGCCAGACAAGTCGGGGAGTGACCATGGTCAGTCCTTCCACGGCAGG
AGGGCCTGCCCAGAAGCTCCAGGGAAATGGCGTGGCTGGGAGTCCCAGTGTTGTCCCCGCAGCTGTGGTA
TCAGCAGCTCACATCCAGACAAGTCCTCAGGCTAAGGTCTTGTTGCACATGACGGGGCAAATGACAGTCA
ACCAGGCCCGCAATGCTGTGAGGACAGTTGCAGCGCACAACCAGGAACGCCCCACGGCAGCAGTGACACC
CATCCAGGTACAGAATGCCGCCGGCCTCAGCCCTGCATCTGTGGGCCTGTCCCATCACTCGCTGGCCTCC
CCACAACCTGCGCCTCTGATGCCAGGCTCAGCCACGCACACTGCTGCCATCAGTATCAGTCGAGCCAGTG
CCCCTCTGGCCTGTGCAGCAGCTGCTCCACTGACTTCCCCAAGCATCACCAGTGCTTCTCTGGAGGCTGA
GCCCAGTGGCCGGATAGTGACCGTTCTCCCTGGACTCCCCACATCTCCTGACAGTGCTTCATCAGCTTGT
GGGAACAGTTCAGCAACCAAACCAGACAAGGATAGCAAAAAAGAAAAAAAGGGTTTGTTGAAGTTGCTTT
CTGGCGCCTCCACTAAACGGAAGCCCCGCGTGTCTCCTCCAGCATCGCCCACCCTAGAAGTGGAGCTGGG
CAGTGCAGAGCTTCCTCTCCAGGGAGCGGTGGGGCCCGAACTGCCACCAGGAGGTGGCCATGGCAGGGCA
GGCTCCTGCCCTGTGGACGGGGACGGACCGGTCACGACTGCAGTGGCAGGAGCAGCCCTGGCCCAGGATG
CTTTTCATAGGAAGGCAAGTTCCCTGGACTCCGCAGTTCCCATCGCTCCACCTCCTCGCCAGGCCTGTTC
CTCCCTGGGTCCTGTCTTGAATGAGTCTAGACCTGTCGTTTGTGAAAGGCACAGGGTGGTGGTTTCCTAT
CCTCCTCAGAGTGAGGCAGAACTTGAACTTAAAGAAGGAGATATTGTGTTTGTTCATAAAAAACGAGAGG
ATGGCTGGTTCAAAGGCACATTACAACGTAATGGGAAAACTGGCCTTTTCCCAGGAAGCTTTGTGGAAAA
CATATGA

Figur 2: menschliche POSH-Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2)

MDESALLDLLECPVCLERLDASAKVLPCQHTFCKRCLLGIVGSRNELRCPECRTLVGSGVEELPSNILLV
RLLDGIKQRPWKPGPGGGSGTNCTNALRSQSSTVANCSSKDLQSSQGGQQPRVQSWSPPVRGIPQLPCAK
ALYNYEGKEPGDLKFSKGDIIILRRQVDENWYHGEVNGIHGFFPTNFVQIIKPLPQPPPQCKALYDFEVK
DKEADKDCLPFAKDDVLTVIRRVDENWAEGMLADKIGIFPISYVEFNSAAKQLIEWDKPPVPGVDAGECS
SAAAQSSTAPKHSDTKKNTKKRHSFTSLTMANKSSQASQNRHSMEISPPVLISSSNPTAAARISELSGLS
CSAPSQVHISTTGLIVTPPPSSPVTTGPSFTFPSDVPYQAALGTLNPPLPPPPLLAATVLASTPPGATAA
AAAAGMGPRPMAGSTDQIAHLRPQTRPSVYVAIYPYTPRKEDELELRKGEMFLVFERCQDGWFKGTSMHT
SKIGVFPGNYVAPVTRAVTNASQAKVPMSTAGQTSRGVTMVSPSTAGGPAQKLQGNGVAGSPSVVPAAVV
SAAHIQTSPQAKVLLHMTGQMTVNQARNAVRTVAAHNQERPTAAVTPIQVQNAAGLSPASVGLSHHSLAS
PQPAPLMPGSATHTAAISISRASAPLACAAAAPLTSPSITSASLEAEPSGRIVTVLPGLPTSPDSASSAC
GNSSATKPDKDSKKEKKGLLKLLSGASTKRKPRVSPPASPTLEVELGSAELPLQGAVGPELPPGGGHGRA
GSCPVDGDGPVTTAVAGAALAQDAFHRKASSLDSAVPIAPPPRQACSSLGPVLNESRPVVCERHRVVVSY
PPQSEAELELKEGDIVFVHKKREDGWFKGTLQRNGKTGLFPGSFVENI

Figur 3: menschliche POSH cDNA-Sequenz (SEQ ID NO: 3)

CTGAGAGACACTGCGAGCGGCGAGCGCGGTGGGGCCGCATCTGCATCAGCCGCCGCAGCCGCTGCGGGGC
CGCGAACAAAGAGGAGGAGCCGAGGCGCGAGAGCAAAGTCTGAAATGGATGTTACATGAGTCATTTTAAG
GGATGCACACAACTATGAACATTTCTGAAGATTTTTTCTCAGTAAAGTAGATAAAGATGGATGAATCAGC
CTTGTTGGATCTTTTGGAGTGTCCGGTGTGTCTAGAGCGCCTTGATGCTTCTGCGAAGGTCTTGCCTTGC
CAGCATACGTTTTGCAAGCGATGTTTGCTGGGGATCGTAGGTTCTCGAAATGAACTCAGATGTCCCGAGT
GCAGGACTCTTGTTGGCTCGGGTGTCGAGGAGCTTCCCAGTAACATCTTGCTGGTCAGACTTCTGGATGG
CATCAAACAGAGGCCTTGGAAACCTGGTCCTGGTGGGGGAAGTGGGACCAACTGCACAAATGCATTAAGG
TCTCAGAGCAGCACTGTGGCTAATTGTAGCTCAAAAGATCTGCAGAGCTCCCAGGGCGGACAGCAGCCTC
GGGTGCAATCCTGGAGCCCCCCAGTGAGGGGTATACCTCAGTTACCATGTGCCAAAGCGTTATACAACTA
TGAAGGAAAAGAGCCTGGAGACCTTAAATTCAGCAAAGGCGACATCATCATTTTGCGAAGACAAGTGGAT
GAAAATTGGTACCATGGGGAAGTCAATGGAATCCATGGCTTTTTCCCCACCAACTTTGTGCAGATTATTA
AACCGTTACCTCAGCCCCCACCTCAGTGCAAAGCACTTTATGACTTTGAAGTGAAAGACAAGGAAGCAGA
CAAAGATTGCCTTCCATTTGCAAAGGATGATGTTCTGACTGTGATCCGAAGAGTGGATGAAAACTGGGCT
GAAGGAATGCTGGCAGACAAAATAGGAATATTTCCAATTTCATATGTTGAGTTTAACTCGGCTGCTAAGC
AGCTGATAGAATGGGATAAGCCTCCTGTGCCAGGAGTTGATGCTGGAGAATGTTCCTCGGCAGCAGCCCA
GAGCAGCACTGCCCCAAAGCACTCCGACACCAAGAAGAACACCAAAAAGCGGCACTCCTTCACTTCCCTC
ACTATGGCCAACAAGTCCTCCCAGGCATCCCAGAACCGCCACTCCATGGAGATCAGCCCCCCTGTCCTCA
TCAGCTCCAGCAACCCCACTGCTGCTGCACGGATCAGCGAGCTGTCTGGGCTCTCCTGCAGTGCCCCTTC
TCAGGTTCATATAAGTACCACCGGGTTAATTGTGACCCCGCCCCCAAGCAGCCCAGTGACAACTGGCCCC
TCGTTTACTTTCCCATCAGATGTTCCCTACCAAGCTGCCCTTGGAACTTTGAATCCTCCTCTTCCACCAC
CCCCTCTCCTGGCTGCCACTGTCCTTGCCTCCACACCACCAGGCGCCACCGCCGCCGCTGCTGCTGCTGG
AATGGGACCGAGGCCCATGGCAGGATCCACTGACCAGATTGCACATTTACGGCCGCAGACTCGCCCCAGT
GTGTATGTTGCTATATATCCATACACTCCTCGGAAAGAGGATGAACTAGAGCTGAGAAAAGGGGAGATGT
TTTTAGTGTTTGAGCGCTGCCAGGATGGCTGGTTCAAAGGGACATCCATGCATACCAGCAAGATAGGGGT
TTTCCCTGGCAATTATGTGGCACCAGTCACAAGGGCGGTGACAAATGCTTCCCAAGCTAAAGTCCCTATG
TCTACAGCTGGCCAGACAAGTCGGGGAGTGACCATGGTCAGTCCTTCCACGGCAGGAGGGCCTGCCCAGA
AGCTCCAGGGAAATGGCGTGGCTGGGAGTCCCAGTGTTGTCCCCGCAGCTGTGGTATCAGCAGCTCACAT
CCAGACAAGTCCTCAGGCTAAGGTCTTGTTGCACATGACGGGGCAAATGACAGTCAACCAGGCCCGCAAT
GCTGTGAGGACAGTTGCAGCGCACAACCAGGAACGCCCCACGGCAGCAGTGACACCCATCCAGGTACAGA
ATGCCGCCGGCCTCAGCCCTGCATCTGTGGGCCTGTCCCATCACTCGCTGGCCTCCCCACAACCTGCGCC
TCTGATGCCAGGCTCAGCCACGCACACTGCTGCCATCAGTATCAGTCGAGCCAGTGCCCCTCTGGCCTGT
GCAGCAGCTGCTCCACTGACTTCCCCAAGCATCACCAGTGCTTCTCTGGAGGCTGAGCCCAGTGGCCGGA
TAGTGACCGTTCTCCCTGGACTCCCCACATCTCCTGACAGTGCTTCATCAGCTTGTGGGAACAGTTCAGC
AACCAAACCAGACAAGGATAGCAAAAAAGAAAAAAAGGGTTTGTTGAAGTTGCTTTCTGGCGCCTCCACT
AAACGGAAGCCCCGCGTGTCTCCTCCAGCATCGCCCACCCTAGAAGTGGAGCTGGGCAGTGCAGAGCTTC
CTCTCCAGGGAGCGGTGGGGCCCGAACTGCCACCAGGAGGTGGCCATGGCAGGGCAGGCTCCTGCCCTGT
GGACGGGGACGGACCGGTCACGACTGCAGTGGCAGGAGCAGCCCTGGCCCAGGATGCTTTTCATAGGAAG
GCAAGTTCCCTGGACTCCGCAGTTCCCATCGCTCCACCTCCTCGCCAGGCCTGTTCCTCCCTGGGTCCTG
TCTTGAATGAGTCTAGACCTGTCGTTTGTGAAAGGCACAGGGTGGTGGTTTCCTATCCTCCTCAGAGTGA
GGCAGAACTTGAACTTAAAGAAGGAGATATTGTGTTTGTTCATAAAAAACGAGAGGATGGCTGGTTCAAA
GGCACATTACAACGTAATGGGAAAACTGGCCTTTTCCCAGGAAGCTTTGTGGAAAACATATGAGGAGACT
GACACTGAAGAAGCTTAAAATCACTTCACACAACAAAGTAGCACAAAGCAGTTTAACAGAAAGAGCACAT
TTGTGGACTTCCAGATGGTCAGGAGATGAGCAAAGGATTGGTATGTGACTCTGATGCCCCAGCACAGTTA
CCCCAGCGAGCAGAGTGAAGAAGATGTTTGTGTGGGTTTTGTTAGTCTGGATTCGGATGTATAAGGTGTG
CCTTGTACTGTCTGATTTACTACACAGAGAAACTTTTTTTTTTTTTTTAAGATATATGACTAAAATGGACA
ATTGTTTACAAGGCTTAACTAATTTATTTGCTTTTTTAAACTTGAACTTTTCGTATAATAGATACGTTCT
TTGGATTATGATTTTAAGAAATTATTAATTTATGAAATGATAGGTAAGGAGAAGCTGGATTATCTCCTGT
TGAGAGCAAGAGATTCGTTTTGACATAGAGTGAATGCATTTTCCCCTCTCCTCCTCCCTGCTACCATTAT
ATTTTGGGGTTATGTTTTGCTTCTTTAAGATAGAAATCCCAGTTCTCTAATTTGGTTTTCTTCTTTGGGA
AACCAAACATACAAATGAATCAGTATCAATTAGGGCCTGGGGTAGAGAGACAGAAACTTGAGAGAAGAGA
AGTTAGTGATTCCCTCTCTTTCTAGTTTGGTAGGAATCACCCTGAAGACCTAGTCCTCAATTTAATTGTG
TGGGTTTTTAATTTTCCTAGAATGAAGTGACTGAAACAATGAGAAAGAATACAGCACAACCCTTGAACAA
AATGTATTTAGAAATATATTTAGTTTTATAGCAGAAGCAGCTCAATTGTTTGGTTGGAAAGTAGGGGAAA
TTGAAGTTGTAGTCACTGTCTGAGAATGGCTATGAAGCGTCATTTCACATTTTACCCCAACTGACCTGCA

