(19) 

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 962247 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 962247

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/12
C12N 15/13
C12N 1/08
C12N 5/06
C12N 5/16
C07K 14/47
C07K 16/18
A01K 67/00
A61K 38/17
A01N 43/04
A01N 63/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.11.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.05.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.07.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.11.1994 PCT/US1994/013930**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

30.11.1993 US 160067 07.10.1994 US 320157

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •LXR Biotechnology Inc., 1401 Marina Way South Richmond, CA 94804, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kiefer, Michael C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Barr, Philip J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Uudet apoptoosia muuntavat proteiinit, niitä koodaava DNA ja näiden kä yttömenetelmät

Nya apoptosmodulerande proteiner, DNA vilket kodar dessa proteiner sam t förfarande för användning av dessa

UUSIA APOPTOOSIA MODULOIVIA PROTEIINEJA, DNA, JOKA KOODAA PROTEIINEJA, JA NIIDEN KÄYTTÖMENETELMIÄ

Tämä on continuation-in-part-hakemus US-patenttihakemuksesta sarjanro 08/320 157, joka on continuation-in-part-hakemus US-patenttihakemuksesta sarjanro 08/160 067, joka on jätetty 30.11.1993.

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee uusia proteiineja, joilla on apoptoosia säätävä aktiivisuus, rekombinantti DNA:ta, joka koodaa proteiineja, koostumuksia, jotka sisältävät proteiineja, ja niiden käyttömenetelmiä.

Keksinnön taustaa

Apoptoosi on normaali fysiologinen prosessi, joka johtaa yksittäisen solun kuolemaan. Tämä ohjelmoidun solukuoleman prosessi liittyy erilaisiin normaaleihin ja patogeenisiin biologisiin tapahtumiin ja se voidaan aiheuttaa lukuisilla erillisillä ärsykkeillä. Muutoksia apoptoosin biologisessa säätelyssä tapahtuu myös ikääntymisen aikana ja ne ovat vastuussa monista ikääntymiseen liittyvistä sairaustiloista ja sairauksista. Apoptoosin äskettäiset tutkimukset ovat viitanneet siihen, että yleinen metabolinen reitti, joka johtaa solukuolemaan, voidaan aloittaa lukuisilla erilaisilla signaaleilla, mukaan lukien hormonit, seerumin kasvutekijän puute, kemoterapeuttiset aineet, ionisoiva säteily ja infektio ihmisen immuunikatoviruksella (HIV). Wyllie (1980) Nature 284: 555-556; Kanter et al. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118:392-399; Duke ja Cohen (1986) Lymphokine Res. 5:289-299; Tomei et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:324-331; Kruman et al. (1991) J. Cell. Physiol. 148:267-273; Ameisen ja Capron (1991) Immunology Today 12:102; ja Sheppard ja Ascher (1992) J. AIDS 5:143. Aineista, jotka säätävät apoptoosin biologista kontrollia on siten terapeuttista hyötyä lukuisissa erilaisissa sairaustiloissa.

Apoptoottiselle solukuolemalle on tunnusomaista solun kutistuminen, kromatiinikondensaatio, sytoplasminen

rakkulan muodostuminen, kasvanut membraaniläpäisevyys ja internukleosomaalinen DNA:n pilkkominen. Kerr et al. (1992) FASEB J. 6:2450; ja Cohen ja Duke (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:267. Rakkulat, pienet, membraanikapseloidut pallot, jotka puristuvat apoptoottisten solujen pinnasta, voivat jatkaa superoksidiradikaalien tuottamista, jotka vahingoittavat ympäröivää solukudosta ja voivat liittyä tulehduksellisiin prosesseihin.

Bcl-2 havaittiin yleisessä kromosomin translokaatiokohdassa t(14:18) follikulaarisissa lymfoomissa, mistä on tuloksena poikkeuksellinen bcl-2:n yli-ilmentyminen. Tsujimoto et al. (1984) Science 226:1097-1099; ja Cleary et al. (1986) Cell 47:19-28. Bcl-2:n normaali toiminta on apoptoosin ehkäisy; bcl-2:n säätelemättömän ilmentymisen B-soluissa uskotaan johtavan kasvaneeseen lukumäärään lisääntyviä B-soluja, mikä voi olla ratkaiseva tekijä lymfooman kehittymisessä. McDonnell ja Korsmeyer (1991) Nature 349:254-256; ja tarkastelua varten katso Edgington (1993) Bio/Tech. 11:787-792. *Bcl-2* pystyy myös estämään γ-säteilyn aiheuttaman solukuoleman. Sentman et al. (1991) Cell 67: 879-888; ja Strasser (1991) Cell 67:889-899. Tiedetään, että bcl-2 inhiboi useimpia apoptoottisen solukuoleman tyyppejä ja sen uskotaan toimivan säätelemällä antioksidanttireittiä vapaan radikaalin muodostumisen kohdissa ja Ca^{++}-virtausta endoplastisen verkon läpi. Lan et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:6569-6573; Hockenbery et al. (1993) Cell 75:241-251.

Vaikka apoptoosi on normaali solutapahtuma, myös patologiset sairaustilat ja erilaiset vammat voivat aiheuttaa sen. Apoptoosi liittyy lukuisiin erilaisiin sairaustiloihin, mukaan lukien, mutta ei rajoittuen, kardiovaskulaarisen sairauden; syövän taantuminen; immunosäätely; virussairaudet; anemia; neurologiset sairaudet; gastrointestinaaliset sairaudet, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, ripuli ja punatauti; diabetes; hiusten läh-

tö; elinsiirron hylkiminen; eturauhasen liikakasvu; liikalihavuus; silmäsairaudet; stressi ja ikääntyminen.

Bcl-2 kuuluu proteiinien sukuun, joista osa on kloonattu ja sekvensoitu. Williams ja Smith (1993) Cell 74:777-779. Kaikki tässä esimerkkinä mainitut viitteet, sekä yllä että alla, sisällytetään täten viittauksella tähän.

Keksinnön yhteenveto

Tarjotaan oleellisesti puhdistettu DNA, joka koodaa uusia *Bcl-2* homologeja, joita kutsutaan *Cdn-1, Cdn-2* ja *Cdn-3*, ja niiden johdannaisia, samoin kuin rekombinanttisoluja ja transgeenisiä eläimiä, jotka ilmentävät *Cdn-1* ja *Cdn-2* nukleotidejä. Tarjotaan myös oleellisesti puhdistetut Cdn-1 ja Cdn-2 proteiinit ja niiden koostumukset. Lisäksi tarjotaan diagnostisia ja terapeuttisia menetelmiä, jotka käyttävät nukleotidejä ja proteiineja. Lisäksi tarjotaan menetelmiä farmaseuttisten aineiden seulomiseksi, jotka stimuloivat, samoin kuin farmaseuttisia aineita, jotka säätävät *Cdn-1* ja *Cdn-2* ilmentymistä ja proteiiniaktiivisuutta ja vuorovaikutuksia. Lisäksi tarjotaan menetelmiä proteiinien seulomiseksi, jotka ovat vuorovaikutuksessa Cdn:ien kanssa.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuva 1 kuvaa *Bcl-2* suvun PCR-alukeet, joita käytetään eristämään *Cdn-1* koettimet.

Kuva 2 kuvaa *Cdn-1* kloonit, jotka saadaan esimerkissä 1 kuvatuilla menetelmillä.

Kuva 3 kuvaa *Cdn-1* cDNA:n nukleotidisekvenssin ja Cdn-1 proteiinin koodatun aminohapposekvenssin.

Kuva 4 kuvaa monien kudosten Northern blot -analyysin tulokset koettimilla, jotka ovat spesifisiä sekä *Bcl-2*:lle että *Cdn-1*:lle.

Kuva 5 esittää *Cdn-2* geenin sekvenssin ja sivusekvenssit ja vastaavan ennustetun Cdn-2 proteiinin aminohapposekvenssin.

Kuva 6 esittää Cdn-1:n, Cdn-2:n ja tunnettujen Bcl-2:n suvun jäsenten N-päätteisten aminohapposekvenssien vertailun.

Kuva 7 esittää *Cdn-3* geenin nukleotidisekvenssin ja Cdn-3 proteiinin ennustetun aminohapposekvenssin.

Kuva 8 esittää *Cdn-1*:n ja joidenkin sen johdannaisten antiapoptoottiset vaikutukset seerumin puutteen aiheuttamassa WI-L2 transformanttien apoptoosissa 0,1-%:isessa FBS:ssa.

Kuva 9 (WIL-2 transformanttien vaste anti-Fas-aiheutetulle apoptoosille (50 ng/ml anti-FAS)) esittää *Cdn-1*:n ja joidenkin sen johdannaisten antiapoptoottiset vaikutukset FAS:n aiheuttamassa WI-L2 solujen apoptoosissa. Kuva 10 esittää apoptoosin säätämisen *Cdn-1*:llä ja *Cdn-2*:lla FL5.12 soluissa.

Kuva 11 kuvaa *Cdn-1* johdannaisen proteiinit Δ1, Δ2 ja Δ3. N-päätteiset tähteet osoitetaan nuolilla. Johdannaisproteiinien jäljelle jäänyt osa on sama kuin täysimittainen Cdn-1.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö käsittää oleellisesti puhdistetut nukleotidisekvenssit, jotka koodaavat uusia *Bcl-2* homologeja, *Cdn-1* ja *Cdn-2*; ja sillä tavalla koodatut proteiinit; koostumukset, jotka käsittävät *Cdn-1* ja *Cdn-2* nukleotidejä, ja proteiinit ja niiden käyttömenetelmät. Huomaa, että samanaikaisesti vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa sarjanro 08/160 067, *Cdn-1* nimettiin cdi-1:ksi, ja että samanaikaisesti vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa sarjanro 08/320 157, *Cdn* nimettiin cdn:ksi ja Cdn nimettiin CDN:ksi; vaikka nimet on muutettu, nukleotidi- ja aminohapposekvenssit säilyvät identtisinä. Keksintö käsittää edelleen rekombinanttisoluja ja transgeenisiä eläimiä, jotka ilmentävät kloonattuja *Cdn-1* tai *Cdn-2* geenejä. Nukleotidi ja ennustetut aminohapposekvenssit, jotka koodataan *Cdn-1*:llä, esitetään kuvassa 3; ja *Cdn-2*:n esi-

tetään kuvassa 5. Nyt on havaittu, että *Cdn*-geenien koodaamat proteiinit pystyvät säätämään apoptoosia. Epstein-Barr virus (EBV) transformantti lymfoblastoidi solulinjassa *Cdn-1*:n osoitettiin vähentävän Fas-välitteistä apoptoosia. Hiiren edeltäjä B-solulinjassa, FL5.12, *Cdn-2*:n ja *Cdn-1*:n johdannaisen ilmentyminen vähentävät IL-3-aiheuttamaa apoptoosia, kun taas *Cdn-1*:n ilmentyminen hieman lisäsi apoptoosia. Siten, riippuen solutyypistä, ilmentyneen *Cdn*:n johdannaisesta tai tyypistä ja apoptoosin aiheutusmenetelmästä, apoptoosia voidaan säätää erittäin spesifisellä tavalla kontrolloimalla *Cdn*:ien ilmentymistä ja Cdn:ien pitoisuutta.

Kuten tässä on käytetty "*Cdn*:t" tai "*Cdn*" viittaa nukleiinihappomolekyyleihin (nukleotidit), jotka on kuvattu tässä (*Cdn-1, Cdn-2, Cdn-3* ja niiden johdnnaiset), "Cdn:t" tai "Cdn" viittaa proteiineihin, jotka on koodattu niillä (Cdn-1, Cdn-2, Cdn-3 ja niiden johdannaiset). Tämä keksintö käsittää *Cdn-1* ja *Cdn-2* nukleotidisekvenssit. Nukleotideihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, *Cdn-1* cDNA, genomista johdettu DNA ja synteettiset tai puolisynteettiset nukleotidit, kuten DNA ja RNA, jotka molemmat ovat koodaavia ja täydentäviä koodaavalle alueelle. Nukleotidit voivat olla täydentäviä mRNA:lle ainakin Cdn:ien fragmentille ja muille nukleotideille, jotka voivat sitoutua joko DNA:han tai mRNA:han, joka koodaa Cdn:iä. Näihin täydentäviin nukleotideihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, nukleotidit, jotka pystyvät muodostamaan kolmoiskierteitä ja antisense-nukleotidejä. Täydentävät nukleotidit voidaan ilmentää endogeenisesti yhdellä tässä kuvatulla vektorilla tai voidaan lisätä eksogeenisesti oligonukleotiditerapian alalla tunnetuilla menetelmillä. Reed et al. (1990) Cancer Res. 50:6565-6570. *Cdn-1* cDNA:n nukleotidisekvenssi, jossa on restriktioendonukleaasikohtien sijanti, esitetään kuvassa 4. Kuten kuvataan tässä olevissa esimerkeissä, *Cdn-1* mRNA on ha-

vaittu erilaisissa ihmisen elimissä ja kudoksissa Northern blot -analyysillä. Näihin elimiin kuuluvat maksa, sydän, luurankolihas; keuhko; munuainen ja haima, kuten kuvassa 3 esitetään.

Samalla tavalla, *Cdn-2* cDNA, genominen DNA ja synteettiset tai puolisynteettiset nukleotidit ovat tämän keksinnön lisätoteutusmuotoja. *Cdn-2* geenin nukleotidisekvenssi yhdessä ennustetun *Cdn-2* proteiinin aminohapposekvenssin ja resktriktioendonukleaasin tunnistuskohtien sijaintien kanssa annetaan kuvassa 5.

Tässä esitetyt esimerkit osoittavat, että *Cdn-1* on ihmisen kromosomissa 6 ja että *Cdn-2* on ihmisen kromosomissa 20. On olemassa vielä suvun jäsen *Cdn-3*, joka on ihmisen kromosomissa 11. Fluoresenssi in situ hybridisaatio (FISH) osoitti *Cdn-1*:n likimääräisen sijainnin olevan 6p21-23. On mahdollista, että *Cdn-2* ja *Cdn-3* ovat pseudogeenejä. Vaikka näitä ei voida ilmentää endogeenisesti, ne voidaan ilmentää rekombinanttivektorista, joka tarjoaa sopivat promoottorisekvenssit. Siten, sekä *Cdn-2* että *Cdn-3* nukleotidisekvenssit sisältyvät tähän keksintöön, samoin kuin niiden rekombinanttirakenteet ja niillä koodatut proteiinit.

Geenien johdannaisiin ja proteiineihin kuuluvat kaikki proteiinin osat tai nukleotidisekvenssi, joka koodaa proteiinin, joka säilyttää apoptoosia säätävän aktiivisuuden. Kuva 11 kuvaa kolme tällaista *Cdn-1*:n johdannaista, joiden on osoitettu säilyttävän apoptoosia säätävän aktiivisuuden. Johdannaiset, *Cdn1-Δ1*, *Cdn1-Δ2* ja *Cdn1-Δ3*, ja sillä tavalla koodatut proteiinit sisältyvät tähän keksintöön.

Keksintö käsittää modifikaatioita *Cdn* DNA sekvensseille, kuten poistot, korvaukset ja lisäykset erityisesti genomisen DNA:n ei-koodavilla alueilla. Tällaiset muutokset ovat käyttökelpisia helpottamaan kloonausta ja modifioimaan geenin ilmentymistä.

Keksintö käsittää edelleen erilaisia korvattuja nukleotidejä. Korvaukset voidaan tehdä koodaavalla alueella, joka joko ei muuta koodattuja aminohappotähteitä tai tuloksena ei ole konservatiivisesti korvattuja aminohappotähteitä. Nukleotidikorvaukset, jotka eivät muuta koodattuja aminohappotähteitä, ovat käyttökelpoisia optimoimaan geenin ilmentymistä erilaisissa systeemeissä. Alan ammattimies tuntee sopivat korvaukset ja ne tehdään, esimerkiksi heijastamaan edullista kodonin käyttöä tietyissä ilmentymissysteemeissä.

Keksintö käsittää *Cdn*:ien funktionaalisesti ekvivalentteja muunnelmia ja johdannaisia, jotka voivat lisätä, vähentää tai olla merkittävästi vaikuttamatta Cdn:ien ominaisuuksiin. Esimerkiksi, muutokset DNA-sekvenssissä, jotka eivät muuta koodattua aminohapposekvenssiä, samoin kuin ne, jotka johtavat aminohappotähteiden konservatiivisiin korvauksiin, yksi tai muutama aminohapon poistaminen tai lisäys, ja aminohappotähteen korvaaminen aminohappoanalogeilla ovat niitä, jotka eivät merkittävästi vaikuta sen ominaisuuksiin.

Aminohappotähteisiin, jotka voidaan konservatiivisesti korvata toisella, kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta: glysiini/alaniini; valiini/isoleusiini/leusiini; asparagiini/glutamiini; asparagiinihappo/glutamiinihappo; seriini/treoniini; lysiini/arginiini ja fenyylialaniini/tyrosiini. Mikä tahansa konservatiivinen aminohapon korvaaminen, joka ei merkittävästi vaikuta Cdn:ien ominaisuuksiin, sisältyy tähän keksintöön.

Keksintö käsittää lisäksi Cdn:ien mutantit, jotka ilmentyneinä häiritsevät endogeenisesti ilmentyneiden Cdn:ien aktiivisuutta. Tällaiset mutantit voidaan tehdä millä tahansa alalla tunnetulla menetelmällä ja niistä voidaan seuloa aktiivisuus niiden kyvyllä vaikuttaa luontaisten Cdn:ien aktiivisuuteen.

Menetelmät nukleiinihapon manipuloimiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön käytäntöä varten, tunnetaan alalla ja kuvataan erilaisissa viitteissä, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos, vol. 1-3, toim. Sambrook et al. Gold Spring Harbor Laboratory Press (1989); ja Current Protocols in Molecular Biology, toim. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1987) ja uusiutuvat tuoreimmat tiedot.

Keksintö käsittää lisäksi erilaisia DNA-vektoreita, jotka on kloonattu siinä *Cdn* nukleotidisekvenssejä. Sopiviin vektoreihin kuuluvat kaikki alalla tunnetut, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, ne, joita käytetään bakteerin, nisäkkään, hiivan ja hyönteisen ilmennyssysteemeissä. Spesifiset vektorit tunnetaan alalla eikä niitä tarvitse kuvata tässä yksityiskohtaisesti.

Vektorit voivat tarjota myös indusoituvia promoottoreita *Cdn* nukleotidisekvenssien ilmentämistä varten. Indusoituvat promoottorit ovat niitä, jotka eivät salli geenin oleellista rakenneilmentämistä, vaan pikemminkin sallivat ilmentymisen vain tietyissä olosuhteissa. Tällaiset promoottorit voidaan indusoida erilaisilla ärsykkeillä, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, vektorin sisältävän solun altistamisen ligandille, metalli-ionille, muulle kemikaalille tai lämpötilan muutokselle. Promoottorit voivat myös olla soluspesifisiä, siis indusoituvia vain tietyssä solutyypissä ja usein vain spesifisen ajanjakson ajan. Promoottori voi edelleen olla solusyklispesifinen, siis indusoiva tai indusoituva vain tietyn solusyklin vaiheen aikana. Promoottori voi olla sekä solutyyppispesifinen että solusyklispesifinen. Mikä tahansa alalla tunnettu indusoituva tai ei-indusoituva promoottori on sopiva käytettäväksi tässä keksinnössä. Edullisesti käytettävä promoottori on indusoituva.

Keksintö käsittää edelleen erilaisia ilmentymissysteemejä, jotka ovat transfektoituneet vektoreilla. Sopiviin ilmentymissysteemeihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, bakteeri, nisäkäs, hiiva ja hyönteinen. Spesifiset ilmentymissysteemit ja niiden käyttö tunnetaan alalla eikä niitä kuvata tässä yksityiskohtaisesti.

Keksintö käsittää ex vivo transfektion *Cdn* nukleotidisekvenssien kanssa, joissa solut, jotka on poistettu eläimistä, mukaan lukien ihmisen, transfektoidaan vektoreilla, jotka sisältävät *Cdn* nukleotidejä, ja viedään uudelleen eläimiin. Sopiviin transfektoituihin soluihin kuuluvat yksittäiset solut tai solut, jotka sisältyvät koko kudoksiin. Lisäksi, ex vivo transfektio voi käsittää solujen transfektion, jotka solut on johdettu eläimestä, joka on muu kuin eläin- tai ihmiskohde, johon solut lopulta viedään. Tällaisiin siirrännäisiin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, allograftit, vierassiirrännäiset (xenograft) ja sikiön kudossiirto. Lisäksi voidaan käyttää, in vivo transfektiota, kuten sopivien vektorien keuhkoon antamista.

Oleellisesti mitä tahansa solu- tai kudostyyppiä voidaan hoitaa tällä tavalla. Sopiviin soluihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, kardiomyosyytit ja lymfosyytit. Esimerkiksi lymfosyytit, jotka on poistettu, transfektoitu rekombinantti DNA:lla ja viety uudelleen HIV-positiiviseen potilaaseen, voivat lisätä uudelleen vietyjen T-solujen puoliintumisaikaa.

Esimerkkinä, HIV-infektoituneiden potilaiden hoidossa edellä kuvatulla menetelmällä valkoiset verisolut poistetaan potilaasta ja lajitellaan, jolloin saadaan $CD4^+$-solut. $CD4^+$-solut transfektoidaan sitten vektorilla, joka sisältää *Cdn* nukleotidin, ja viedään uudelleen potilaaseen. Vaihtoehtoisesti, lajittelemattomat lymfosyytit voidaan transfektoida rekombinanttivektorilla, jossa on ainakin yksi *Cdn* nukleotidi, käyttäen soluspesifisen promoot-

torin kontrollia niin, että vain $CD4^+$-solut ilmentävät nukleotideja. Tässä tapauksessa ideaalinen promoottori olisi CD4-promoottori; kuitenkin mitä tahansa sopivaa $CD4^+$ T-soluspesifistä promoottoria voidaan käyttää.

Lisäksi, keksintö käsittää soluja, jotka on transfektoitu in vivo vektoreilla. Sopivat in vivo transfektion menetelmät tunnetaan alalla ja niihin kuuluu, tähän kuitenkaan rajoittumatta, Zhu et al. (1993) Science 261:209-211 kuvaama. In vivo transfektio voi olla erityisen käyttökelpoinen ehkäisevänä hoitona potilaille, jotka kärsivät ateroskleroosista. Cdn-tasojen säätäminen voisi toimia ehkäisevänä apoptoosiin liittyvää reperfuusiovauriota varten, joka johtuu aivo- tai myokardiaalisesta infarktista. Näissä potilaissa, joissa on suuri halvauksen ja sydänkohtauksen riski, valtimon tukkeumaan liittyvä apoptoosi ja reperfuusiovaurio voitaisiin estää tai ainakin lieventää sitä.

Infarktit aiheutuvat äkillisestä valtimo- tai laskimoveren syötön riittämättömyydestä, joka johtuu veritulpasta, veritukoksesta tai paineesta, joka tuottaa kuolion makroskooppisen alueen; sydän, aivot, perna, munuainen, suoli, keuhko ja kivekset todennäköisesti vahingoittuvat. Apoptoosi ilmenee kudoksissa, jotka ovat infarktin ympärillä veren reperfuusion jälkeen alueelle; siten, Cdn-tasojen säätely, joka saadaan aikaan biologisen modifioijan aiheuttamalla muutoksella endogeenisessä tuotannossa, in vivo transfektiolla tai antisense-terapialla, voisi olla tehokas vähentämään sydänkohtausten ja halvauksen aiheuttaman vaurion vakavuutta.

Transgeeniset eläimet, jotka sisältävät rekombinantti DNA vektorit, jotka sisältävät *Cdn* nukleotidisekvenssit, sisältyvät myös keksintöön. Menetelmät transgeenisten eläinten tekemiseksi tunnetaan alalla eikä niitä tarvitse kuvata tässä yksityiskohtaisesti. Menetelmien, joita käytetään tekemään transgeenisiä eläimiä, tarkaste-

lua varten katso esim. PCT-julkaisu nro WO 93/04169. Edullisesti tällaiset eläimet ilmentävät rekombinantti *Cdn*:iä soluspesifisen ja, vielä edullisemmin, solusyklispesifisen promoottorin kontrollissa.

Toisessa toteutusmuodossa tarjotaan diagnostisia menetelmiä havaitsemaan *Cdn*:ien ilmentyminen joko proteiinitasolla tai mRNA-tasolla. Mikä tahansa vasta-aine, joka tunnistaa spesifisesti Cdn:t on sopiva käytettäväksi Cdn diagnostiikassa. Cdn:ien epänormaalit tasot havaitaan todennäköisesti potilaiden kudoksissa, joilla sairaudet liittyvät sopimattomaan apoptoosiin; siksi diagnostiset menetelmät ovat käyttökelpoisia havaitsemaan ja tarkkailemaan biologisten sairaustilojen, jotka liittyvät tällaisiin apoptoosivajeisiin. Detektiomenetelmät ovat käyttökelpoisia myös Cdn:n kaltaisten terapioiden menestyksen tarkkailemiseksi.

Cdn:ien, jotka ilmentyvät joko rekombinantti DNA:-lla tai biologisista lähteistä, kuten kudoksista, puhdistus tai eristäminen voidaan saada aikaan millä tahansa alalla tunnetulla menetelmällä. Proteiinin puhdistusmenetelmät ovat alalla tunnettuja. Yleensä, oleellisesti puhdistetut proteiinit ovat ne, jotka ovat vapaita muista, kontaminoivista soluaineista, erityisesti proteiineista. Edullisesti, puhdistetut Cdn:t ovat yli 80-%:isen puhtaita ja edullisimmin yli 95-%:isen puhtaita. Kliinistä käyttöä varten, kuten alla on kuvattu, Cdn:t ovat edullisesti erittäin puhtaita, vähintään noin 99-%:isen puhtaita ja vapaita pyrogeeneistä ja muista kontaminanteista.

Sopivat proteiinin puhdistusmenetelmät ovat alalla tunnettuja ja niihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, affiniteettikromatografia, immunoaffiniteettikromatografia, kokoekskluusiokromatografia, HPLC ja FPLC. Mikä tahansa puhdistuskaavio, joka ei johda proteiinin oleelliseen hajoamiseen, on sopiva käytettäväksi tässä keksinnössä.

Keksintö käsittää myös oleellisesti puhdistetut Cdn:t, joissa on aminohappotähdesekvenssit, jotka on kuvattu kuvissa 3 ja vastaavasti 5. Keksintö käsittää funktionaalisesti ekvivalentit Cdn:ien muunnelmat, jotka eivät merkittävästi vaikuta niiden ominaisuuksiin, ja muunnelmat, jotka säilyttävät saman kokonaisaminohapposekvenssin, mutta joilla on lisääntynyt tai vähentynyt aktiivisuus. Esimerkiksi, aminohappotähteiden konservatiiviset korvaukset, yksi tai muutama aminohapon poistaminen tai lisäys, ja aminohappotähteiden korvaaminen aminohappoanalogeilla ovat keksinnön piirissä. Mikä tahansa konservatiivinen aminohapon korvaaminen, joka ei merkittävästi vaikuta Cdn:ien ominaisuuksiin, sisältyy tähän keksintöön.