TGCCCAGGACACAAGTAAAACATTTGTGAGATAGTGGTGGTAAGTGATGCACTCGTGTTAAGTCAAAGGC
TATAAGAAACACTGTGAAAAGTTCATATTCATCCATTGTGATTCTTTCCCCACGTCTTGCATGTATTACT
GGATTCCCACAGTAATATAGACTGTGCATGGTGTGTATATTTCATTGCGATTTCCTGTTAAGATGAGTTT
GTACTCAGAATTGACCAATTCAGGAGGTGTAAAAATAAACAGTGTTCTCTTCTCTACCCCAAAGCCACTA
CTGACCAAGGTCTCTTCAGTGCACTCGCTCCCTCTCTGGCTAAGGCATGCATTAGCCACTACACAAGTCA
TTAGTGAAAGTGGTCTTTTATGTCCTCCCAGCAGACAGACATCAAGGATGAGTTAACCAGGAGACTACTC
CTGTGACTGTGGAGCTCTGGAAGGCTTGGTGGGAGTGAATTTGCCCACACCTTACAATTGTGGCAGGATC
CAGAAGAGCCTGTCTTTTTATATCCATTCCTTGATGTCATTGGCCTCTCCCACCGATTTCATTACGGTGC
CACGCAGTCATGGATCTGGGTAGTCCGGAAAACAAAAGGAGGGAAGACAGCCTGGTAATGAATAAGATCC
TTACCACAGTTTTCTCATGGGAAATACATAATAAACCCTTTCATCTTTTTTTTTTTCCTTTAAGAATTAA
AACTGGGAAATAGAAACATGAACTGAAAAGTCTTGCAATGACAAGAGGTTTCATGGTCTTAAAAAGATAC
TTTATATGGTTGAAGATGAAATCATTCCTAAATTAACCTTTTTTTTAAAAAAAAAACAATGTATATTATGT
TCCTGTGTGTTGAATTTAAAAAAAAAAAAATACTTTACTTGGATATTCATGTAATATATAAAGGTTTGGTG
AAATGAACTTTAGTTAGGAAAAAGCTGGCATCAGCTTTCATCTGTGTAAGTTGACACCAATGTGTCATAA
TATTCTTTATTTTGGGAAATTAGTGTATTTTATAAAAATTTTAAAAAGAAAAAAGACTACTACAGGTTAA
GATAATTTTTTTACCTGTCTTTTCTCCATATTTTAAGCTATGTGATTGAAGTACCTCTGTTCATAGTTTC
CTGGTATAAAGTTGGTTAAAATTTCATCTGTTAATAGATCATTAGGTAATATAATGTATGGGTTTTCTAT
TGGTTTTTTGCAGACAGTAGAGGGAGATTTTGTAACAAGGGCTTGTTACACAGTGATATGGTAATGATAA
AATTGCAATTTATCACTCCTTTTCATGTTAATAATTTGAGGACTGGATAAAAGGTTTCAAGATTAAAATT
TGATGTTCAAACCTTTGT

Figur 4: 5' cDNA-Fragment von menschl. POSH (öffentl. gi:10432611; SEQ ID NO: 4)

ctgagagacactgcgagcggcgagcgcggtggggccgcatctgcatcagccgccgcagccgctgcggggc
cgcgaacaaagaggaggagccgaggcgcgagagcaaagtctgaaatggatgttacatgagtcattttaag
gatgcacacaactatgaacatttctgaagatttttttctcagtaaagtagataaagatggatgaatcagcc
ttgttggatcttttggagtgtccggtgtgtctagagcgccttgatgcttctgcgaaggtcttgccttgcc
agcatacgttttgcaagcgatgtttgctggggatcgtaggttctcgaaatgaactcagatgtcccgagtg
caggactcttgttggctcgggtgtcgaggagcttcccagtaacatcttgctggtcagacttctggatggc
atcaaacagaggccttggaaacctggtcctggtgggggaagtgggaccaactgcacaaatgcattaaggt
ctcagagcagcactgtggctaattgtagctcaaaagatctgcagagctcccagggcggacagcagcctcg
ggtgcaatcctggagccccccagtgaggggtatacctcagttaccatgtgccaaagcgttatacaactat
gaaggaaaagagcctggagaccttaaattcagcaaaggcgacatcatcattttgcgaagacaagtggatg
aaaattggtaccatggggaagtcaatggaatccatggctttttccccaccaactttgtgcagattattaa
accgttacctcagccccccacctcagtgcaaagcactttatgactttgaagtgaaagacaaggaagcagac
aaagattgccttccatttgcaaaggatgatgttctgactgtgatccgaagagtggatgaaaactgggctg
aaggaatgctggcagacaaaataggaatatttccaatttcatatgttgagtttaactcggctgctaagca
gctgatagaatgggataagcctcctgtgccaggagttgatgctggagaatgttcctcggcagcagcccag
agcagcactgccccaaagcactccgacaccaagaagaacaccaaaaagcggcactccttcacttccctca
ctatggccaacaagtcctcccaggcatcccagaaccgccactccatggagatcagccccctgtcctcat
cagctccagcaaccccactgctgctgcacggatcagcgagctgtctgggctctcctgcagtgccccttct
caggttcatataagtaccaccgggttaattgtgaccccgccccaagcagcccagtgacaactggccccct
cgtttactttcccatcagatgttccctaccaagctgcccttggaactttgaatcctcctcttccaccacc
ccctctcctggctgccactgtccttgcctccacaccaccaggcgccaccgccgccgctgctgctgctgga
atgggaccgaggcccatggcaggatccactgaccagattgcacatttacggccgcagactcgccccagtg
tgtatgttgctatatatccatacactcctcggaaagaggatgaactagagctgagaaaaggggagatgtt
tttagtgtttgagcgctgccaggatggctggttcaaagggacatccatgcataccagcaagataggggtt
ttccctggcaattatgtggcaccagtcacaagggcggtgacaaatgcttcccaagctaaagtccctatgt
ctacagctggccagacaagtcggggagtgaccatggtcagtccttccacggcaggagggcctgcccagaa
gctccagggaaatggcgtggctgggagtcccagtgttgtccccgcagctgtggtatcagcagctcacatc
cagacaagtcctcaggctaaggtcttgttgcacatgacggggcaaatgacagtcaaccaggcccgcaatg
ctgtgaggacagttgcagcgcacaaccaggaacgccccacggcagcagtgacacccatccaggtacagaa
tgccgccggcctcagccctgcatctgtgggcctgtcccatcactcgctggcctccccacaacctgcgcct
ctgatgccaggctcagccacgcacactgctgccatcagtatcagtcgagccagtgccccctctggcctgtg
cagcagctgctccactgacttccccaagcatcaccagtgcttctctggaggctgagcccagtggccggat
agtgaccgttctccctggactccccacatctcctgacagtgcttcatcagcttgtgggaacagttcagca
accaaaccagacaaggatagc

Figur 5: N-Terminus Proteinfragment von hPOSH (öffentl. gi: 10432612; SEQ ID NO: 5)

MDESALLDLLECPVCLERLDASAKVLPCQHTFCKRCLLGIVGSRNELRCPECRTLVGSGVEELPSNILLV
RLLDGIKQRPWKPGPGGGSGTNCTNALRSQSSTVANCSSKDLQSSQGGQQPRVQSWSPPVRGIPQLPCAK
ALYNYEGKEPGDLKFSKGDIIILRRQVDENWYHGEVNGIHGFFPTNFVQIIKPLPQPPPQCKALYDFEVK
DKEADKDCLPFAKDDVLTVIRRVDENWAEGMLADKIGIFPISYVEFNSAAKQLIEWDKPPVPGVDAGECS
SAAAQSSTAPKHSDTKKNTKKRHSFTSLTMANKSSQASQNRHSMEISPPVLISSSNPTAAARISELSGLS
CSAPSQVHISTTGLIVTPPPSSPVTTGPSFTFPSDVPYQAALGTLNPPLPPPPLLAATVLASTPPGATAA
AAAAGMGPRPMAGSTDQIAHLRPQTRPSVYVAIYPYTPRKEDELELRKGEMFLVFERCQDGWFKGTSMHT
SKIGVFPGNYVAPVTRAVTNASQAKVPMSTAGQTSRGVTMVSPSTAGGPAQKLQGNGVAGSPSVVPAAVV
SAAHIQTSPQAKVLLHMTGQMTVNQARNAVRTVAAHNQERPTAAVTPIQVQNAAGLSPASVGLSHHSLAS
PQPAPLMPGSATHTAAISISRASAPLACAAAAPLTSPSITSASLEAEPSGRIVTVLPGLPTSPDSASSAC
GNSSATKPDKDS