Sopivat vasta-aineet muodostetaan käyttäen Cdn:iä antigeeninä tai, edullisesti, peptidejä, jotka sisältävät Cdn-alueet, joista puuttuu oleellinen homologia muihin *Bcl-2* suvun geenituotteisiin. Menetelmät proteiinien havaitsemiseksi käyttäen vasta-aineita ja vasta-aineiden muodostamiseksi käyttäen tai synteettisiä peptidejä tunnetaan alalla, eikä niitä kuvata tässä yksityiskohtaisesti.

Cdn-proteiinin ilmentymistä voidaan tarkkailla myös mittaamalla *Cdn* mRNA:n taso. Mikä tahansa menetelmä spesifisten mRNA-lajien havaitsemiseksi on sopiva käytettäväksi tässä menetelmässä. Tämä saadaan aikaan helposti käyttäen polymeraasiketjureaktiota (PCR). Edullisesti, PCR:ää varten valitut alukkeet vastaavat *Cdn*-geenien alueita, joista puuttuu oleellinen homologia muihin Bcl-geenisuvun jäseniin. Vaihtoehtoisesti, Northern blot -analyysejä voidaan käyttää havaitsemaan *Cdn* mRNA käyttäen koettimia, jotka ovat spesifisiä Cdn:ille. Menetelmät PCR:n ja Northern böot -analyysien käyttämiseksi tunnetaan alalla, eikä niitä kuvata tässä yksityiskohtaisesti.

Menetelmät *Cdn*:illä käsittelemiseksi käsittävät myös *Cdn*:ien soluilmentymisen säätämisen nostamalla tai laskemalla mRNA:n tai proteiinin tasoja. Sopiviin menetel-

miin *Cdn*:n soluilmentymisen säätämiseksi kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, endogeenisen ilmentymisen lisääminen biologisilla modifioijilla; solujen transfektoiminen vektoreilla, jotka koodaavat *Cdn*-nukleotidejä, niin että joko *Cdn*-geeni yli-ilmentyy tai antisense-nukleotidi ilmentyy; ja mutantti Cdn:ien ilmentyminen, jotka häiritsevät endogeenisen Cdn:n vuorovaikutusta muiden proteiinien kanssa, kuten muiden *Bcl-2* suvun jäsenten kanssa. Solutransfektiosta keskustellaan yllä ja se tunnetaan alalla. Sopiviin indikaatioihin *Cdn*:n endogeenisten tasojen säätämiseksi kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, pahanlaatuisuus ja sydänspesifinen ilmentyminen. Sydänspesifinen ilmentyminen on erityisen sopiva käytettäväksi indikaatioissa, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, potilaat, jotka ovat alttiita sydänsairaudelle, ja kardiotoksisten terapioiden edellä, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, kemoterapiat, kuten adriamysiini, niin että tarjotaan sydänsuojaus.

Cdn:ien endogeenisen ilmentymisen säätäminen voidaan saada aikaan saattamalla solut alttiiksi biologisille modifioijille, jotka suoraan tai epäsuoraan muuttavat Cdn:ien tasoja joko säätämällä *Cdn*:ien ilmentymistä tai säätämällä *Cdn* mRNA:n hajoamista. Sopiviin biologisiin modifioijiin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, molekyylit ja muut solut. Sopiviin molekyyleihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, lääkkeet, sytokiinit, pienet molekyylit, hormonit, interleukiinien yhdistelmät, lektiinit ja muut stimuloivat aineet, esim. PMA, LPS, bispesifiset vasta-aineet ja muut aineet, jotka modifioivat solun toimintoja tai proteiinin ilmentymistä. Edullisesti, sopiva biologinen modifioija on γIFN, joka nostaa Cdn ilmentymistasoja HT-29 soluissa. Lisäksi biologisiin modifioijiin kuuluvat *Cdn* nukleotidit, jotka modifioivat endogeenisen *Cdn*:n ja mutantti Cdn:ien ilmentymistä, jotka häiritsevät endogeenisten Cdn:ien aktiivisuutta. Solut

saatetaan alttiiksi tällaisille biologisille modifioijille fysiologisesti tehokkaissa pitoisuuksissa ja *Cdn*:ien ilmentyminen mitataan suhteessa kontrolliin, jota ei saatettu alttiiksi biologisille modifioijille. Ne biologiset modifioijat, jotka muuttavat *Cdn*:ien ilmentymistä suhteessa kontrolliin, valitaan lisätutkimusta varten.

Menetelmiin *Cdn*:ien endogeenisten tasojen alentamiseksi kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, antisense-nukleotiditerapia ja menetelmät aistin kuljettamiseksi antisense-rakenteeseen ja ilmentymisen säätäminen alaspäin biologisilla modifioijilla. Antisense-terapia tunnetaan alalla ja sen sovellus on ilmeinen alan ammattimiehelle.

Terapeuttisesti tehokkaiden biologisten modifioijien seulonta tehdään joko saattamalla solut alttiiksi biologisille modifioijille, jotka voivat suoraan tai epäsuoraan säätää Cdn:ien tasoja joko muuttamalla ilmentymistä tai muuttamalla *Cdn* mRNA:n tai Cdn:ien puoliintumisaikaa. Biologiset modifioijat voivat häiritä myös Cdn-1 vuorovaikutuksia sekä muiden *Bcl-2* suvun jäsenten että muiden geenituotteiden, esim. proteaasien kanssa. Sopiviin biologisiin modifioijiin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, molekyylit ja muut solut. Sopiviin molekyyleihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, lääkkeet, sytokiinit, pienet molekyylit, hormonit, interleukiinien yhdistelmät, lektiinit ja muut stimuloivat aineet, esim. PMA, LPS, bispesifiset vasta-aineet, *Cdn*-nukleotidit, Cdn-mutantit ja muut aineet, jotka modifioivat solun toimintoja tai proteiinin ilmentymistä. Solut kasvatetaan olosuhteissa, joiden tiedetään tuovan esiin ainakin yhden *Cdn*:n (edullisesti *Cdn-1*) ilmentyminen, joka saatetaan alttiiksi tällaisille biologisille modifioijille fysiologisesti tehokkaissa pitoisuuksissa, ja *Cdn*:ien ilmetyminen mitataan suhteessa kontrolliin, jota ei ole saatettu alttiiksi biologisille modifioijille. Ne biologiset modifioi-

jat, jotka säätävät *Cdn*:ien ilmentymistä verrattuna kontrolliin, valitaan lisätutkimusta varten. Solun elinkykyisyyttä tarkkaillaan myös, jolloin varmistetaan, että muutettu *Cdn* ilmentyminen ei johdu solukuolemasta.

Määritettäessä biologisten modifioijien kykyä säätää (lisätä tai vähentää) *Cdn* ilmentymistä endogeenisen ilmentämisen tasot voidaan mitata tai rekombinanttifuusioproteiinien tasot voidaan mitata käyttäen *Cdn*-spesifisten promoottorisekvenssien kontrollia. Fuusioproteiinit koodataan reportterigeeneillä.

Reportterigeenit tunnetaan alalla ja niihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, kloramfenikoliasetyylitransferaasi (CAT) ja ß-galaktosidaasi. *Cdn-1*:n ja *Cdn-2*:n ilmentymistä voidaan tarkkailla, kuten edellä on kuvattu joko proteiini- tai mRNA-tasoilla. Reportterigeenien ilmentymistä voidaan tarkkailla entsymaattisilla analyyseillä tai vasta-ainepohjaisilla analyyseillä, kuten ELISAt ja RIAt, jotka myös tunnetaan alalla. Mahdollisia farmaseuttisia aineita voivat olla kaikki alalla tunnetut terapeuttiset aineet ja kemikaalit, tai mitkä tahansa karakterisoimattomat yhdisteet, jotka on johdettu luonnollisista lähteistä, kuten sienilihaliemistä ja kasviuutteista. Edullisesti, sopivia farmaseuttisia aineita ovat ne, joista puuttuu oleellinen sytotoksisuus ja karsinogeenisyys.

Sopivia indikaatioita *Cdn*:ien endogeenisten tasojen säätämiseksi ovat kaikki, joihin liittyy *Cdn*-välitteinen apoptoosi. Näihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, erilaiset pahanlaatuisuuden tyypit ja muut sairaudet, jotka johtavat kontrolloimattomaan solukasvuun, kuten ekseema, tai puutokset normaalisti ohjelmoidussa solukuolemassa, kuten pahanlaatuisuudet, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, B-solulymfoomat.

Keksintö käsittää myös terapeuttisia menetelmiä ja koostumuksia, jotka käsittävät potilaiden hoidon biologi-

silla modifioijilla, jolloin säädetään *Cdn*:ien ilmentymistä. Tehokkaat pitoisuudet ja annosohjeet voidaan johtaa empiirisesti. Alan ammattimies osaa tällaiset johtamiset ja ne riippuvat esimerkiksi potilaan iästä, painosta ja sukupuolesta, ja sairauden tyypistä ja vakavuudesta. Vaihtoehtoisesti, potilaita voidaan hoitaa suoraan joko luontaisilla tai rekombinantti Cdn:illä. Cdn:ien tulisi olla oleellisesti puhtaita ja pyrogeenittömiä. On edullista, että rekombinantti Cdn:t tuotetaan nisäkässolulinjassa niin, että varmistetaan kunnollinen glykosylaatio. Cdn:t voidaan tuottaa myös hyönteissolulinjassa.

Terapeuttisia koostumuksia varten terapeuttisesti tehokas määrä oleellisesti puhdasta Cdn:a tai biologista modifioijaa tai oligonukleotidia, joka säätää sen ilmentymistä tai aktiivisuutta, suspendoidaan fysiologisesti hyväksyttävään puskuriin, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, suolaliuos ja fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), ja annetaan potilaalle. Edullisesti antaminen on laskimonsisäistä. Muihin antamismenetelmiin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, ihonalainen, vatsakalvon sisäinen, gastrointesinaalinen ja suoraan spesifiseen elimeen, kuten sydämensisäinen, antaminen esimerkiksi hoitamaan myokardiaaliseen infarktiin kuuluvaa solukuolemaa.

Sopivat puskurit ja antamismenetelmät ovat alalla tunnettuja. Cdn:n tai sitä varten olevan biologisen modifioijan tehokas pitoisuus on määritettävä empiirisesti ja se riippuu sairauden tyypistä ja vakavuudesta, sairauden etenemisestä ja potilaan terveydestä. Tällaiset määrittämiset kuuluvat alan ammattimiehen taitoihin.

Bcl-2:n ajatellaan toimivan antioksidanttireitillä. Veis et al. (1993) Cell 75:229-240. Siksi terapia, joka käsittää *Cdn*:t, on sopiva käytettäväksi sairaustiloissa, joihin superoksidi on sekaantunut. *Cdn*-ilmentymisen säätelijöiden antaminen johtaa kasvaneeseen solunulkopuoliseen Cdn:ien pitoisuuteen, minkä uskotaan tarjoavan menetelmän

inhiboida suoraan superoksidin akkumuloitumista, joka voidaan tuottaa rakkuloilla, jotka liittyvät apoptoosiin. Terapeuttinen menetelmä käsittää siten, tähän kuitenkaan rajoittumatta, superoksidivälitteisen soluvaurion inhiboinnin.

Sopivia indikaatioita Cdn:ien tai sitä varten olevan biologisen modifioijan terapeuttista käyttöä varten ovat ne, jotka käsittävät vapaa radikaali välitteisen solukuoleman ja niihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, sairaustilat, joiden aikaisemmin uskottiin olevan hoidettavissa superoksididismutaasilla. Tällaisiin indikaatioihin kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, HIV-infektio, autoimmuunusairaudet, sydänlihassairaudet, neuronaaliset sairaudet, maksatulehdus ja muut maksasairaudet, osteoporoosi ja shokkioireyhtymät, joita on, tähän kuitenkaan rajoittumatta, verenmyrkytys.

Kloonatun *Cdn* DNA:n hybridisaatio lähetti mDNA:han aivojen erilaisista alueista osoitti korkeita *Cdn-1*:n ilmentymistasoja kussakin tutkitussa alueessa (kuva 8). Siksi, neurologiset sairaudet ovat toinen alue, jossa osoitetaan Cdn:ien terapeuttisia sovellutuksia.

Keksintö käsittää edelleen menetelmät vuorovaikutusten analysoimiseksi Cdn:ien ja proteiinien välillä, jotka sitoutuvat spesifisesti Cdn:iin. Analyysit vaativat puhdistettujen Cdn:ien kosketuksen solulysaattien kanssa, jotka sisältävät proteiinin, joka voi sitoutua Cdn:iin olosuhteissa, jotka ovat riittävät proteiinin sitoutumiseen ja proteiinin läsnäolon analysoimiseen.

Tyypillisesti analyysivaihe käsittää proteiinin saattamisen kosketuksiin spesifisen sitoutumispartnerin kanssa, kuten vasta-aineen, joka voi olla suoraan tai epäsuoraan leimattu. Sopiviin analyyseihin kuuluvat ELISA, joka tarjoaa vasta-aineet suunnattuna proteiinia vastaan, in vitro käännetyn Cdn:n ja solulysaatit, jotka sisältävät

proteiinin. Hiivan geneettiset systeemit, kuten Matchmaker (Clontech) ovat myös sopivia käytettäväksi analyysissä.

Seuraavat esimerkit tarjotaan havainnollistamaan, mutta ei rajoittamaan tätä keksintöä. Ellei toisin mainita, kaikki kloonaustekniikat olivat oleellisesti, kuten on kuvattu julkaisussa Sambrook et al. (1989), ja kaikkia reagensseja käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Esimerkki 1

***Cdn-1* cDNA:n identifiointi ja kloonaus**

Kuuden tunnetun *Bcl-2* suvun jäsenen aminohapposekvenssin vertailu (kuva 6) paljasti kaksi aluetta, jossa on huomattava sekvenssi-identtisyys, nimittäin amihapot 144-150 ja 191-199. Yrityksessä identifioida uudet *Bcl-2* suvun jäsenet, huonontuneet PCR-alukkeet, jotka perustuvat sekvensseihin näissä alueissa, määrättiin (kuva 1) ja PCR suoritettiin käyttäen ihmisen sydämen cDNA:ta ja ihmisen B-lymfoblastoidisolulinjan (WI-L2) cDNA:ta. PCR suoritettiin käyttäen Hot Start/Ampliwax-tekniikkaa (Perkin Elmer Cetus). PCR-alukkeiden ja malli cDNA:n loppupitoisuus oli 4 μM ja vastaavasti 0,1 - 0,2 ng/ml. Olosuhteet cDNA:n synteesiä varten olivat identtiset niiden kanssa, jotka on kuvattu alla cDNA kokoelman ensimmäisen säikeen cDNA:n synteesiä varten. PCR suoritettiin Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler laitteella menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Kiefer et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176: 219-225, paitsi, että lämpökäsittely- ja venytyslämpötilat ensimmäisten 10 kierroksen aikana olivat 36 °C. PCR:n jälkeen näytteitä käsiteltiin 5 yksiköllä DNA polymeraasi I:a, Klenow fragmentti, 30 minuutin ajan 37 °C:ssa ja sitten jakotislattiin elektroforeesilla 7-%:isella polyakryyliamidilla, 1 x TBE (Tris/boraatti/EDTA) geeli. DNA, joka kulkeutui 170 - 210 emäsparin välillä, poistettiin geelistä, eluoitiin passiivisesti 16 tunnin ajan ravistaen varovasti 10 mM:ssa Tris-HCl:a, pH 7,5, 1 mM EDTA:a (TE), puhdistettiin viemällä Elutip-D-kolonnin

yli (Schleiter ja Schuell), ligatoitiin pCR-Script-vektoriin (Stratagene) ja muutettiin *Escherichia coli* kannaksi XL1-Blue MRF (Stratagene). Plasmidi DNA transformanteista (valkoiset pesäkkeet), jotka sisälsivät sekä sydämen että WI-L2:n PCR-tuotteet, eristettiin käyttäen Magic Miniprep DNA Purification Systemiä (Promega), ja DNA-insertit sekvensoitiin dideoksiketjupäättymismenetelmällä Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 mukaisesti (USB, Sequenase version 2.0). Yhdentoista sydämen PCR-tuotteen DNA-sekvenssianalyysi paljasti kaksi sekvenssiä, jotka olivat identtiset *Bcl-x*:n kanssa (Boise et al. (1993) Cell 74:597-608), ja kymmenen muuta sekvenssiä, jotka eivät liittyneet *Bcl-2* sukuun.

Yhdentoista WI-L2 PCR-tuotteen DNA-sekvenssianalyysistä saatiin yksi *Bcl-x* sekvenssi, viisi sekvenssiä, jotka olivat identtisiä toisen *Bcl-2* suvun jäsenen kanssa, bax (Oldvai et al. (1993) Cell 74:609-619), neljä erillistä sekvenssiä ja yhden uuden *Bcl-2*:een liittyvän sekvenssin, jota kutsutaan *Cdn-1*:ksi. Ainutlaatuinen *Cdn-1* aminohapposekvenssi, joka on koodattu PCR-tuotteella, esitetään kuvassa 6 aminohaposta 151-190 (ylärivi).

Cdn-1 cDNA:n eristämiseksi ihmisen sydämen cDNA kokoelma (Clontech) ja WI-L2 cDNA kokoelma, joka on rakennettu kuten julkaisussa Zapf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14892-14898 on kuvattu, seulottiin käyttäen *Cdn-1* PCR DNA-inserttiä koettimena. DNA ^{32}P-leimattiin menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Feinberg ja Vogelstein (1984) Anal. Biochem. 137:266-267, ja käytettiin seulomaan 150 000 rekombinanttikloonia molemmista kokoelmista menetelmän mukaisesti, jonka ovat kuvanneet Kiefer et al. (1991). Kahdeksan positiivista kloonia saatiin WI-L2 cDNA kokoelmasta. Neljä kloonia WI-L2 cDNA kokoelmasta ja kaksi sydämen cDNA kokoelmasta puhdistettiin edelleen ja plasmidi DNA, joka sisälsi cDNA-insertit, poistettiin λZAPII-vektorista (Stratagene) (kuva 2). Kaksi pisintä

kloonia W7 (2,1 kb) ja W5 (2,0 kb) sekvensoitiin ja osoitettiin sisältävän *Cdn-1*-koetinsekvenssin, siten varmistettiin niiden autenttisuus. Kaksi kloonia sydämen cDNA kokoelmasta puhdistettiin. cDNA alikloonattiin pBlsc:ksi ja sekvensoitiin. Sydämen cDNA:t koodasivat myös *Cdn-1*:n.

W7 DNA sekvenssi yhdessä seuraavan aminohappotähdesekvenssin kanssa esitetään kuvassa 3. *Cdn-1*:n seuraava aminohapposekvenssi asettui myös maksimisekvenssi-identtisyyteen muiden *Bcl-2* suvun jäsenten kanssa ja se esitetään kuvassa 6. Kuten voidaan nähdä, on olemassa huomattava sekvenssi-identtisyys *Cdn-1*:n ja muiden suvun jäsenten välillä aminohappojen 100 ja 200 välillä. Tämän keskusalueen toisella puolella sekvenssin säilyminen putoaa nopeasti. Kuten *Bcl-2, Cdn-1* näyttää olevan solunsisäinen proteiini, sillä se ei sisällä hydrofobista signaalipeptidiä eikä N-kytkettyä glykosylaatiokohtia. *Cdn-1* sisältää hydrofobisen C-päätteen, joka havaitaan myös kaikilla *Bcl-2* suvun jäsenillä, paitsi LMW5-HL, mikä ehdottaa sen antiapoptoottisen aktiivisuuden kohta, kuten *Bcl-2*:n, paikallistetaan membraaniin sitoutuneeseen organelliin, kuten mitokondriaaliseen membraaniin, endoplastiseen retikulumiin tai nukleaariseen membraaniin. Hockenbery et al. (1990); Chen-Levy et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:701-710; Jacobsen et al. (1993) Nature 361:365-369; ja Monighan et al. (1992) J. Histochem. Cytochem. 40:1819-1825.

Esimerkki 2

cDNA-kloonien Northern blot -analyysi

Northern blot -analyysi suoritettiin menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisuissa Lehrach et al. (1977) Biochem. 16:4743-4651 ja Thomas (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205. Lisäksi ihmisen monikudos Northern blot hankittiin Clontechiltä. *Bcl-2*:n ja *Cdn-1* cDNA:iden koodaavat alueet leimattiin satunnaisella aloitusmenetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa Feinberg ja Vogelstein (1984) Anal. Biochem. 137:266-267. Hybri-

disaatio ja pesutilat suoritettiin menetelmien mukaisesti, jotka Kiefer et al. (1991) ovat kuvanneet. Erityisesti, *Bcl-2*:n ja *Cdn-1*:n kloonien Klenow-leimatut fragmentit hybridisoitiin ihmisen monikudos Northern täplään (Clontech 7760-1) loppupitoisuudessa 1 x 10^6 cpm/ml kullekin koettimelle. Täplä pestiin suurella ankaruudella.

Tulokset, jotka esitetään kuvassa 4, osoittavat, että *Cdn-1* ilmentyy kaikissa testatuissa elimissä (sydän, aivot, istukka, keuhko, maksa, luurankolihas, munuainen ja haima), kun taas *Bcl-2* ei ilmenny tai ilmentyy vain alhaisissa tasoissa sydämessä, aivoissa, keuhkossa ja maksassa. Siten *Cdn-1* näyttää olevan laajemmin ilmentyvä ihmisen elimissä kuin *Bcl-2* ja voi olla tärkeämpi apoptoosin säätelyssä näissä kudoksissa.

Esimerkki 3

Rekombinantti *Cdn-1*:n ilmentyminen

Rekombinantti *Cdn-1*:n ilmentämiseksi baculovirussysteemissä esimerkissä 1 muodostunutta *Cdn-1* cDNA:ta käytettiin muodostamaan uusi *Cdn-1*-vektori, PCR-metodologialla kuten esimerkissä 1 on kuvattu, käyttäen alukkeita geenin 3' ja 5' sivualueista, jotka sisältävät resktriktiokohdat helpottamaan kloonausta. Plasmidit sekvensoitiin dideoksipäätemenetelmällä (Sanger et al., 1977) käyttäen sekvensointikittejä (USB, Sequenase version 2.0) ja sisäisiä alukkeita. Tämä, jotta varmistettiin, että PCR:stä ei saatu mutaatioita.

Kloonia käytettiin muodostamaan rekombinanttivirukset in vivo homologisella rekombinaatiolla plasmidin limittyneiden sekvenssien ja AcNPV villiä tyyppiä olevan baculoviruksen välillä. 48 tunnin kuluttua transfektion jälkeen hyönteisen *Spodoptera frugiperda* klooni 9 (SF9) soluissa rekombinanttivirukset otettiin talteen, identifioitiin PCR:llä ja puhdistettiinn edelleen. Standardimenetelmät rekombinantti baculoviruksen valintaa, seulontaa ja etenemistä varten suoritettiin (Invitrogen). Bacu-

lovirussysteemillä tuotetun proteiinin moolimassaa, natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE), verrattiin Cdn-1:n ennustetun moolimassan kanssa aminohapposekvenssin mukaisesti.

Lisäksi, samanlaisia klooneja voidaan ilmentää edullisesti hiivan solunsisäisessä ilmentämissysteemissä millä tahansa alalla tunnetulla menetelmällä, mukaan lukien Barr et al. (1992), Transgenesis, toim. JAH Murray, (Wiley and Sons), ss. 55-79, kuvaaman menetelmän.

Esimerkki 4

***Cdn-1*:n ilmentäminen nisäkässysteemeissä**

Cdn-1 koodaava sekvenssi poistettiin esimerkissä 1 muodostetusta plasmidista ja liitettiin plasmideihin pCEP7, pREP7 ja pcDNA3 (Invitrogen) yhteensopivissa restriktioentsyymikohdissa. pCEP7 muodostettiin poistamalla pREP7:n RSV 3'-LTR XbaI/Asp718:lla ja korvaamalla CMV-promoottori pCEP4:stä (Invitrogen). 25 µg kutakin *Cdn-1*:n sisältävää plasmidia elektroporatoitiin B-lymfoblastoidisolulinjaan WI-L2 ja stabiilit hygromysiiniresistentit transformantit tai G418-resistentit transformantit (pcDNA3-rakenteet, kuva 8), jotka ilmensivät *Cdn-1*:ä, valittiin.

Cdn:ien koodaava alue voidaan myös ligatoida ilmentymisvektoreihin, jotka pystyvät stabiilisti yhdistymään muihin solutyyppeihin, joita ovat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, kardiomyosyytit, neuraaliset solulinjat, kuten GTI-7 ja TNF-herkät solut, kuten ihmisen koolonin adenokarsinooman solulinja HT29, niin että tarjotaan erilaisia analyysisysteemejä tarkkailemaan apoptoosin säätelyä *Cdn-1*:llä.

Esimerkki 5

***Cdn-1*:n ja sen johdannaisten antiapoptoottisen aktiivisuuden vaikutus villiä tyyppiä olevan B-lymfoblastoidisolulinjassa WI-L2-729 HF2 ja muutettu solu, joka ilmentää ylimäärän *Cdn-1*:ä**

2×10^5 WI-L2 ja WI-L2 soluja, jotka oli muutettu vektorilla, joka koodaa *Cdn-1*:ä, kuten esimerkissä 4 on kuvattu, kasvatettiin RPMI:ssä, jota täydennettiin 10-%:isella naudansikiöseerumilla (FBS) anti-fas-koetta varten tai 0,1-%:isella FBS:llä seeruminpuutekokeita varten. Anti-fas-kokeen tapauksessa, kun solut oli pesty tuoreella väliaineella, ne suspendoitiin RPMI:in, jota täydennettiin 10-%:isella FBS:llä, saatettiin alttiiksi anti-fas vasta-aineille ja solukuoleman kinetiikka vasteessa apoptoosin aiheuttamalle aineelle analysoitiin virtaussytometrillä FACScanin kanssa. Seeruminpuutekokeen tapauksessa WI-L2 solut suspendoitiin uudelleen RPMI:in, jota täydennettiin 0,1-%:isella FBS:llä, ja apoptoosia tarkkailtiin menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Henderson et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8479-8483. Muihin menetelmiin apoptoosin aiheuttamiseksi kuuluvat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, hapenpuute primaarisessa sydänmyosyyteissä, NGF-poistaminen, glutationin tyhjentäminen neuraalisessa solulinjassa GTI-7 tai TNF:n lisäys HT29 solulinjaan. Apoptoosi analysoitiin mittaamalla solun kutistuminen ja läpäisevyys propidiumjodidiin (PI) niiden kuoleman aikana. Lisäksi voidaan käyttää mitä tahansa muuta menetelmää apoptoottisen solukuoleman arvioimiseksi.