Figur 6: 3' mRNA-Fragment von hPOSH (öffentl. gi: 7959248; SEQ ID NO: 6)

atttcatatgttgagtttaactcggctgctaagcagctgatagaatgggataagcctcctgtgccaggag
ttgatgctggagaatgttcctcggcagcagcccagagcagcactgccccaaagcactccgacaccaagaa
gaacaccaaaaagcggcactccttcacttccctcactatggccaacaagtcctcccaggcatcccagaac
cgccactccatggagatcagcccccctgtcctcatcagctccagcaaccccactgctgctgcacggatca
gcgagctgtctgggctctcctgcagtgccccttctcaggttcatataagtaccaccgggttaattgtgac
cccgcccccaagcagcccagtgacaactggcccctcgtttactttcccatcagatgttccctaccaagct
gcccttggaactttgaatcctcctcttccaccacccctctcctggctgccactgtccttgcctccacac
caccaggcgccaccgccgctgctgctgctgctggaatgggaccgaggcccatggcaggatccactgacca
gattgcacatttacggccgcagactcgccccagtgtgtatgttgctatatatccatacactcctcggaaa
gaggatgaactagagctgagaaaaggggagatgtttttagtgtttgagcgctgccaggatggctggttca
aagggacatccatgcataccagcaagataggggttttccctggcaattatgtggcaccagtcacaagggc
ggtgacaaatgcttcccaagctaaagtccctatgtctacagctggccagacaagtcggggagtgaccatg
gtcagtccttccacggcaggagggcctgcccagaagctccagggaaatggcgtggctgggagtcccagtg
ttgtccccgcagctgtggtatcagcagctcacatccagacaagtcctcaggctaaggtcttgttgcacat
gacggggcaaatgacagtcaaccaggcccgcaatgctgtgaggacagttgcagcgcacaaccaggaacgc
cccacggcagcagtgacacccatccaggtacagaatgccgccggcctcagccctgcatctgtgggcctgt
cccatcactcgctggcctccccacaacctgcgcctctgatgccaggctcagccacgcacactgctgccat
cagtatcagtcgagccagtgcccctctggcctgtgcagcagctgctccactgacttccccaagcatcacc
agtgcttctctggaggctgagcccagtggccggatagtgaccgttctccctggactccccacatctcctg
acagtgcttcatcagcttgtgggaacagttcagcaaccaaaccagacaaggatagcaaaaaagaaaaaaa
gggtttgttgaagttgctttctggcgcctccactaaacggaagccccgcgtgtctcctccagcatcgccc
accctagaagtggagctgggcagtgcagagcttcctctccagggagcggtggggcccgaactgccaccag
gaggtggccatggcagggcaggctcctgccctgtggacggggacggaccggtcacgactgcagtggcagg
agcagccctggcccaggatgcttttcataggaaggcaagttccctggactccgcagttcccatcgctcca
cctcctcgccaggcctgttcctccctgggtcctgtcttgaatgagtctagacctgtcgtttgtgaaaggc
acagggtggtggtttcctatcctcctcagagtgaggcagaacttgaacttaaagaaggagatattgtgtt
tgttcataaaaaacgagaggatggctggttcaaaggcacattacaacgtaatgggaaaactggccttttc
ccaggaagctttgtggaaaacatatgaggagactgacactgaagaagcttaaaatcacttcacacaacaa
agtagcacaaagcagtttaacagaaagagcacatttgtggacttccagatggtcaggagatgagcaaagg
attggtatgtgactctgatgccccagcacagttaccccagcgagcagagtgaagaagatgtttgtgtggg
ttttgttagtctggattcggatgtataaggtgtgccttgtactgtctgatttactacacagagaaacttt
ttttttttttaagatatatgactaaaatggacaattgtttacaaggcttaactaatttatttgctttttt
taaacttgaacttttcgtataatagatacgttctttggattatgattttaagaaattattaatttatgaa
atgataggtaaggagaagctggattatctcctgttgagagcaagagattcgttttgacatagagtgaatg
catttcccctctcctcctccctgctaccattatattttggggttatgttttgcttctttaagatagaaa
tcccagttctctaatttggttttcttctttgggaaaccaaacatacaaatgaatcagtatcaattagggc
ctggggtagagagacagaaacttgagagaagagaagttagtgattccctctctttctagtttggtaggaa
tcaccctgaagacctagtcctcaatttaattgtgtgggtttttaattttcctagaatgaagtgactgaaa
caatgagaaagaatacagcacaacccttgaacaaaatgtatttagaaatatatttagttttatagcagaa
gcagctcaattgtttggttggaaagtaggggaaattgaagttgtagtcactgtctgagaatggctatgaa
gcgtcatttcacattttaccccaactgacctgcatgcccaggacacaagtaaaacatttgtgagatagtg
gtggtaagtgatgcactcgtgttaagtcaaaggctataagaaacactgtgaaaagttcatattcatccat
tgtgattctttccccacgtcttgcatgtattactggattcccacagtaatatagactgtgcatggtgtgt
atatttcattgcgatttcctgttaagatgagtttgtactcagaattgaccaattcaggaggtgtaaaaat
aaacagtgttctcttctctaccccaaagccactactgaccaaggtctcttcagtgcactcgctccctctc
tggctaaggcatgcattagccactacacaagtcattagtgaaagtggtcttttatgtcctcccagcagac
agacatcaaggatgagttaaccaggagactactcctgtgactgtggagctctggaaggcttggtgggagt
gaatttgcccacaccttacaattgtggcaggatccagaagagcctgtctttttatatccattccttgatg
tcattggcctctcccaccgatttcattacggtgccacgcagtcatggatctgggtagtccggaaaacaaa
aggagggaagacagcctggtaatgaataagatccttaccacagttttctcatgggaaatacataataaac
cctttcatctttttttttttccttaagaattaaaactgggaaatagaaacatgaactgaaaagtcttgc
aatgacaagaggtttcatggtcttaaaaagatactttatatggttgaagatgaaatcattcctaaattaa
cctttttttaaaaaaaaacaatgtatattatgttcctgtgtgttgaatttaaaaaaaaaaaatacttta
cttggatattcatgtaatatataaaggtttggtgaaatgaactttagttaggaaaaagctggcatcagct

ttcatctgtgtaagttgacaccaatgtgtcataatattctttattttgggaaattagtgtattttataaa
aattttaaaaagaaaaaagactactacaggttaagataatttttttacctgtcttttctccatattttaa
gctatgtgattgaagtacctctgttcatagtttcctggtataaagttggttaaaatttcatctgttaata
gatcattaggtaatataatgtatgggttttctattggttttttgcagacagtagagggagattttgtaac
aagggcttgttacacagtgatatggtaatgataaaattgcaatttatcactccttttcatgttaataatt
tgaggactggataaaaggtttcaagattaaaatttgatgttcaaacctttgt

Figur 7: C-Terminus Proteinfragment von hPOSH (öffentl. gi: 7959249; SEQ ID NO: 7)

ISYVEFNSAAKQLIEWDKPPVPGVDAGECSSAAAQSSTAPKHSDTKKNTKKRHSFTSLTMANKSSQASQN
RHSMEISPPVLISSSNPTAAARISELSGLSCSAPSQVHISTTGLIVTPPPSSPVTTGPSFTFPSDVPYQA
ALGTLNPPLPPPPLLAATVLASTPPGATAAAAAAGMGPRPMAGSTDQIAHLRPQTRPSVYVAIYPYTPRK
EDELELRKGEMFLVFERCQDGWFKGTSMHTSKIGVFPGNYVAPVTRAVTNASQAKVPMSTAGQTSRGVTM
VSPSTAGGPAQKLQGNGVAGSPSVVPAAVVSAAHIQTSPQAKVLLHMTGQMTVNQARNAVRTVAAHNQER
PTAAVTPIQVQNAAGLSPASVGLSHHSLASPQPAPLMPGSATHTAAISISRASAPLACAAAAPLTSPSIT
SASLEAEPSGRIVTVLPGLPTSPDSASSACGNSSATKPDKDSKKEKKGLLKLLSGASTKRKPRVSPPASP
TLEVELGSAELPLQGAVGPELPPGGGHGRAGSCPVDGDGPVTTAVAGAALAQDAFHRKASSLDSAVPIAP
PPRQACSSLGPVLNESRPVVCERHRVVVSYPPQSEAELELKEGDIVFVHKKREDGWFKGTLQRNGKTGLF
PGSFVENI

Figur 8: Gesamte menschliche POSH-mRNA, vermerkte Sequenz

---- - gi|10432611|dbj|AK021429.1|AK021429 Homo sapiens cDNA FLJ11367 fis, Clone HEMBA1000303, sehr ähnlich zu Mus musculus. Viel SH3s (POSH) mRNA

---- - gi|7959248|dbj|AB040927.1|AB040927 Homo sapiens mRNA für KIAA1494 Protein, teilweise cds