Kuva 9 esittää erilaisten WI-L2 transformanttien antiapoptoottisen vasteen anti-fas-käsittelylle. Kuva 8 esittää erilaisten WI-L2 transformanttien antiapoptoottisen vasteen seeruminpuutteelle. Kuvassa 9 duplikaattikuoppia, jotka sisälsivät 3×10^5 solua, inkuboitiin 50 ng/ml:lla sytosidistä anti-fas vasta-ainetta 24 tunnin ajan. Solukuolema analysoitiin sitten virtaussytometrialla FACScanin kanssa. Proteiinit, jotka ilmentyvät kustakin rakenteesta, esitetään pylväiden alla. Koska monet rakenteista ovat katkaisu- tai poistomuunnelmia, osoitetaan myös tarkat ilmentyneet aminohapot. Kuten voidaan nähdä, kaikilla transformanteilla oli jonkin verran suojaavaa

vaikutusta verrattuna kontrolli transformanttiin, joka sisälsi pREP7-vektorin yksin. Apoptoosiresistentein transformantti oli *Cdn-1Δ2* ilmentävä solulinja, jossa yli 90-%:a soluista selvisi anti-fas-käsittelystä. Merkittävä suojaus havaittiin myös transformanteissa, jotka ilmensivät täyden pituuden *Cdn-1*:n (1-211) ja *Cdn-1Δ1*:n, mitä seuraavat *Bcl-2Δ*:n ja *Bcl-2*:n ilmentävät solulinjat.

Cdn-1Δ1:stä ja *Cdn-1Δ2*:sta puuttuu nukleotidit, jotka koodaavat täyden pituuden Cdn-1:n N-päätteen 59 ja vastaavasti 70 aminohapot. Havainto, että *Cdn-1Δ2*:n ilmentyminen on tehokkaampaa apoptoosin estämisessä kuin täyden pituuden *Cdn-1*:n, ehdottaa, että pienemmät, katkaistut Cdn-1-molekyylit voivat olla voimakkaita terapeuttisia aineita.

Esimerkki 6

Muiden *Cdn*-geenien määritys ja *Cdn-2*-geenin kloonaus

Ihmisen genomi DNA:n ja ihmisen/jyrsijän somaattisen solun DNA:iden paneelin Southern blot -analyysit osoittivat, että ainakin 3 *Cdn*:ään liittyvää geeniä ja että ne olivat kromosomeissa 6, 11 ja 20. Kolmen hybridi DNA:n PCR/sekvenssianalyysi osoitti, että *Cdn-1* oli kromosomissa 6 ja että kaksi läheisesti toisiinsa liittyvää sekvenssiä oli kromosomissa 20 (merkitään *Cdn-2*) ja kromosomissa 11 (merkitään *Cdn-3*). Me olemme kloonanneet *Cdn-2* ja *Cdn-3* geenit ja sekvensoineet ne. Mielenkiintoisesti sekä *Cdn-2* että *Cdn-3* eivät sisällä introneita ja niillä on kaikki ne prosessoitujen geenien piirteet, jotka ovat palanneet genomiin. *Cdn-3*:ssa on nukleotidin poisto, joka aiheuttaa rakenteen muutoksen ja aikaisen päätöksen, ja on siten luultavasti pseudogeeni. Molemmilla on kuitenkin promoottorielementit [CCAAT, TATAAA -laatikot], mutta niitä ei luultavasti kopioida, kuten on määritetty Northern blot -analyyseillä *Cdn-2* ja *Cdn-3* spesifisillä koettimilla.

900 000 kloonia ihmisen istukan genomisesta kokoelmasta kosmidivektorissa pWE15 (Stratagene, La Jolla, CA) seulottiin 950 bp Bg1II-HindIII cDNA koettimella, joka sisälsi koko *Cdn-1*:n koodaavan alueen. Koetin ^{32}P-leimattiin menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Feinberg ja Vogelstein (1984) Anal. Biochem. 137:266-267. Kokoelmaa käsiteltiin ja seulottiin käyttäen suuren ankaruuden hybridisaatiota ja pesuolosuhteita, kuten on kuvattu julkaisussa Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning, 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Kymmenen kaksoispositiivista kloonia puhdistettiin edelleen tekemällä uudelleen maljaviljelmät ja seulomalla kuten edellä. Plasmidi DNA puhdistettiin käyttäen Wizard Maxiprep DNA Purification Systemiä, kuten toimittaja kuvaa (Promega Corp., Madison, WI), ja analysoitiin *Eco*RI restriktioentsyymikartoituksella ja Southern blottauksella. Southern blottaukselle käytetty koetin ja hybridisaatio-olosuhteet olivat samat kuin edellä.

Kosmidikloonit jaettiin kahteen ryhmään *Eco*RI restriktioanalyysillä ja Southern blottauksella päätelty-nä. Kosmidikloonit (cos) 1 - 4 ja 7 osoittivat yhden *Eco*-RI:n erillisen mallin, muodostivat DNA-fragmentteja ja sisälsivät yksittäisen 6,5 kb hybridisoivan *Eco*RI DNA-fragmentin. *Cos2* ja *Cos9* jaettiin toiseen ryhmään, jolle oli tunnusomaista 5,5 kb hybridisoiva *Eco*RI DNA-fragmentti. 6,5 kb DNA-fragmentti *cos2*:sta ja 5,5 kb DNA-fragmentti *cos9*:stä alikloonattiin pBluescript SK:ksi (Stratagene, La Jolla, CA) käyttäen standardi molekyylibiologisia tekniikoita (Sambrook et al., kuten edellä). Plasmidi DNA eristettiin ja DNA-inserit kahdesta alikloonista, A4 (*cos2*:sta) ja C5 (*cos9*:stä), kartoitettiin *Bam*HI:llä, *Hin-d*III:lla ja *Eco*RI:lla ja analysoitiin Southern blottauksella, kuten edellä on kuvattu. Pienemmät restriktiofragmentit kummastakin kloonista alikloonattiin M13-sekvensointivektoreiksi ja DNA-sekvenssi määritettiin.

A4:n sekvenssi sisältää avoimen lukukehän, joka osoittaa 97-%:n aminohapposekvenssi-identtisyyden *Cdn-1*:n kanssa. (Kuva 5) Tämän geenin korkea sekvenssi-identtisyyden aste *Cdn-1*:n kanssa osoittaa, että se on uusi *Cdn-1*:n kaltainen geeni ja siksi sitä kutsutaan *Cdn-2*:ksi. Koodatun *Cdn-2* proteiinin ja muiden *Bcl-2* suvun jäsenten sekvenssivertailu esitetään kuvassa 6. *Cdn-2* sisältää säilyneet alueet, BH1 ja BH2, jotka ovat *Bcl-2* suvun tuntomerkkejä, ja osoittaa alhaisen kokonaissekvenssi-identtisyyden (~20-30 %) muihin jäseniin, jotka myös ovat tunnusomaisia *Bcl-2* suvulle. *Cdn-3*:ssa on rakenteen muutos, joka johtaa lyhyempään, erilliseen polypeptidiin, eikä siksi sisällä *Cdn-1*:n, *Cdn-2*:n tai muun *Bcl-2*:n suvun jäsenten rakenteellisia piirteitä.

Esimerkki 7

***Cdn-1*, *Cdn-2* ja *Cdn-3* geenien kromosomaalinen sijanti**

Ihmisen/jyrsijän somaattisten soluhybridien DNA:-iden paneelin Southern blot -analyysiä (Panel #2 DNA NIGMS:stä, Camden, NL) ja metafaasikromosomien fluoresoivaa in situ hybridisaatiota (FISH) käytettiin kartoittamaan *Cdn*-geenit ihmisen kromosomeihin. Southern blottausta varten digeroitiin 5 µg hybridipaneeli DNA:ta *Eco*RI:llä tai *Bam*HI/*Hind*III:lla, jakotislattiin 0,8-%:isella tai 1,0-%:isella agaroosigeeleillä, siirrettiin nitroselluloosaan ja hybridisoitiin *Cdn-1*-koettimella. Hybridisaatio- ja pesuolosuhteet olivat kuten edellä kuvataan. FISH:ä varten *Cdn-2* aliklooni, A4, biotinyloitiin käyttäen Bionick Labeling Systemiä (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) ja hybridisoitiin metafaasikromosomeihin normaaleista ihmisen fibroblasteista menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Viegas-Pequignot, In Situ Hybridization, A Practical Approach, 1992, toim. D.G. Wilkinson, ss. 137-158, IRL Press, Oxford. Koetindetektio käyttäen FITC-konjugoitua avidiinia ja biotinyloitua vuohen an-

tiavidiinia oli menetelmän mukainen, joka on kuvattu julkaisussa Pinkel et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142.

Southern blot -analyysi osoitti kolme hybridisoivaa *Eco*RI juovaa ihmisen DNA-kontrollissa, jotka olivat noin 12 kb, 11 kb ja 5,5 kb pitkiä. Somaattisen soluhybridi DNA:n analyysi osoitti, että 12 kb juova oli kahdessa eri näytteessä, NA10629, joka sisälsi vain ihmisen kromosomin 6, ja NA07299, joka sisälsi sekä ihmisen kromosomit 1 että X, ja merkityksellisesti osa kromosomi 6:tta, joka on telomeerinen p21:lle. 11 kb juova oli NA131140:ssä, joka sisältää ihmisen kromosomin 20. 5,5 kb hybridisoiva juova havaittiin vain näytteessä NA10927A, joka sisälsi ihmisen kromosomin 11. Näiden hybridi-DNA-näytteiden PCR/DNA sekvensointianalyysi käyttäen alukkeita *Cdn-1*:lle, *Cdn-2*:lle tai *Cdn-3*:lle osoitti *Cdn-1* sekvenssit NA10629:ssä (kromosomi 6, joka sisältää hybridi DNA:n) ja NA07299:ssä (kromosomi 1, X ja 6pter >p21 sisältävä hybridi DNA), mikä osoitti, että *Cdn-1*-geeni on kromosomissa 6, joka on telomeerinen p21:lle. *Cdn-2*-sekvenssit havaittiin NA13140:ssä, mikä osoitti *Cdn-2*-geenin olevan kromosomissa 20, ja *Cdn-3* sekvenssit havaittiin NA10927A:ssa, mikä osoitti *Cdn-3*-geenin olevan kromosomissa 11.

Esimerkki 8

Apoptoosin säätäminen *Cdn-1*:llä ja *Cdn-2*:lla FL5.12 soluissa

FL5.12 on IL-3-riippuva lymfoidin edeltäjäsolulinja (McKearn et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7414-7418), jonka on osoitettu läpikäyvän apoptoosin, joka seuraa IL-3:n poistoa, mutta se suojataan solukuolemalta *Bcl-2*:n yli-ilmentymisellä. Nunez et al. (1990) J. Immunol. 144:3602-3610; ja Hockenbery et al. (1990) Nature 348:334-336. *Cdn-1*:n ja *Cdn-2*:n kyvyn säätää apoptoosia arvioimiseksi cDNA:t, jotka koodaavat *Cdn-1*:tä, *Cdn-2*:ta, kahta *Cdn-1*:n (kuvattu alla) ja *Bcl-2*:n katkaistua muotoa, liga-

toitiin nisäkkään ilmennysvektoriin, pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), ja stabiilisti vietiin hiiren edeltäjä B-lymfosyyttisolulinjaan FL5.12 elektroporaatiolla ja valinnalla väliaineissa, jotka sisälsivät antibioottia G418. Analyysit suoritettiin sitten transformanttien pääosalla kuten alla kuvataan.

Yli-ilmentyneiden geenien vaikutukset FL5.12 solun elinkykyisyyteen tutkittiin eri aikoina IL-3:n poiston jälkeen ja ne esitetään kuvassa 10. Solun elinkykyisyys arvioitiin propidiumjodidin (PI) poissulkemisella virtaussytometrillä (Becton Dickinson FACScan). *Bcl-2*:n ilmentyminen suojasi soluja merkittävästi solukuolemalta, kun taas *Cdn-1* näytti lisäävän solukuolemaa, kun verrattiin vektorikontrolliin. *Cdn-2* ilmentyminen antoi alhaisen suojaustason solukuolemalta aikaisina aikoina, mutta oli merkityksetön myöhemmissä ajankohdissa. Mielenkiitoisesti, *Cdn-1Δ2*:sta saatiin kohtalainen suojaustaso solukuolemaa vastaan. *Cdn-1-112*, molekyyli, joka sisältää *Cdn-1*:n N-päätteen 112 aminohapot, myös näytti osittain suojaavan FL5.12-soluja, vaikka alhaisemmissa tasoissa kuin *Bcl-2*.

Kuten esimerkissä 7 on esitetty, *Cdn-1*:n ja *Cdn-1Δ2*:n ilmentyminen WI-L2-soluissa johti lisääntyneeseen solujen eloonjäämiseen vasteessa anti-Fas-välitteiselle apoptoosille ja seerumin poistolle. Yhdessä nämä tiedot ehdottavat, että erilaiset *Cdn*-molekyylit pystyvät säätämään apoptoosia positiivisella tai negatiivisella tavalla, riippuen solutyypistä ja apoptoottisesta ärsykkeestä. Siten, ne ovat tehokkaita estämään solukuolema, kuten iskeemisen reperfuusiokudosvaurion jälkeen sydämessä tai aiheutettaessa solukuolema soluissa, jotka ovat selviytyneet apoptoottisesta kontrollista, kuten asia on erilaisissa syövissä.

Esimerkki 9

IFN-γ aiheuttaa *Cdn-1* mRNA ilmentymisen HT-29 soluissa

On osoitettu, että ihmisen koolonkarsinoomasolulinja HT-29 on altis anti-Fas-vasta-aineen tai TNF:n sytotoksiselle vaikutukselle vain IFN-γ:llä käsittelyn jälkeen. Yonehara et al. (1989) J. Exp. Med. 169:1747-1756. Nämä IFN-γ:llä käsitellyt solut osoittavat myös lisääntynyttä apoptoosia, joka seuraa seerumipuutetta tai sykloheksimidikäsittelyä. Tämä HT-29-solujen indusoitu herkkyys apoptoottiselle ärsykkeelle voi osittain johtua samanaikaisesta TNF-reseptorin ja Fas-antigeenin säätämisestä ylöspäin, minkä on nähty seuraavan IFN-γ käsittelyä. Yonehara et al. (1989). Lisääntynyt solukuolema, joka nähdään seuraavan seerumipuutetta tai sykloheksimidikäsittelyä, ehdottaa kuitenkin, että IFN-γ voi aiheuttaa muita apoptoottisia mekanismeja.

Bcl-2 suvun jäsenten tasojen säätäminen IFN-γ:llä on toinen mahdollinen mekanismi HT-29 solujen aikaan saadulle herkkyydelle apoptoottisille ärsykkeille. Lisäys *Cdn-1*:n, Bax:n tai *Bcl-x*$_s$:n, ilmentymisessä ja/tai väheneminen *Bcl-2*:n tai *Bcl-x*$_L$:n ilmentymisessä voisi johtaa solujen lisääntyneeseen herkkyyteen sytosidisille aineille. Tämän mahdollisuuden testaamiseksi *Bcl-2* suvun jäsenten mRNA-tasoja käsittelemättömissä ja IFN-γ:llä käsitellyissä HT-29 soluissa tutkittiin Northern blot -analyysillä käyttäen esimerkissä 2 kuvattuja menetelmiä ja olosuhteita. *Cdn-1* mRNA tasoja suurennettiin noin 10x IFN-γ induktion jälkeen, kun taas Bax ja *Bcl-x* mRNA tasot säilytettiin muuttumattomina. *Bcl-2* mRNA oli alle havaittavien tasojen sekä käsittelemättömissä että IFN-γ:llä käsitellyissä soluissa. Säilyi mahdollisena, että *Bcl-x*$_s$:n suhde *Bcl-x*$_L$ kopioihin olisi voinut kasvaa IFN-γ:llä käsittelyn jälkeen, mutta sitä ei havaittaisi Northern blot -analyysillä johtuen pienestä erosta koossa kopioiden välillä. Näin asia oli stimuloimaton vastaan PMA plus ionomysiinillä stimuloitujen tymosyyttien tapauksessa, kuten on määritetty julkaisussa Boise et al. (1993) Cell 74:597-608. Käyt-

täen puolikvantitatiivista PCR:a ne osoittivat, että *Bcl-x_s*:n suhde *Bcl-x_L*:ään kasvoi stimuloinnin seurauksena. Käyttäen samanlaisia PCR-tekniikoita osoitettiin, että *Bcl-x_s*:n suhde *Bcl-x_L* mRNA:han säilyi muuttumattomana HT-29 solujen IFN-γ:llä käsittelyn jälkeen ja että vallitseva kopio oli *Bcl-x_L* (>90 %).

Siten on olemassa positiivinen korrelaatio *Cdn-1* kopioiden ylöspäin säätämisen ja HT-29 kasvainsolujen linjan välillä IFN-γ:llä käsittelyn jälkeen ja kasvanut alttius solukuolemalle. Nämä tulokset osoittavat, että kasvainsoluissa on positiivisia *Cdn-1*:n säätäjiä ja että ne voivat olla käyttökelpoisia hoidettaessa joitakin kasvaimia, kun ne annetaan yhdessä sopivien apoptoosia aiheuttavien aineiden kanssa.

Vaikka edellä olevaa keksintöä on kuvattu melko yksityiskohtaisesti havainnollistamalla ja esimerkillä ymmärtämisen selkeyden tarkoitusta varten, alan ammattimiehelle on ilmeistä, että tiettyjä muutoksia ja modifikaatioita voidaan toteuttaa käytönnässä. Siksi, kuvausta ja esimerkkejä ei tulisi pitää keksinnön piiriä rajoittavina, joka keksintö kuvataan liitteenä olevilla patenttivaatimuksilla.

Patenttivaatimukset

1. Koostumus, joka käsittää oleellisesti puhdistetun nukleotidisekvenssin, joka koodaa *Cdn*:n.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi johdetaan genomisesta DNA:sta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, jossa *Cdn* on *Cdn-1*.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen koostumus, jossa on nukleotidisekvenssi, joka on kuvattu kuvassa 3.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, jossa *Cdn* on *Cdn-2*.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen koostumus, jossa on nukleotidisekvenssi, joka on kuvattu kuvassa 5.

7. Koostumus, joka käsittää rekombinantti DNA-vektorin, joka koodaan Cdn:n.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen koostumus, jossa Cdn on Cdn-1.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen koostumus, jossa Cdn on Cdn-2.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

12. Patenttivaatimuksen 7 mukainen rekombinantti DNA-vektori, jossa sekvenssin, joka koodaan *Cdn*:n, ilmentäminen käyttäen indusoituvan promoottorin kontrollia.

13. Koostumus, joka käsittää solun, joka on transfektoitunut rekombinantti DNA-vektorilla, joka koodaan Cdn:n.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa Cdn on Cdn-1.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvaan kuvassa 3.

16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa Cdn on Cdn-2.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

18. Transgeeninen eläin, joka käsittää rekombinantti DNA-vektorin, joka koodaa Cdn:n.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen transgeeninen eläin, jossa Cdn on Cdn-1.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen transgeeninen eläin, jossa *Cdn* nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen transgeeninen eläin, jossa Cdn on Cdn-2.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen transgeeninen eläin, jossa *Cdn* nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

23. Koostumus, joka käsittää oleellisesti puhdistetun Cdn-proteiinin.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen koostumus, jossa proteiini on Cdn-1.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

26. Patenttivaatimuksen 23 mukainen koostumus, jossa Cdn on Cdn-2.

27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen koostumus, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

28. Patenttivaatimuksen 23 mukainen koostumus, jossa proteiinit ilmennetään rekombinantti DNA:lla.

29. Patenttivaatimuksen 23 mukainen koostumus, jossa proteiinit ovat luontaisia proteiineja.

30. Koostumus, joka käsittää patenttivatimuksen 23 mukaiset proteiinit ja farmaseuttisesti hyväksyttävän puskurin.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen koostumus, jossa proteiinit ovat läsnä terapeuttisesti tehokkaissa määrissä.

32. Koostumus, joka käsittää monoklonaalisen tai polyklonaalisen vasta-aineen, joka tunnistaa Cdn:n, mutta on oleellisesti reagoimaton muiden Bcl-suvun jäsenten kanssa.

33. Menetelmä Cdn-proteiinin läsnäolon havaitsemiseksi biologisessa näytteessä, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

a) saadaan solunäyte;

b) liuotetaan tai permeabilisoidaan solut vasta-aineisiin;

c) lisätään anti-*Cdns*-spesifiset vasta-aineet solunäytteeseen;

d) säilytetään solunäyte olosuhteissa, jotka sallivat vasta-aineiden kompleksoitua cdn:n kanssa; ja

e) havaitaan muodostuneet vasta-aine-*cdn*-kompleksit.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-1.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

36. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-2.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

38. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, jossa solunäyte käsittää T-soluja.

39. Menetelmä *Cdn*-geenin ilmentymisen havaitsemiseksi biologisessa näytteessä, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa identifioidaan RNA:n läsnäolo, joka koodaa cdn:n.

40. Patenttivaatimuksen 39 mukainen menetelmä, jossa menetelmä *Cdn-1* tai *Cdn-2* mRNA:n identifioimiseksi on Northern blottaus.

41. Menetelmä *Cdn* mRNA:n identifioimiseksi, joka käsittää vaiheet, joissa:

a) saadaan solunäyte;

b) saadaan RNA solunäytteestä;

c) suoritetaan polymeraasiketjureaktio RNA:lla käyttäen alukkeita, jotka vastaavat *Cdn*:n ainutlaatuisia alueita; ja

d) havaitaan polymeraasiketjureaktion tuotteiden läsnäolo.

42. Menetelmä apoptoosin aiheuttaman solukuoleman säätämiseksi, joka menetelmä käsittää Cdn:n endogeenisten tasojen säätämisen.

43. Patenttivaatimuksen 40 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-1.

44. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

45. Patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-2.

46. Patenttivaatimuksen 45 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

47. Patenttivaatimuksen 41 mukainen menetelmä, jossa Cdn:a lisätään säätämällä endogeenisen cdn-geenin ilmentymistä.

48. Patenttivaatimuksen 46 mukainen menetelmä, jossa ilmentynyt *Cdn*-geeni koodataan rekombinanttigeenillä.

49. Patenttivaatimuksen 48 mukainen menetelmä, jossa geenin ilmentyminen on indusoituvan promoottorin kontrollissa.

50. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, jossa solut transfektoidaan ex vivo ja joka käsittää edelleen vaiheet, joissa transfektoidut solut viedään uudelleen eläimeen.

51. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, jossa solut ovat T-lymfosyyttejä.

52. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, jossa rekombinanttigeeni transfektoidaan soluihin in vivo.

53. Menetelmä apoptoosin hoitamiseksi potilaassa, joka tarvitsee sitä, joka menetelmä käsittää terapeuttisesti tehokkaan määrän Cdn:a antamisen.

54. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-1.

55. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 3.

56. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä, jossa Cdn on Cdn-2.

57. Patenttivaatimuksen 56 mukainen menetelmä, jossa nukleotidisekvenssi kuvataan kuvassa 5.

58. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä, jossa Cdn annetaan mitä tahansa oiretta varten, jota varten superoksididismutaasi on mainittu.

59. Menetelmä vuorovaikutusten arvioimiseksi Cdn:ien ja proteiinien välillä, jotka sitoutuvat spesifisesti Cdn:iin, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa saatetaan puhdistettu Cdn kosketuksiin solulysaattien kanssa, jotka sisältävät proteiinin, joka voi sitoutua Cdn:ään olosuhteissa, jotka sallivat proteiinin ja Cdn:n sitoutumisen;
eristetään Cdn;
saatetaan eristetty Cdn kosketuksiin sitoutumispartnerin kanssa, joka on spesifinen proteiinille olosuhteissa, jotka sallivat sitoutumispartnerin ja Cdn:n sitoutumisen; ja
mitataan proteiiniin sitoutuneen sitoutumispartnerin määrä.

60. Patenttivaatimuksen 59 mukainen menetelmä, jossa solulysaatti on hiivalysaatti.

61. Patenttivaatimuksen 59 mukainen menetelmä, jossa sitoutumispartneri on vasta-aine.

5'- AGATCTGAATTC AA(C/T) TGG GGI (C/A)GI (A/G)TX GTX GC -3'

Bclx 1-32

5'- AGATCTAAGCTT GTC CCA ICC ICC XTG XTC (C/T)TG (A/T/G)AT CCA -3'