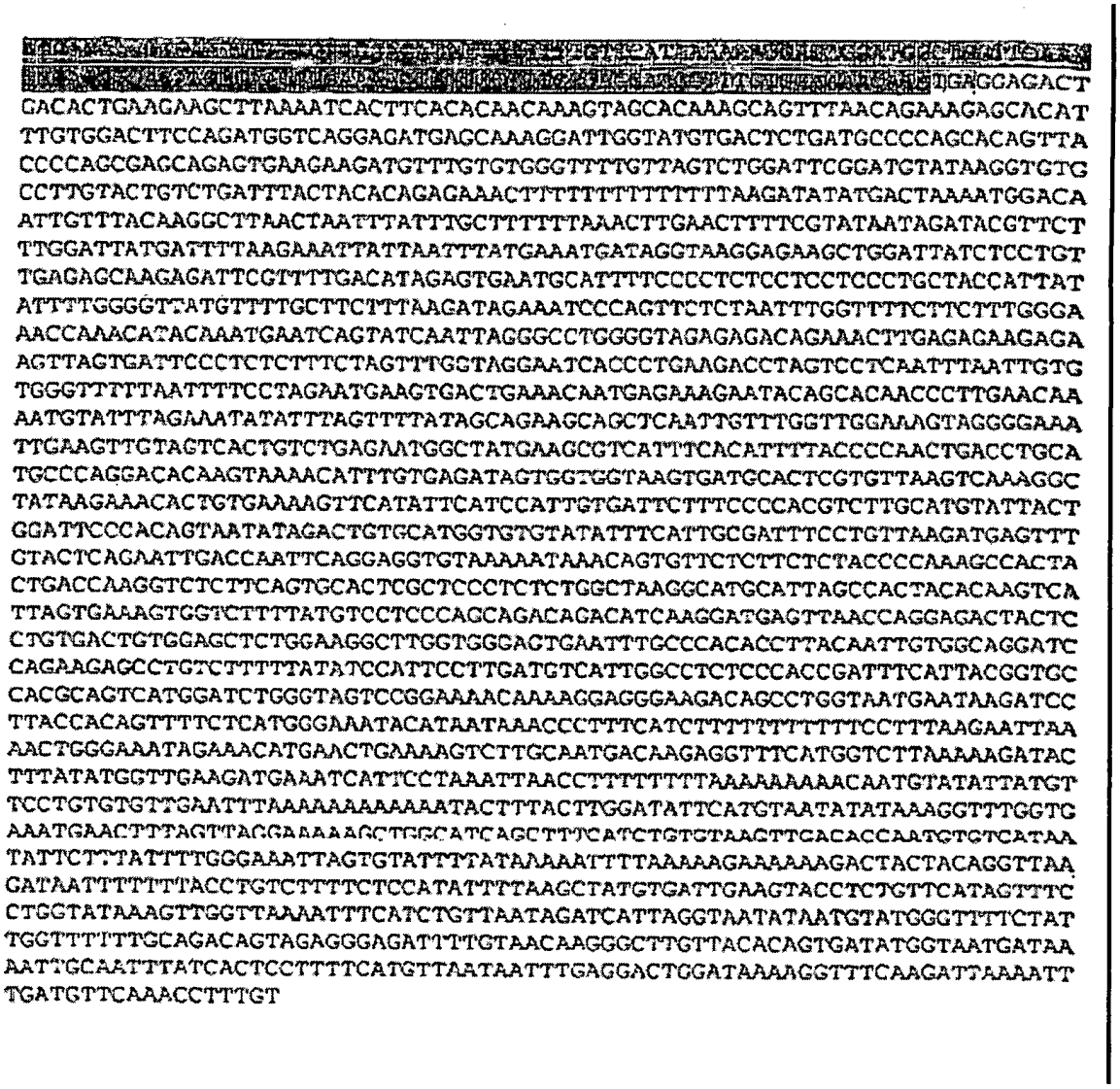
---- - Sowohl hPOSH als auch KIAA1495

- Ring-Domäne

- SH3-Domäne

- Start-Codon und Stopp-Codon von vorausgesagtem offenen Leserahmen

CTGAGAGACACTGCGAGCGGCGAGCGCGGTGGGGCCGCATCTGCATCAGCCGCCGCAGCCGCTGCGGGGC
CGCGAACAAAGAGGAGGAGCCGAGGCGCGAGAGCAAAGTCTGAAATGGATGTTACATGAGTCATTTTAAG
GGATGCACACAACTATGAACATTTCTGAAGATTTTTTCTCAGTAAAGTAGATAAAG[redacted]GATGAATCAGC
CTTGTTGGATCTTTTGGAG[redacted]
[redacted]
GCAGGACTCTTGTTGGCTCGGGTGTCGAGGAGCTTCCCAGTAACATCTTGCTGGTCAGACTTCTGGATGG
CATCAAACAGAGGCCTTGGAAACCTGGTCCTGGTGGGGGAAGTGGGACCAACTGCACAAATGCATTAAGG
TCTCAGAGCAGCACTGTGGCTAATTGTAGCTCAAAAGATCTGCAGAGCTCCCAGGGCGGACAGCAGCCTC
GGGTGCAATCCTGGAGCCCCCCAGTGAGGGGTATACCTCAGTTA[redacted]
[redacted]
[redacted]
AACCGTTACCTCAGCCCCCA[redacted]
[redacted]
[redacted]TCGGCTGCTAAGC
AGCTGATAGAATGGGATAAGCCTCCTGTGCCAGGAGTTGATGCTGGAGAATGTTCCTCGGCAGCAGCCCA
GAGCAGCACTGCCCCAAAGCACTCCGACACCAAGAAGAACACCAAAAAGCGGCACTCCTTCACTTCCCTC
ACTATGGCCAACAAGTCCTCCCAGGCATCCCAGAACCGCCACTCCATGGAGATCAGCCCCCCTGTCCTCA
TCAGCTCCAGCAACCCCACTGCTGCTGCACGGATCAGCGAGCTGTCTGGGCTCTCCTGCAGTGCCCCTTC
TCAGGTTCATATAAGTACCACCGGGTTAATTGTGACCCCGCCCCCAAGCAGCCCAGTGACAACTGGCCCC
TCGTTTACTTTCCCATCAGATGTTCCCTACCAAGCTGCCCTTGGAACTTTGAATCCTCCTCTTCCACCAC
CCCCTCTCCTGGCTGCCACTGTCCTTGCCTCCACACCACCAGGCGCCACCGCCGCCGCTGCTGCTGCTGG
AATGGGACCGAGGCCCATGGCAGGATCCACTGACCAGATTGCACATTTACGGCCGCAGACTCGCCCC[redacted]
[redacted]
[redacted]ACAAGGGCGGTGACAAATGCTTCCCAAGCTAAAGTCCCTATG
TCTACAGCTGGCCAGACAAGTCGGGGAGTGACCATGGTCAGTCCTTCCACGGCAGGAGGGCCTGCCCAGA
AGCTCCAGGGAAATGGCGTGGCTGGGAGTCCCAGTGTTGTCCCCGCAGCTGTGGTATCAGCAGCTCACAT
CCAGACAAGTCCTCAGGCTAAGGTCTTGTTGCACATGACGGGGCAAATGACAGTCAACCAGGCCCCGCAAT
GCTGTGAGGACAGTTGCAGCGCACAACCAGGAACGCCCCACGGCAGCAGTGACACCCATCCAGGTACAGA
ATGCCGCCGGCCTCAGCCCTGCATCTGTGGGCCTGTCCCATCACTCGCTGGCCTCCCCACAACCTGCGCC
TCTGATGCCAGGCTCAGCCACGCACACTGCTGCCATCAGTATCAGTCGAGCCAGTGCCCCTCTGGCCTGT
GCAGCAGCTGCTCCACTGACTTCCCCAAGCATCACCAGTGCTTCTCTGGAGGCTGAGCCCAGTGGCCGGA
TAGTGACCGTTCTCCCTGGACTCCCCACATCTCCTGACAGTGCTTCATCAGCTTGTGGGAACAGTTCAGC
AACCAAACCAGACAAGGATAGCAAAAAAGAAAAAAAGGGTTTGTTGAAGTTGCTTTCTGGCGCCTCCACT
AAACGGAAGCCCCGCGTGTCTCCTCCAGCATCGCCCACCCTAGAAGTGGAGCTGGGCAGTGCAGAGCTTC
CTCTCCAGGGAGCGGTGGGGCCCGAACTGCCACCAGGAGGTGGCCATGGCAGGGCAGGCTCCTGCCCTGT
GGACGGGGACGGACCGGTCACGACTGCAGTGGCAGGAGCAGCCCTGGCCCAGGATGCTTTTCATAGGAAG
GCAAGTTCCCTGGACTCCGCAGTTCCCATCGCTCCACCTCCTCGCCAGGCCTGTTCCTCCCTGGGTCCTG
TCTTGAATGAGTCTAGACCTGTCGTTTGT[redacted]

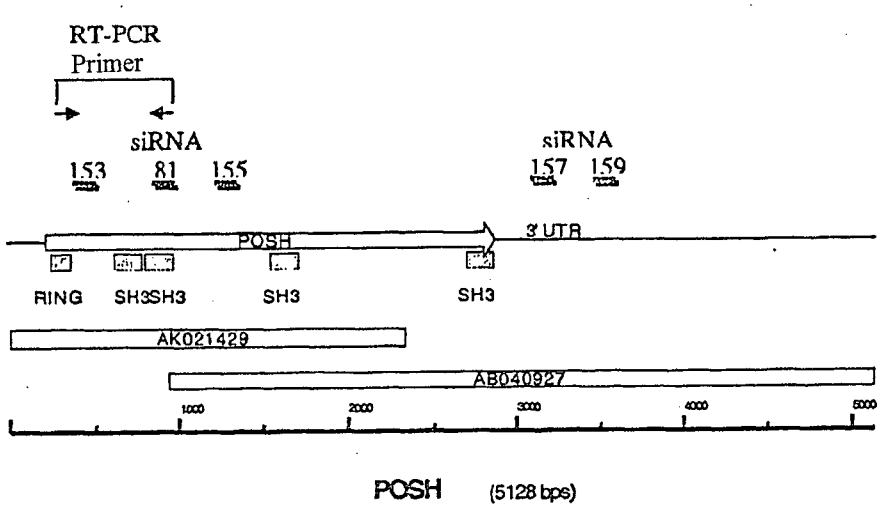


GACACTGAAGAAGCTTAAAATCACTTCACACAACAAAGTAGCACAAAGCAGTTTAACAGAAAGAGCACAT
TTGTGGACTTCCAGATGGTCAGGAGATGAGCAAAGGATTGGTATGTGACTCTGATGCCCCAGCACAGTTA
CCCCAGCGAGCAGAGTGAAGAAGATGTTTGTGTGGGTTTTGTTAGTCTGGATTCGGATGTATAAGGTGTG
CCTTGTACTGTCTGATTTACTACACAGAGAAACTTTTTTTTTTTTTTAAGATATATGACTAAAATGGACA
ATTGTTTACAAGGCTTAACTAATTTATTTGCTTTTTTAAACTTGAACTTTTCGTATAATAGATACGTTCT
TTGGATTATGATTTTAAGAAATTATTAATTTATGAAATGATAGGTAAGGAGAAGCTGGATTATCTCCTGT
TGAGAGCAAGAGATTCGTTTTGACATAGAGTGAATGCATTTTCCCCTCTCCTCCTCCCTGCTACCATTAT
ATTTTGGGGTTATGTTTTGCTTCTTTAAGATAGAAATCCCAGTTCTCTAATTTGGTTTTCTTCTTTGGGA
AACCAAACATACAAATGAATCAGTATCAATTAGGGCCTGGGGTAGAGAGACAGAAACTTGAGAGAAGAGA
AGTTAGTGATTCCCTCTCTTTCTAGTTTGGTAGGAATCACCCTGAAGACCTAGTCCTCAATTTAATTGTG
TGGGTTTTTAATTTTCCTAGAATGAAGTGACTGAAACAATGAGAAAGAATACAGCACAACCCTTGAACAA
AATGTATTTAGAAATATATTTAGTTTTATAGCAGAAGCAGCTCAATTGTTTGGTTGGAAAGTAGGGGAAA
TTGAAGTTGTAGTCACTGTCTGAGAATGGCTATGAAGCGTCATTTCACATTTTACCCCAACTGACCTGCA
TGCCCAGGACACAAGTAAAACATTTGTGAGATAGTGGTGGTAAGTGATGCACTCGTGTTAAGTCAAAGGC
TATAAGAAACACTGTGAAAAGTTCATATTCATCCATTGTGATTCTTTCCCCACGTCTTGCATGTATTACT
GGATTCCCACAGTAATATAGACTGTGCATGGTGTGTATATTTCATTGCGATTTCCTGTTAAGATGAGTTT
GTACTCAGAATTGACCAATTCAGGAGGTGTAAAAATAAACAGTGTTCTCTTCTCTACCCCAAAGCCACTA
CTGACCAAGGTCTCTTCAGTGCACTCGCTCCCTCTCTGGCTAAGGCATGCATTAGCCACTACACAAGTCA
TTAGTGAAAGTGGTCTTTTATGTCCTCCCAGCAGACAGACATCAAGGATGAGTTAACCAGGAGACTACTC
CTGTGACTGTGGAGCTCTGGAAGGCTTGGTGGGAGTGAATTTGCCCACACCTTACAATTGTGGCAGGATC
CAGAAGAGCCTGTCTTTTTATATCCATTCCTTGATGTCATTGGCCTCTCCCACCGATTTCATTACGGTGC
CACGCAGTCATGGATCTGGGTAGTCCGGAAAACAAAAGGAGGGAAGACAGCCTGGTAATGAATAAGATCC
TTACCACAGTTTTCTCATGGGAAATACATAATAAACCCTTTCATCTTTTTTTTTTTCCTTTAAGAATTAA
AACTGGGAAATAGAAACATGAACTGAAAAGTCTTGCAATGACAAGAGGTTTCATGGTCTTAAAAAGATAC
TTTATATGGTTGAAGATGAAATCATTCCTAAATTAACCTTTTTTTTTAAAAAAAAACAATGTATATTATGT
TCCTGTGTGTTGAATTTAAAAAAAAAAAATACTTTACTTGGATATTCATGTAATATATAAAGGTTTGGTG
AAATGAACTTTAGTTAGGAAAAAGCTGGCATCAGCTTTCATCTGTGTAAGTTCACACCAATGTGTCATAA
TATTCTTTATTTTGGGAAATTAGTGTATTTTATAAAAATTTTAAAAAGAAAAAAGACTACTACAGGTTAA
GATAATTTTTTTACCTGTCTTTTCTCCATATTTTAAGCTATGTGATTGAAGTACCTCTGTTCATAGTTTC
CTGGTATAAAGTTGGTTAAAATTTCATCTGTTAATAGATCATTAGGTAATATAATGTATGGGTTTTCTAT
TGGTTTTTTGCAGACAGTAGAGGGAGATTTTGTAACAAGGGCTTGTTACACAGTGATATGGTAATGATAA
AATTGCAATTTATCACTCCTTTTCATGTTAATAATTTGAGGACTGGATAAAAGGTTTCAAGATTAAAATT
TGATGTTCAAACCTTTGT