Bclx 2-39

FIG. 1

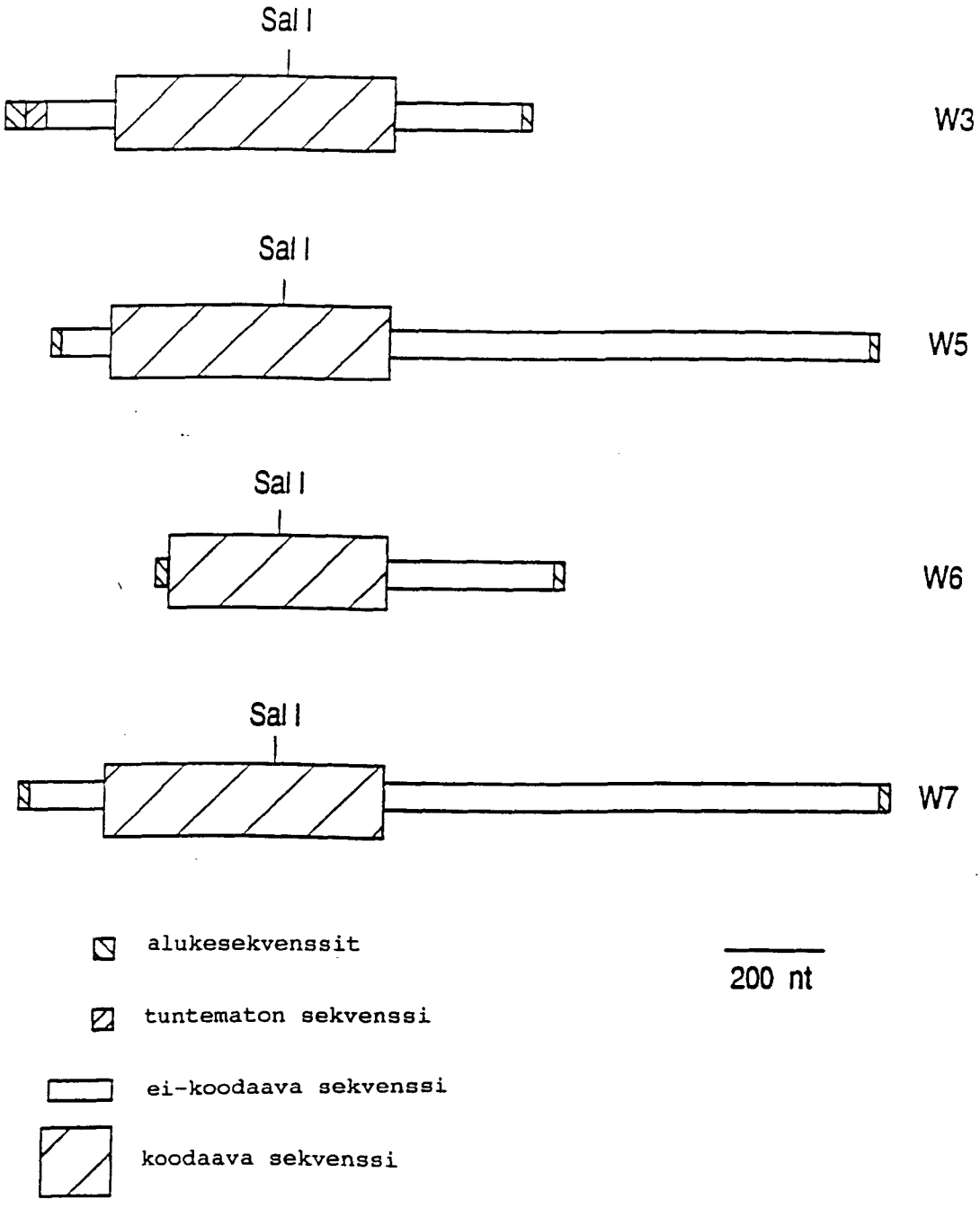
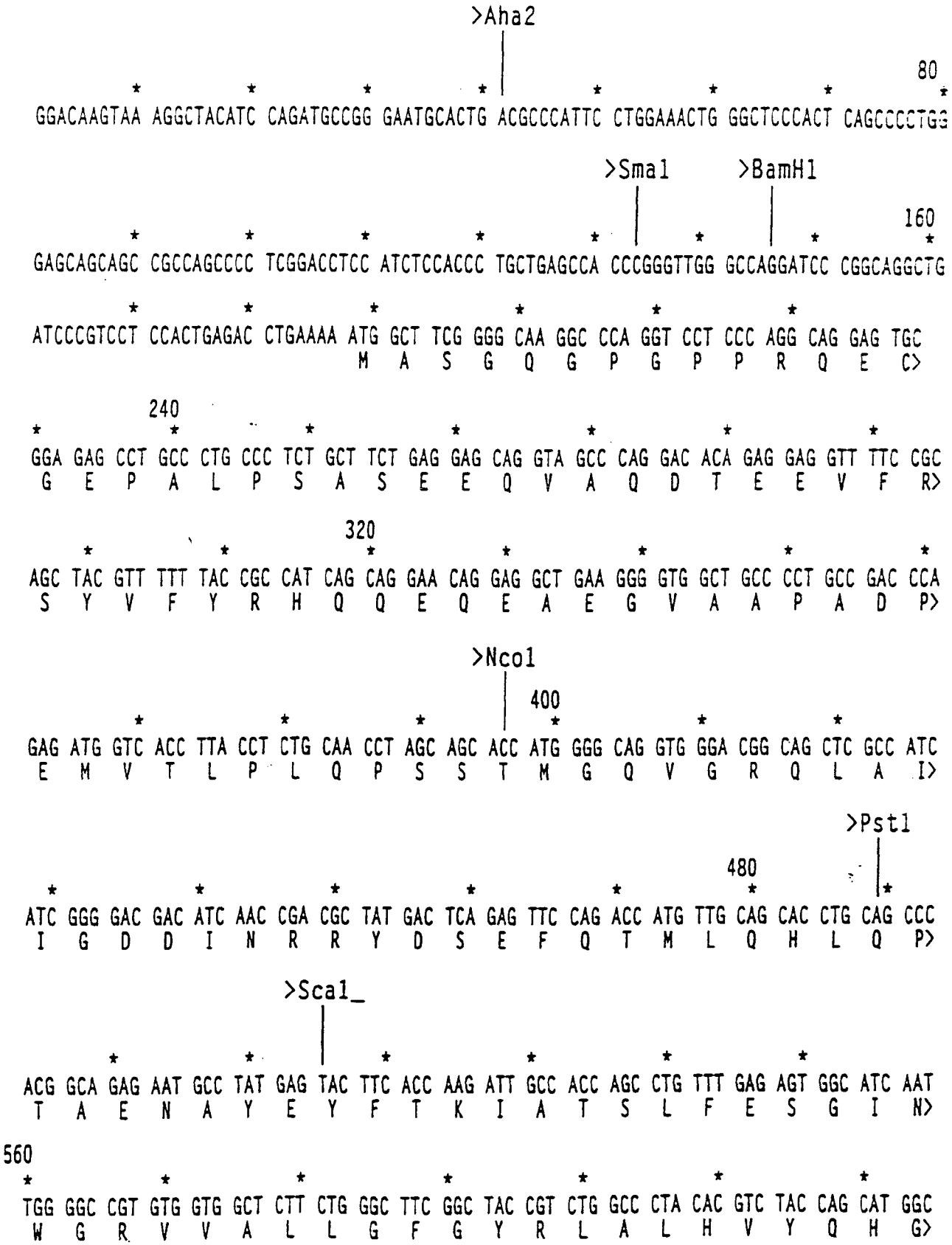

Sal I
W3
Sal I
W5
Sal I
W6
Sal I
W7
alukesekvenssit
tuntematon sekvenssi
ei-koodaava sekvenssi
koodaava sekvenssi
200 nt

FIG. 2


>Aha2
80
GGACAAGTAA AGGCTACATC CAGATGCCGG GAATGCACTG ACGCCCATTC CTGGAAACTG GGCTCCCACT CAGCCCCTGG
>Sma1
>BamH1
160
GAGCAGCAGC CGCCAGCCCC TCGGACCTCC ATCTCCACCC TGCTGAGCCA CCCGGGTTGG GCCAGGATCC CGGCAGGCTG
ATCCCGTCCT CCACTGAGAC CTGAAAA ATG GCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC AGG CAG GAG TGC
M A S G Q G P G P P R Q E C>
240
GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC CGC
G E P A L P S A S E E Q V A Q D T E E V F R>
320
AGC TAC GTT TTT TAC CGC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GTG GCT GCC CCT GCC GAC CCA
S Y V F Y R H Q Q E Q E A E G V A A P A D P>
>Nco1
400
GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC ATC
E M V T L P L Q P S S T M G Q V G R Q L A I>
>Pst1
480
ATC GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG CCC
I G D D I N R R Y D S E F Q T M L Q H L Q P>
>Sca1_
ACG GCA GAG AAT GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC ACC AGC CTG TTT GAG AGT GGC ATC AAT
T A E N A Y E Y F T K I A T S L F E S G I N>
560
TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC GGC TAC CGT CTG GCC CTA CAC GTC TAC CAG CAT GGC
W G R V V A L L G F G Y R L A L H V Y Q H G>
FIG. 3A

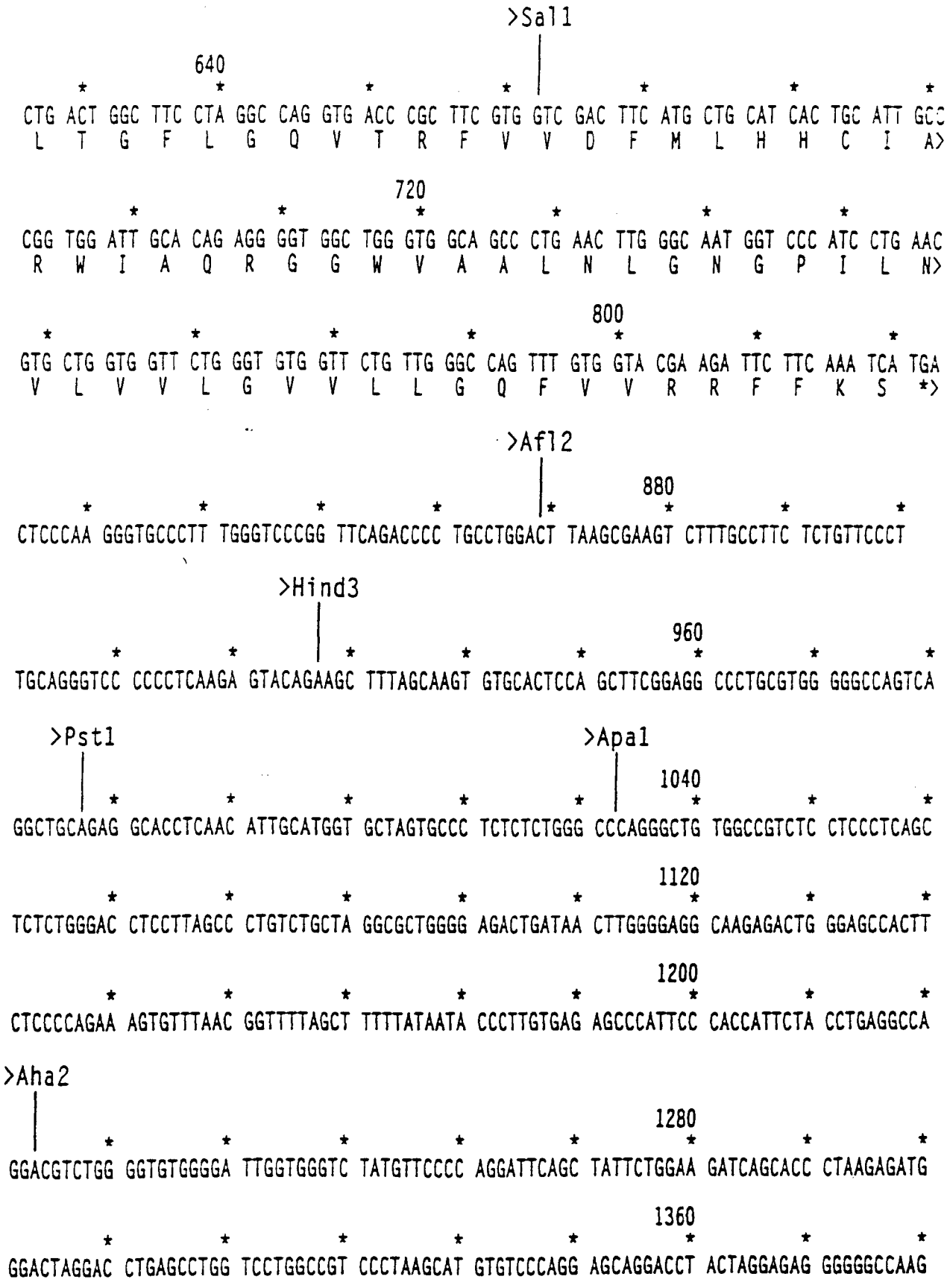

>Sal1
640
CTG ACT GGC TTC CTA GGC CAG GTG ACC CGC TTC GTG GTC GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT GCC
L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I A>
720
CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG AAC
R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L N>
800
GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA TGA
V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S *>
>Afl2
880
CTCCCAA GGGTGCCCTT TGGGTCCCGG TTCAGACCCC TGCCTGGACT TAAGCGAAGT CTTTGCCTTC TCTGTTCCCT
>Hind3
960
TGCAGGGTCC CCCCTCAAGA GTACAGAAGC TTTAGCAAGT GTGCACTCCA GCTTCGGAGG CCCTGCGTGG GGGCCAGTCA
>Pst1
>Apa1
1040
GGCTGCAGAG GCACCTCAAC ATTGCATGGT GCTAGTGCCC TCTCTCTGGG CCCAGGGCTG TGGCCGTCTC CTCCCTCAGC
1120
TCTCTGGGAC CTCCTTAGCC CTGTCTGCTA GGCGCTGGGG AGACTGATAA CTTGGGGAGG CAAGAGACTG GGAGCCACTT
1200
CTCCCCAGAA AGTGTTTAAC GGTTTTAGCT TTTTATAATA CCCTTGTGAG AGCCCATTCC CACCATTCTA CCTGAGGCCA
>Aha2
1280
GGACGTCTGG GGTGTGGGGA TTGGTGGGTC TATGTTCCCC AGGATTCAGC TATTCTGGAA GATCAGCACC CTAAGAGATG
1360
GGACTAGGAC CTGAGCCTGG TCCTGGCCGT CCCTAAGCAT GTGTCCCAGG AGCAGGACCT ACTAGGAGAG GGGGGCCAAG

FIG. 3B

```
                                                                1440
         *         *         *         *         *         *         *         *
GTCCTGCTCA ACTCTACCCC TGCTCCCATT CCTCCCTCCG GCCATACTGC CTTTGCAGTT GGACTCTCAG GGATTCTGGG

                                                                1520
         *         *         *         *         *         *         *         *
CTTGGGGTGT GGGGTGGGGT GGAGTCGCAG ACCAGAGCTG TCTGAACTCA CGTGTCAGAA GCCTCCAAGC CTGCCTCCCA

                                                                1600
         *         *         *         *         *         *         *         *
AGGTCCTCTC AGTTCTCTCC CTTCCTCTCT CCTTATAGAC ACTTGCTCCC AACCCATTCA CTACAGGTGA AGGCTCTCAC

                                                                1680
         *         *         *         *         *         *         *         *
CCATCCCTGG GGGCCTTGGG TGAGTGGCCT GCTAAGGCTC CTCCTTGCCC AGACTACAGG GCTTAGGACT TGGTTTGTTA

                                                                1760
         *         *         *         *         *         *         *         *
TATCAGGGAA AAGGAGTAGG GAGTTCATCT GGAGGGTTCT AAGTGGGAGA AGGACTATCA ACACCACTAG GAATCCCAGA

>BamH1
   |
   |                                                            1840
         *         *         *         *         *         *         *         *
GGTGGATCCT CCCTCATGGC TCTGGCACAG TGTAATCCAG GGGTGTAGAT GGGGGAACTG TGAATACTTG AACTCTGTTC

                                                                1920
         *         *         *         *         *         *         *         *
CCCCACCCTC CATGCTCCTC ACCTGTCTAG GTCTCCTCAG GGTGGGGGGT GACAGTGCCT TCTCTATTGG CACAGCCTAG

                                                                2000
         *         *         *         *         *         *         *         *
GGTCTTGGGG GTCAGGGGGG AGAAGTTCTT GATTCAGCCA AATGCAGGGA GGGGAGGCAG ATGGAGCCCA TAGGCCACCC

         *         *         *         *         *
CCTATCCTCT GAGTGTTTGG AAATAAACTG TGCAATCCCC TCAAAAAAAA AA
```