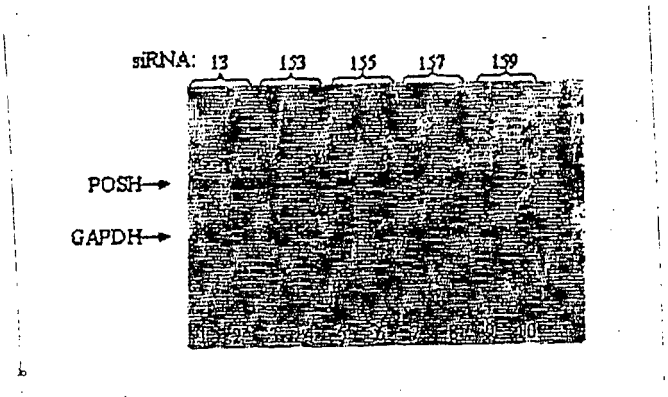
Figur 9: Domänenanalyse von menschlichem POSH

Domänenname	Beginn	Ende	E-Wert
RING	12	52	1.06e-08
SH3	137	192	2.76e-19
SH3	199	258	4.84e-15
niedrige Komplexität	366	384	-
niedrige Komplexität	390	434	-
SH3	448	505	2.40e-19
niedrige Komplexität	547	563	-
niedrige Komplexität	652	668	-
niedrige Komplexität	705	729	-
SH3	832	888	1.47e-14

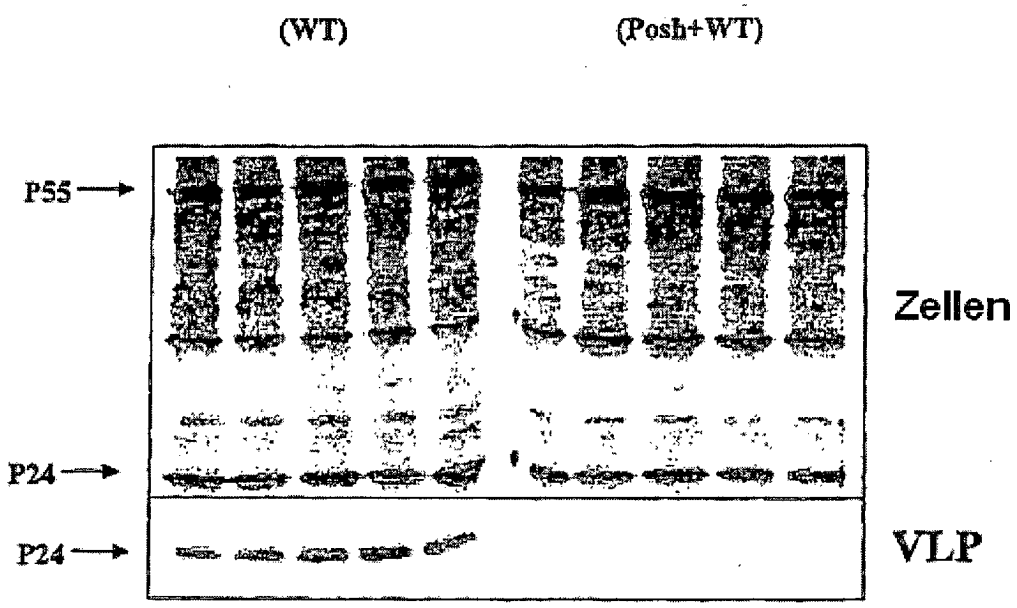
Figur 10: Diagramm von menschlichen POSH-Nucleinsäuren



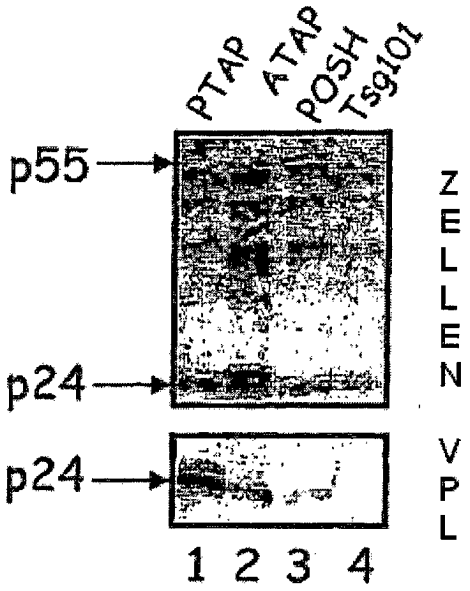
Figur 11: Reduktion in der Volllängen POSH-mRNA durch siRNA-Duplex



Figur 12: POSH beeinflusst die Freisetzung von VLP aus Zellen



Figur 13: Freisetzung von VLP aus Zellen in einem Ruhezustand



Figur 14: Maus-POSH mRNA-Sequenz (öffentl. gi: 10946921; SEQ ID NO: 8)

GGGCAGCGGGCTCGGCGGGGCTGCATCTACCAGCGCTGCGGGGCCGCGAACAAAGGCGAGCAGCGGAGGC
GCGAGAGCAAAGTCTGAAATGGATGTTACATGAATCACTTTAAGGGCTGCGCACAACTATGAACGTTCTG
AAGCCGTTTTCTCACTAAAGTCACTCAAGATGGATGAGTCTGCCTTGTTGGACCTTCTGGAGTGCCCTGT
GTGTCTAGAACGCCTGGATGCTTCCGCAAAGGTCTTACCCTGCCAGCATACCTTTTGCAAACGCTGTTTG
CTGGGGATTGTGGGTTCCCGGAATGAACTCAGATGTCCCGAATGCCGGACTCTTGTTGGCTCTGGGGTCG
ACGAGCTCCCCAGTAACATCCTACTGGTCAGACTTCTGGATGGCATCAAGCAGAGGCCTTGGAAACCCGG
CCCTGGTGGGGGCGGCGGGACCACCTGCACAAACACATTAAGGGCGCAGGGCAGCACTGTGGTTAATTGT
GGCTCGAAAGATCTGCAGAGCTCCCAGTGTGGACAGCAGCCTCGGGTGCAAGCCTGGAGCCCCCCAGTGA
GGGGAATACCTCAGTTACCGTGTGCCAAAGCATTATATAACTACGAAGGAAAAGAGCCCGGAGACCTTAA
GTTCAGCAAAGGCGACACCATCATTCTGCGCCGACAGGTGGATGAGAATTGGTACCACGGGGAAGTCAGC
GGGGTCCACGGCTTTTTCCCCACTAACTTCGTGCAGATCATCAAACCTTTACCTCAGCCCCCGCCTCAGT
GCAAAGCACTTTACGACTTTGAAGTGAAAGACAAGGAAGCTGACAAAGATTGCCTTCCCTTCGCAAAGGA
CGACGTACTGACCGTGATCCGCAGAGTGGATGAAAACTGGGCTGAAGGAATGCTGGCAGATAAAATAGGA
ATATTTCCAATTTCATACGTGGAGTTTAACTCAGCTGCCAAGCAGCTGATAGAGTGGGATAAGCCTCCCG
TGCCAGGAGTGGACACGGCAGAATGCCCCTCAGCGACGGCGCAGAGCACCTCTGCCTCAAAGCACCCCGA
CACCAAGAAGAACACCAGGAAGCGACACTCCTTCACCTCCCTCACCATGGCCAACAAGTCTTCCCAGGGG
TCCCAGAACCGCCACTCCATGGAGATCAGCCCTCCTGTGCTCATCAGTTCCAGCAACCCCACAGCCGCAG
CCCGCATCAGCGAACTGTCCGGGCTCTCCTGCAGCGCCCCGTCTCAGGTCCATATAAGCACCACTGGGTT
AATTGTGACCCCACCCCCTAGCAGCCCGGTGACAACTGGCCCTGCGTTCACGTTCCCTTCAGATGTCCCC
TACCAAGCTGCCCTTGGAAGTATGAATCCTCCACTTCCCCCACCCCCTCTCCTGGCGGCCACCGTACTCG
CCTCCACCCCGTCAGGCGCTACTGCTGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCCGCCGCCGCCGCTGCTGGAATGGG
ACCCAGGCCTGTGATGGGGTCCTCTGAACAGATTGCACATTTACGGCCTCAGACTCGTCCCAGTGTATAT
GTTGCTATATATCCGTACACTCCCCGGAAGGAAGACGAACTGGAGCTGAGGAAAGGGGAGATGTTTTTGG
TGTTTGAGCGTTGCCAGGACGGCTGGTACAAAGGGACATCGATGCATACCAGCAAGATAGGCGTTTTCCC
TGGCAACTATGTGGCGCCCGTCACAAGGGCGGTGACGAATGCCTCCCAAGCTAAAGTCTCTATGTCTACT
GCGGGTCAGGCAAGTCGCGGGGTGACCATGGTCAGCCCTTCCACTGCAGGAGGACCTACACAGAAGCCCC
AAGGAAACGGCGTGGCCGGAAATCCCAGCGTCGTCCCCACGGCTGTGGTGTCAGCAGCTCATATCCAGAC
AAGTCCTCAGGCTAAGGTCCTGCTGCACATGTCTGGGCAGATGACAGTCAATCAGGCCCGCAATGCTGTG
AGGACAGTTGCAGCACATAGCCAGGAACGCCCCACAGCAGCAGTGACTCCCATCCAGGTCCAGAATGCCG
CCTGCCTTGGTCCTGCATCCGTGGGCCTGCCCCATCATTCTCTGGCCTCCCAACCTCTGCCTCCAATGGC
GGGTCCTGCTGCCCACGGTGCTGCCGTCAGCATCAGTCGAACCAATGCCCCCATGGCCTGCGCTGCAGGG
GCTTCTCTGGCCTCCCCAAATATGACCAGTGCCATGTTGGAGACAGAGCCCAGTGGTCGCACAGTGACCA
TCCTCCCTGGACTCCCCACATCTCCAGAGAGTGCTGCATCAGCGTGTGGGAACAGTTCAGCTGGGAAACC
AGACAAGGACAGTAAGAAAGAAAAAAAGGGCCTACTGAAGCTGCTTTCTGGTGCCTCCACCAAACGCAAG
CCCCGAGTCTCCCCTCCAGCATCACCTACCCTGGATGTGGAGCTGGGTGCTGGGGAGGCTCCCTTGCAGG
GAGCAGTAGGTCCTGAGCTGCCGCTAGGGGGCAGCCACGGCAGAGTGGGGTCATGCCCCACAGATGGTGA
TGGTCCAGTGGCCGCTGGAACAGCAGCCCTAGCCCAGGATGCCTTCCACCGCAAGACAAGCTCCCTGGAC
TCCGCAGTGCCCATTGCTCCACCACCTCGCCAGGCCTGCTCCTCCCTGGGCCCAGTCATGAATGAGGCCC
GGCCTGTTGTTTGTGAAAGGCACAGGGTGGTGGTTTCCTACCCTCCTCAGAGTGAGGCCGAACTTGAACT
CAAGGAAGGAGATATTGTGTTTGTTCATAAGAAACGAGAGGACGGCTGGTTCAAAGGCACGTTACAGAGG
AATGGGAAGACTGGCCTTTTCCCAGGGAGCTTTGTGGAAAACATCTGAGAAGACGGGACACGGAGAAAGC
TTATCATCACACCACGTGTGACTAAAGAGCACAAAGCAGTTTCATAGAAAGAGCACATCTGTGGACTTCC
AGATCTTCAAGAACCGAGCAGAAGATGGGCACCTGACTCCAGAGCCCCGGCCTGGTTACCCCAGGGGCAG
AGGGAAGGAGGACACACCTGTGTGGGTTCCGTCTCTCTGGGTTCTGATGTGTAAAGTGTGCCTTGTAATG
TCTAATGGACTTTACAGATAAATGTCTTTTTTTTTTTAAGATGTATAACTAAAATGGACAATTGTTTACA
AGGCTTAACTAATTTATTTGCTTTTTTAAAACTTGAACTTTCTTGTAATAGCAAAT

Figur 15: Maus-POSH Protein-Sequenz (Offentl. gi: 10946922; SEQ ID NO:9)

MDESALLDLLECPVCLERLDASAKVLPCQHTFCKRCLLGIVGSRNELRCPECRTLVGSGVDELPSNILLV
RLLDGIKQRPWKPGPGGGGGTTCTNTLRAQGSTVVNCGSKDLQSSQCGQQPRVQAWSPPVRGIPQLPCAK
ALYNYEGKEPGDLKFSKGDTIILRRQVDENWYHGEVSGVHGFFPTNFVQIIKPLPQPPPQCKALYDFEVK
DKEADKDCLPFAKDDVLTVIRRVDENWAEGMLADKIGIFPISYVEFNSAAKQLIEWDKPPVPGVDTAECP
SATAQSTSASKHPDTKKNTRKRHSFTSLTMANKSSQGSQNRHSMEISPPVLISSSNPTAAARISELSGLS
CSAPSQVHISTTGLIVTPPPSSPVTTGPAFTFPSDVPYQAALGSMNPPLPPPPLLAATVLASTPSGATAA
VAAAAAAAAAAGMGPRPVMGSSEQIAHLRPQTRPSVYVAIYPYTPRKEDELELRKGEMFLVFERCQDGWY
KGTSMHTSKIGVFPGNYVAPVTRAVTNASQAKVSMSTAGQASRGVTMVSPSTAGGPTQKPQGNGVAGNPS
VVPTAVVSAAHIQTSPQAKVLLHMSGQMTVNQARNAVRTVAAHSQERPTAAVTPIQVQNAACLGPASVGL
PHHSLASQPLPPMAGPAAHGAAVSISRTNAPMACAAGASLASPNMTSAMLETEPSGRTVTILPGLPTSPE
SAASACGNSSAGKPDKDSKKEKKGLLKLLSGASTKRKPRVSPPASPTLDVELGAGEAPLQGAVGPELPLG
GSHGRVGSCPTDGDGPVAAGTAALAQDAFHRKTSSLDSAVPIAPPPRQACSSLGPVMNEARPVVCERHRV
VVSYPPQSEAELELKEGDIVFVHKKREDGWFKGTLQRNGKTGLFPGSFVENI

Figur 16: Drosophila melanogaster POSH mRNA-Sequenz (öffentl. gi: 17737480; SEQ ID NO: 10)

CATTTGTATCCGCTTGGCCACGAGCTTTGGCTGCACTTGGCAAACTTAATAAATTAAACATTGAATCCTG
CCTATTGCAACGATAATATAATCTGATTTAGTGCATTAAGAACGACAAGTAGCGATTATAATAGTAGATT
TTAGCATTTGAGCTAAATTTATTTCCCAACCGCGTCTTGGGATTGCGTATGCGTGAGCCAGTACCTGCAT
GTGTGTGTGTTTTGGAATGTGGCCCTGCACGAAATTCAAATAGTGACCATCCTTGAGATTTTGCATACTG
GCAAGATGGACGAGCACACGTTAAACGACCTGTTGGAGTGCTCCGTGTGTCTTGAGCGACTGGACACCAC
ATCGAAGGTGCTGCCATGCCAGCACACCTTCTGCCGCAAATGCTTGCAGGACATTGTGGCCAGTCAGCAC
AAGTTGCGATGCCCGGAGTGCCGCATCCTGGTCTCTTGCAAAATTGATGAGCTGCCTCCAAACGTCTTGC
TGATGCGAATCTTAGAAGGCATGAAACAAAATGCAGCAGCTGGCAAAGGAGAAGAAAAGGGAGAGGAGAC
TGAAACACAGCCGGAAAGGGCCAAACCTCAGCCGCCAGCGGAATCAGTGGCCCCGCCTGACAACCAACTA
CTCCAGCTGCAGTCACATCAGCAATCTCATCAGCCGGCTCGTCACAAGCAACGTCGATTTCTACTCCCCC
ACGCCTATGCCCTCTTTGACTTCGCCTCCGGTGAAGCCACCGATCTAAAGTTCAAGAAAGGGGATCTGAT
ACTGATCAAGCATCGCATCGACAACAACTGGTTTGTGGGTCAAGCGAATGGTCAGGAGGGCACATTTCCC
ATCAACTACGTCAAGGTATCGGTTCCGCTGCCCATGCCGCAGTGCATTGCCATGTATGACTTTAAGATGG
GGCCCAACGACGAGGAGGGATGCCTCGAATTTAAGAAAAGCACTGTAATACAGGTAATGCGCCGAGTTGA
TCATAATTGGGCAGAAGGACGAATTGGCCAGACCATCGGAATCTTTCCAATAGCATTCGTTGAGCTGAAT
GCAGCGGCCAAAAAGCTGTTGGACAGCGGGCTACACACCCATCCATTCTGCCATCCACCGAAGCAACAGG
GGCAGCGGGCCCTTCCTCCGGTTCCAGTTATTGATCCCACGGTGGTCACGGAATCCAGTTCGGGATCCTC
CAATTCCACGCCGGGCAGCAGCAATTCAAGCTCCACATCCAGCTCGAATAACTGCAGTCCGAATCACCAA
ATCTCACTGCCGAATACCCCCCAACATGTAGTAGCTTCCGGATCGGCGTCTGTTCGTTTCCGTGACAAGG
GAGCAAAGGAGAAACGCCACTCACTAAATGCTTTGCTGGGAGGAGGAGCTCCATTAAGTCTGCTGCAGAC
CAACCGCCATTCGGCTGAAATTCTTAGCCTGCCCCATGAACTAAGCCGCTTGGAAGTTTCCAGCTCAACA
GCTCTAAAACCCACGTCAGCCCCACAGACATCGCGTGTACTTAAGACCACTGTTCAGCAGCAGATGCAAC
CGAATTTACCCTGGGGATACTTAGCCCTGTTCCCATACAAACCACGCCAAACGGATGAGCTGGAATTAAA
AAAGGGTTGTGTTTACATTGTGACCGAACGATGTGTGGACGGTTGGTTCAAGGGAAAAAACTGGTTGGAC
ATCACTGGAGTGTTCCCGGGCAACTACCTGACGCCCCTGCGCGCCCGCGACCAGCAGCAGTTAATGCATC
AATGGAAATATGTTCCCCAAAATGCAGACGCCCAGATGGCACAAGTACAGCAGCATCCAGTTGCACCAGA
TGTGCGACTCAACAACATGCTGTCCATGCAACCGCCTGATTTGCCACCTCGTCAGCAGCAGGCTACCGCC
ACGACCACCAGTTGCTCTGTGTGGTCGAAACCAGTGGAGGCGCTGTTCAGCAGAAAATCGGAGCCCAAGC
CTGAAACTGCCACAGCTTCGACTACGAGCAGCAGTTCCTCTGGAGCAGTGGGACTTATGAGGAGATTAAC
TCACATGAAAACACGCTCCAAATCTCCGGGAGCGTCCTTGCAGCAAGTTCCGAAAGAAGCTATTAGCACA
AATGTGGAATTTACAACAAACCCATCAGCTAAATTGCATCCAGTACATGTAAGATCCGGCTCGTGCCCCA
GTCAGCTGCAGCACAGTCAACCGCTCAATGAAACTCCAGCAGCCAAGACAGCGGCACAACAACAGCAGTT
CCTACCCAAGCAGCTGCCTTCCGCTTCTACGAACAGCGTTTCGTACGGATCGCAACGCGTGAAAGGAAGC
AAGGAACGTCCTCACTTGATTTGCGCGAGACAATCATTAGATGCAGCTACATTTCGCAGTATGTACAACA
ATGCCGCGTCGCCGCCGCCACCTACTACTTCCGTGGCCCCAGCTGTCTACGCCGGCGGTCAGCAACAGGT
GATTCCTGGAGGTGGAGCGCAATCCCAGTTGCATGCCAATATGATTATTGCACCCAGCCATCGGAAGTCG
CACAGCCTAGATGCGAGTCATGTGCTGAGTCCCAGCAGCAATATGATCACGGAGGCGGCCATTAAGGCCA
GCGCCACCACTAAGTCTCCTTACTGCACGAGGGAAAGTCGATTCCGCTGCATTGTGCCGTATCCACCAAA
CAGTGACATTGAACTAGAGCTACATTTGGGCGACATTATCTACGTCCAGCGGAAGCAGAAGAACGGCTGG
TATAAGGGCACCCATGCCCGTACCCACAAAACCGGGCTGTTCCCCGCCTCCTTTGTTGAACCGGATTGTT
AGGAAAGTTATGGTTCAAACTAGAATTTATTAAGCGAAATTCCAAATTACTTGTCTAAAAGGATTCAATC
GTCGGTCTATTCGGGCTTCCAAATACGCAATCTCATATTTCTCTTTTCAAAAAAGAAACCGTTTTGTACT
CTTCCAATCGAATGGGCAGCTCGCCGTTGTACTTTTTTATACAATGCTTGATCAAAATAGGCTAGCCATG
TAAGACTTAGGGAACAGTTACTTAAGCCTTAGCGATTAGTTAGCTAGAGAAATAATCTAACCGATCCTTG
TGCCCTCTACAAAGTTATTTGTAATATACGATACTCAGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figur 17: Drosphila melanogaster POSH-Proteinsequenz (öffentl. gi: 17737481; SEQ ID NO: 11)

MDEHTLNDLLECSVCLERLDTTSKVLPCQHTFCRKCLQDIVASQHKLRCPECRILVSCKIDELPPNVLLM
RILEGMKQNAAAGKGEEKGEETETQPERAKPQPPAESVAPPDNQLLQLQSHQQSHQPARHKQRRFLLPHA
YALFDFASGEATDLKFKKGDLILIKHRIDNNWFVGQANGQEGTFPINYVKVSVPLPMPQCIAMYDFKMGP
NDEEGCLEFKKSTVIQVMRRVDHNWAEGRIGQTIGIFPIAFVELNAAAKKLLDSGLHTHPFCHPPKQQGQ
RALPPVPVIDPTVVTESSSGSSNSTPGSSNSSSTSSSNNCSPNHQISLPNTPQHVVASGSASVRFRDKGA
KEKRHSLNALLGGGAPLSLLQTNRHSAEILSLPHELSRLEVSSSTALKPTSAPQTSRVLKTTVQQQMQPN
LPWGYLALFPYKPRQTDELELKKGCVYIVTERCVDGWFKGKNWLDITGVFPGNYLTPLRARDQQQLMHQW
KYVPQNADAQMAQVQQHPVAPDVRLNNMLSMQPPDLPPRQQQATATTTSCSVWSKPVEALFSRKSEPKPE
TATASTTSSSSSGAVGLMRRLTHMKTRSKSPGASLQQVPKEAISTNVEFTTNPSAKLHPVHVRSGSCPSQ
LQHSQPLNETPAAKTAAQQQQFLPKQLPSASTNSVSYGSQRVKGSKERPHLICARQSLDAATFRSMYNNA
ASPPPPTTSVAPAVYAGGQQQVIPGGGAQSQLHANMIIAPSHRKSHSLDASHVLSPSSNMITEAAIKASA
TTKSPYCTRESRFRCIVPYPPNSDIELELHLGDIIYVQRKQKNGWYKGTHARTHKTGLFPASFVEPDC

Figur 18: POSH-Domänen-Analyse

hPOSH-Proteinsequenz:

N-Terminus Proteinfragment von hPOSH (öffentl. gi: 10432612):

C-Terminus Proteinfragment von hPOSH (öffentl. gi: 7959249):

Maus-POSH Proteinsequenz (öffentl. gi: 10946922):

Drosophila melanogaster POSH-Proteinsequenz (öffentl. gi: 17737481)

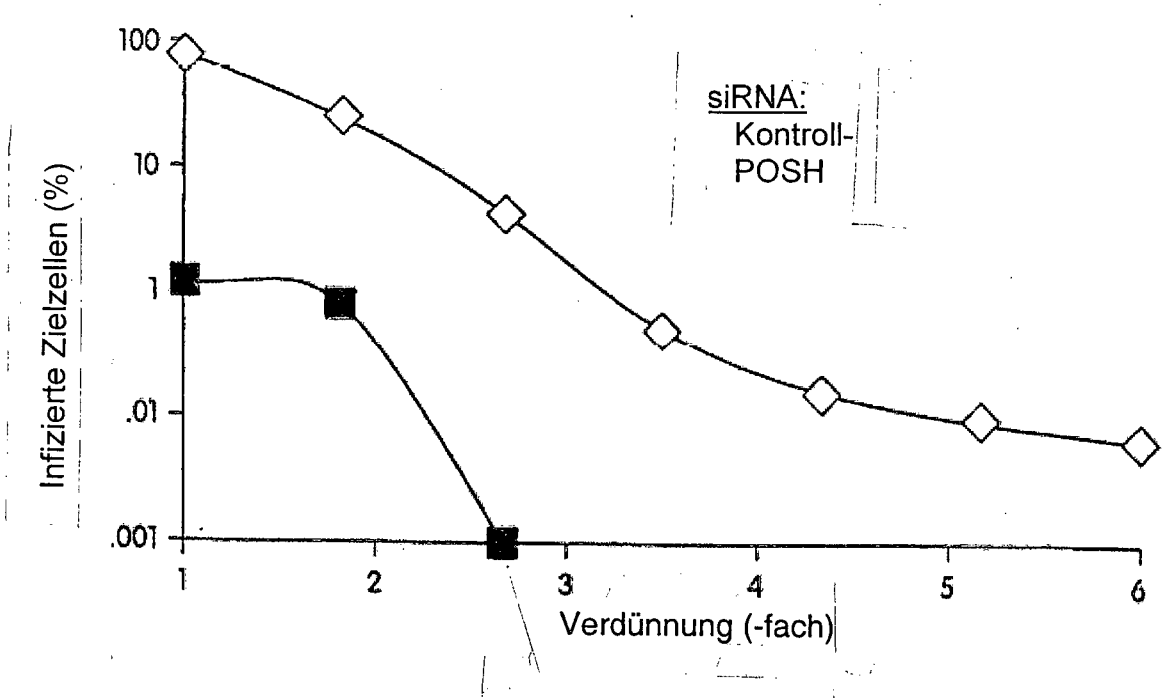
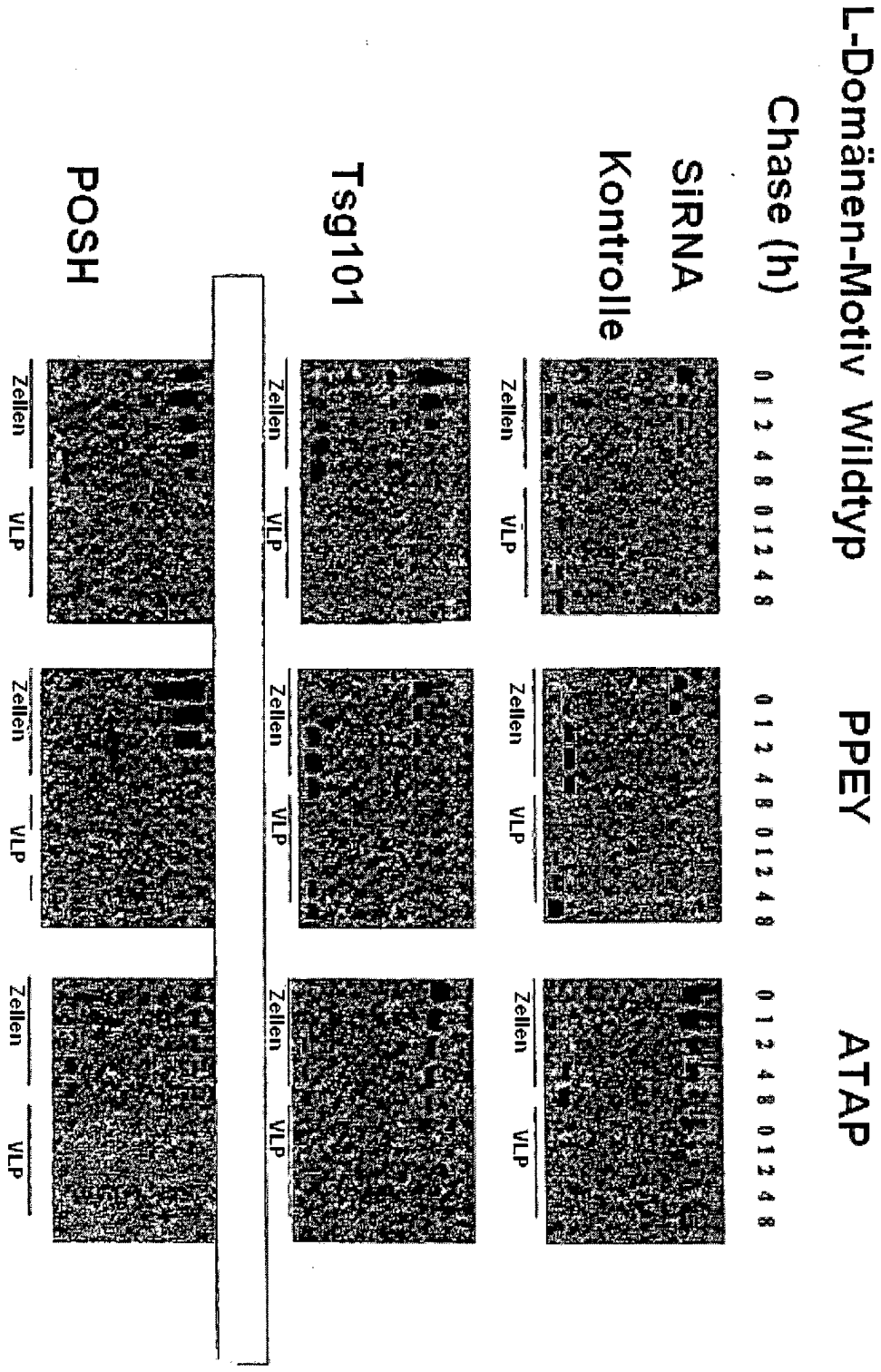
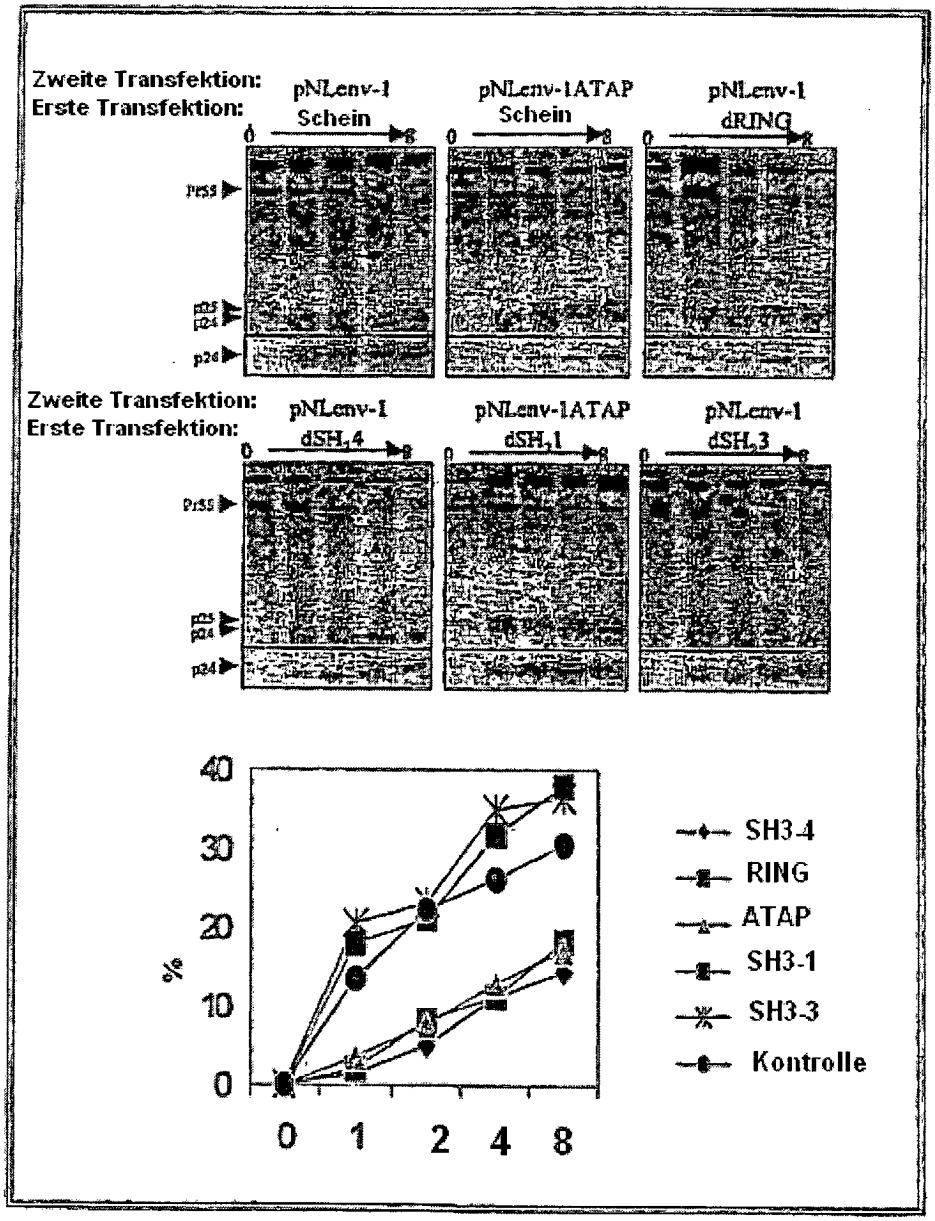

100
10
1
.01
.001
Infizierte Zielzellen (%)
siRNA:
Kontroll-
POSH
1
2
3
4
5
6
Verdünnung (-fach)

Fig. 19

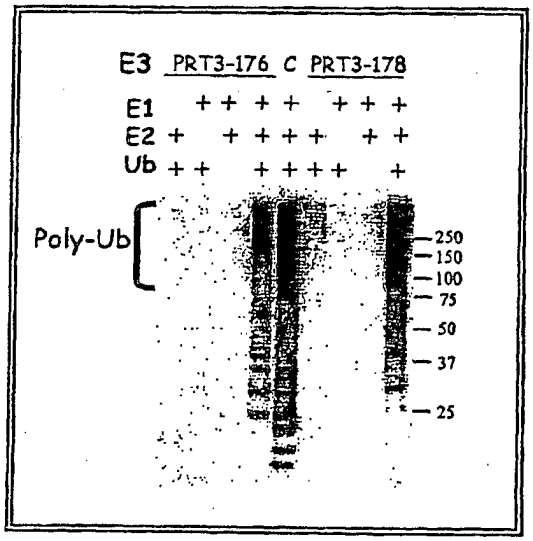

L-Domänen-Motiv Wildtyp
PPEY
ATAP
Chase (h)
0 1 2 4 8 0 1 2 4 8
0 1 2 4 8 0 1 2 4 8
0 1 2 4 8 0 1 2 4 8
SiRNA
Kontrolle
Tsg101
POSH
Zellen
VLP

Figur 20


Zweite Transfektion:
Erste Transfektion:
pNLenv-1
Schein
pNLenv-1ATAP
Schein
pNLenv-1
dRING
0
8
Pr55
p24
p24
Zweite Transfektion:
Erste Transfektion:
pNLenv-1
dSH3,4
pNLenv-1ATAP
dSH3,1
pNLenv-1
dSH3,3
Pr55
p24
p24
40
30
20
10
0
%
0 1 2 4 8
SH3-4
RING
ATAP
SH3-1
SH3-3
Kontrolle

Figur 21

Figur 22: menschliche POSH-Copräzipitate mit Rac 1



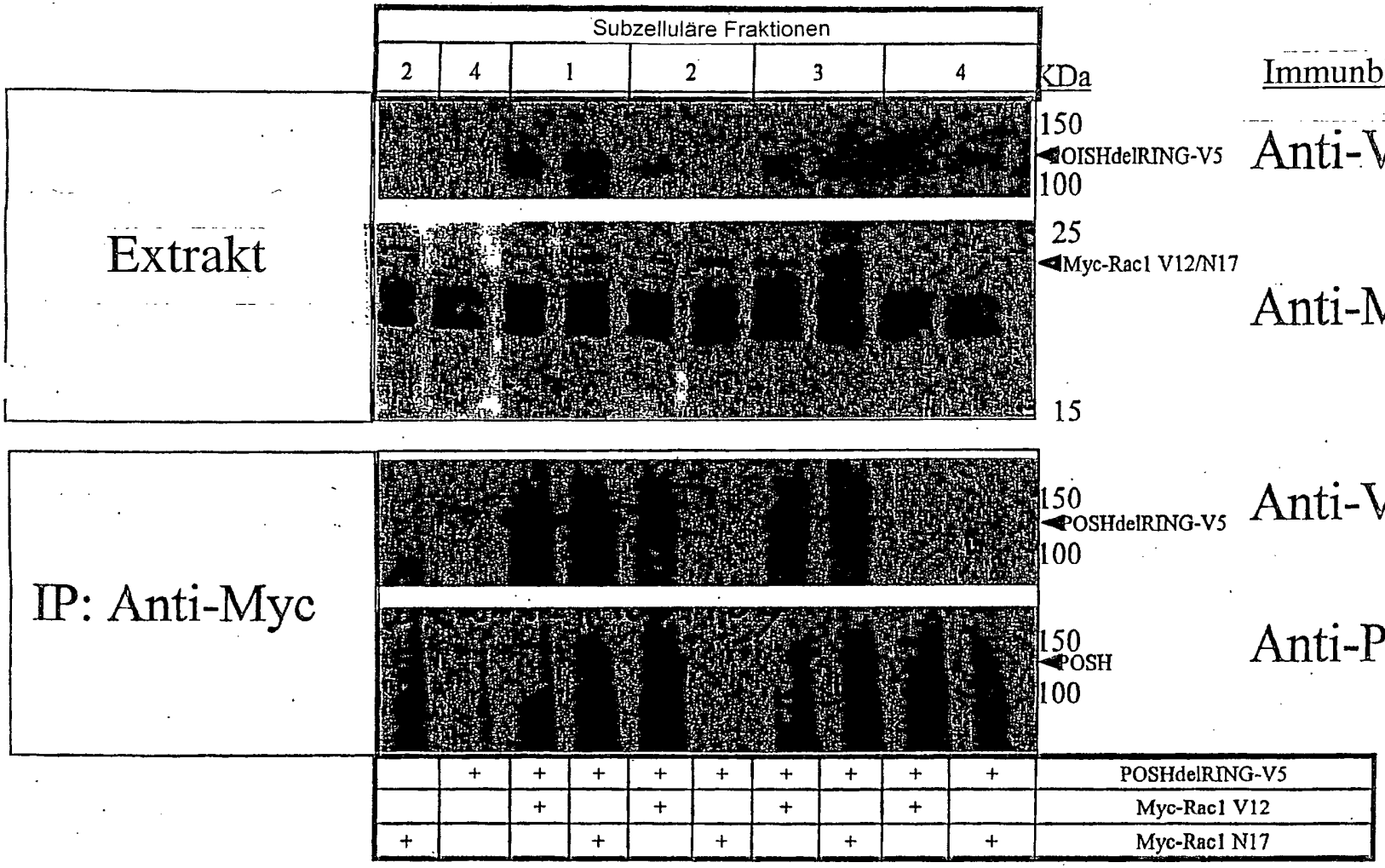
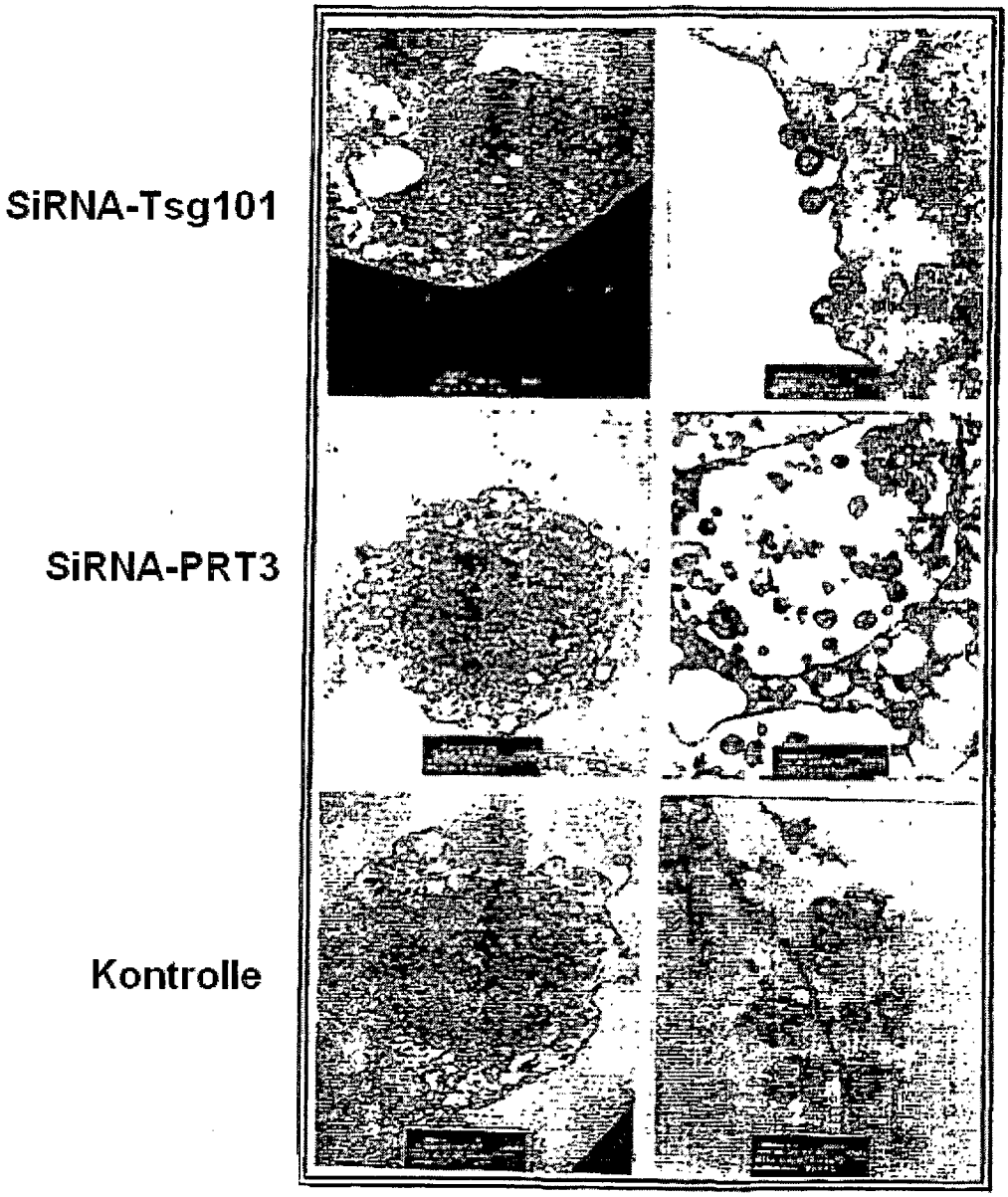

Subzelluläre Fraktionen
2
4
1
2
3
4
KDa
Immunblot
Extrakt
150
OISHdelRING-V5
100
Anti-V5
25
Myc-Rac1 V12/N17
Anti-Myc
15
IP: Anti-Myc
150
POSHdelRING-V5
100
Anti-V5
150
POSH
100
Anti-POSH
POSHdelRING-V5
Myc-Rac1 V12
Myc-Rac1 N17

Figure 23

Figur 24: Knockdown von POSH schließt HIV-Viruspartikel in intrazelluläre Partikel



Figur 25: POSH liegt an zwei Stellen, eine am Nucleus und eine im Golgi (C). Nach der Transfektion mit HIV wird die Rekrutierung von POSH in den Golgi verstärkt (D).