FIG. 3C

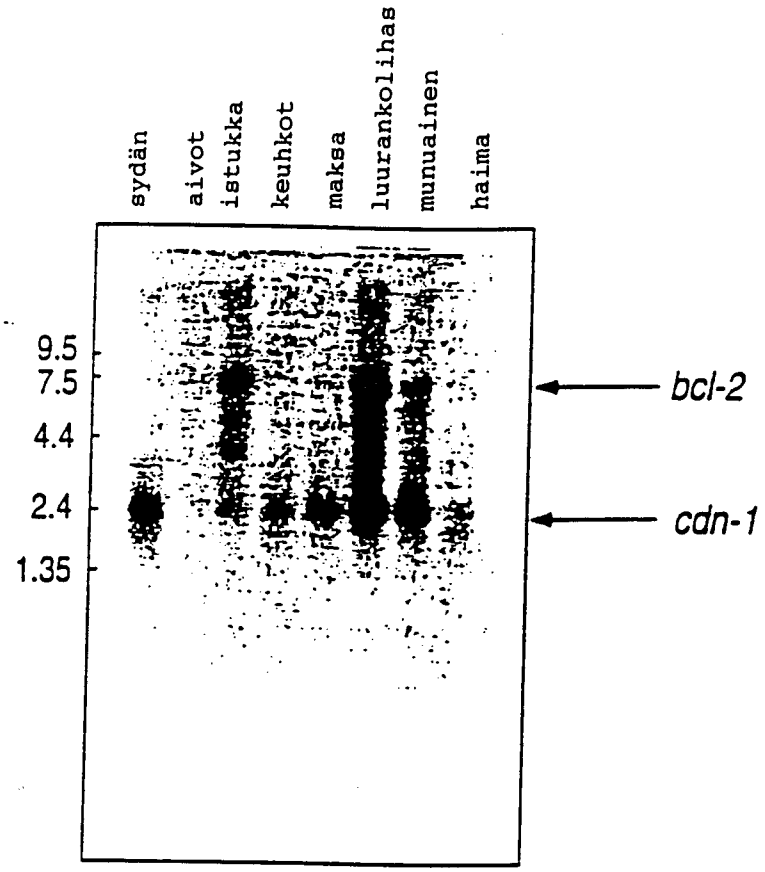

sydän
aivot
istukka
keuhkot
maksa
luurankolihas
munuainen
haima
9.5
7.5
4.4
2.4
1.35
bcl-2
cdn-1

FIG. 4

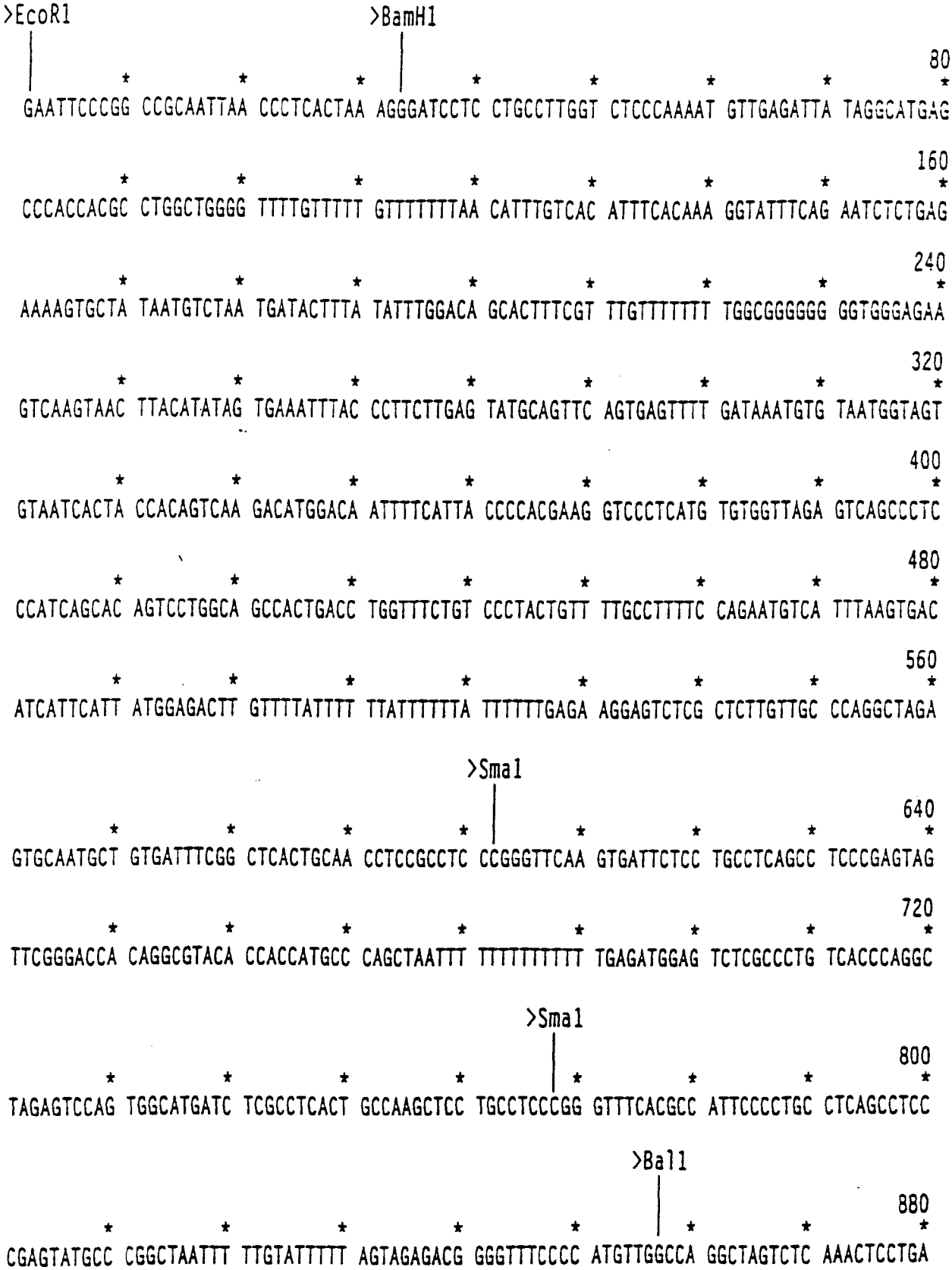

>EcoR1
>BamH1
80
GAATTCCCGG CCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGGATCCTC CTGCCTTGGT CTCCCAAAAT GTTGAGATTA TAGGCATGAG
160
CCCACCACGC CTGGCTGGGG TTTTGTTTTT GTTTTTTTAA CATTTGTCAC ATTTCACAAA GGTATTTCAG AATCTCTGAG
240
AAAAGTGCTA TAATGTCTAA TGATACTTTA TATTTGGACA GCACTTTCGT TTGTTTTTTT TGGCGGGGGG GGTGGGAGAA
320
GTCAAGTAAC TTACATATAG TGAAATTTAC CCTTCTTGAG TATGCAGTTC AGTGAGTTTT GATAAATGTG TAATGGTAGT
400
GTAATCACTA CCACAGTCAA GACATGGACA ATTTTCATTA CCCCACGAAG GTCCCTCATG TGTGGTTAGA GTCAGCCCTC
480
CCATCAGCAC AGTCCTGGCA GCCACTGACC TGGTTTCTGT CCCTACTGTT TTGCCTTTTC CAGAATGTCA TTTAAGTGAC
560
ATCATTCATT ATGGAGACTT GTTTTATTTT TTATTTTTTA TTTTTTGAGA AGGAGTCTCG CTCTTGTTGC CCAGGCTAGA
>Sma1
640
GTGCAATGCT GTGATTTCGG CTCACTGCAA CCTCCGCCTC CCGGGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTCAGCC TCCCGAGTAG
720
TTCGGGACCA CAGGCGTACA CCACCATGCC CAGCTAATTT TTTTTTTTTT TGAGATGGAG TCTCGCCCTG TCACCCAGGC
>Sma1
800
TAGAGTCCAG TGGCATGATC TCGCCTCACT GCCAAGCTCC TGCCTCCCGG GTTTCACGCC ATTCCCCTGC CTCAGCCTCC
>Ball
880
CGAGTATGCC CGGCTAATTT TTGTATTTTT AGTAGAGACG GGGTTTCCCC ATGTTGGCCA GGCTAGTCTC AAACTCCTGA

FIG. 5A

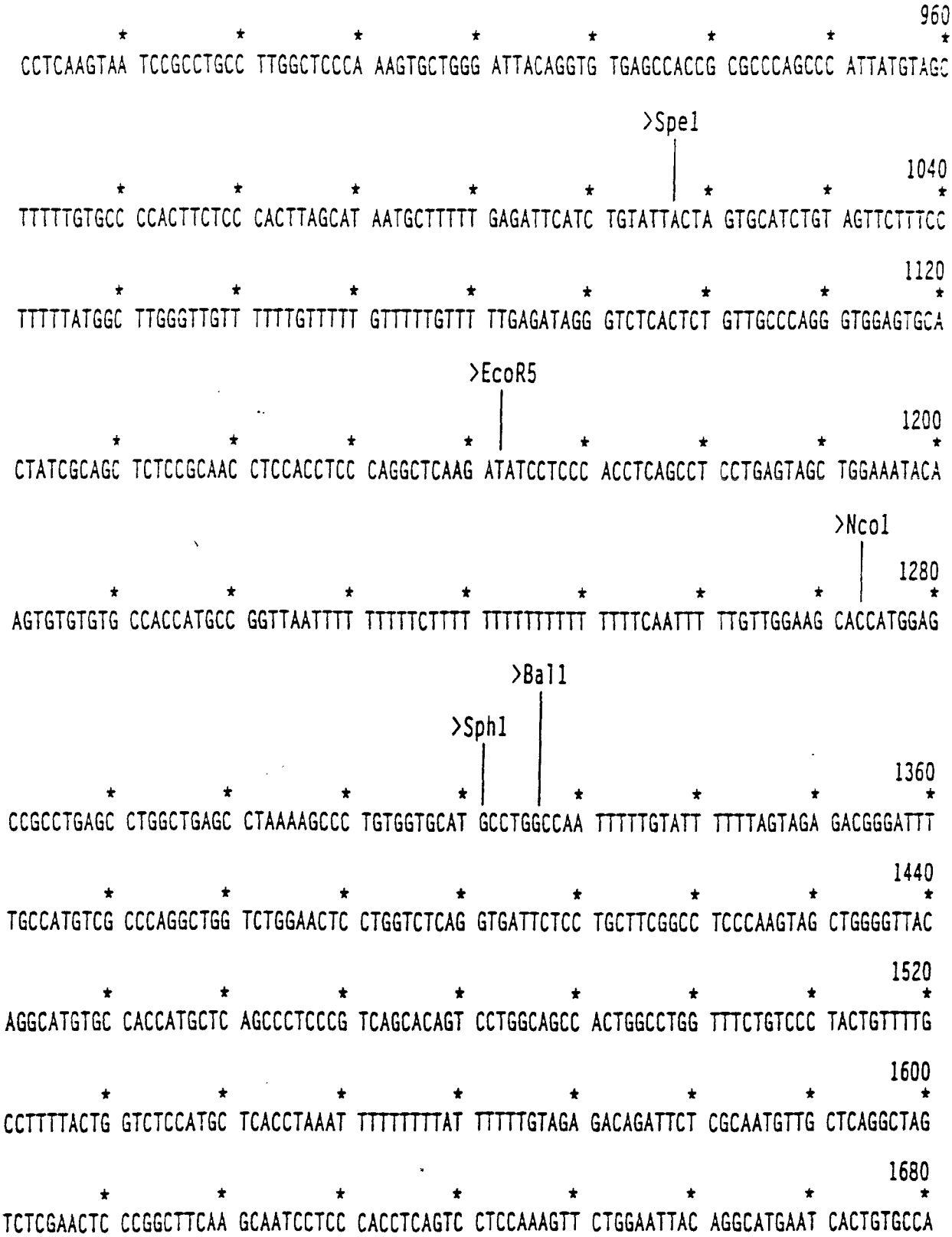

960
CCTCAAGTAA TCCGCCTGCC TTGGCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGTG TGAGCCACCG CGCCCAGCCC ATTATGTAGC
>Spe1
1040
TTTTTGTGCC CCACTTCTCC CACTTAGCAT AATGCTTTTT GAGATTCATC TGTATTACTA GTGCATCTGT AGTTCTTTCC
1120
TTTTTATGGC TTGGGTTGTT TTTTGTTTTT GTTTTTGTTT TTGAGATAGG GTCTCACTCT GTTGCCCAGG GTGGAGTGCA
>EcoR5
1200
CTATCGCAGC TCTCCGCAAC CTCCACCTCC CAGGCTCAAG ATATCCTCCC ACCTCAGCCT CCTGAGTAGC TGGAAATACA
>Nco1
1280
AGTGTGTGTG CCACCATGCC GGTTAATTTT TTTTTCTTTT TTTTTTTTTT TTTTCAATTT TTGTTGGAAG CACCATGGAG
>Ball
>Sph1
1360
CCGCCTGAGC CTGGCTGAGC CTAAAAGCCC TGTGGTGCAT GCCTGGCCAA TTTTTGTATT TTTTAGTAGA GACGGGATTT
1440
TGCCATGTCG CCCAGGCTGG TCTGGAACTC CTGGTCTCAG GTGATTCTCC TGCTTCGGCC TCCCAAGTAG CTGGGGTTAC
1520
AGGCATGTGC CACCATGCTC AGCCCTCCCG TCAGCACAGT CCTGGCAGCC ACTGGCCTGG TTTCTGTCCC TACTGTTTTG
1600
CCTTTTACTG GTCTCCATGC TCACCTAAAT TTTTTTTTAT TTTTTGTAGA GACAGATTCT CGCAATGTTG CTCAGGCTAG
1680
TCTCGAACTC CCGGCTTCAA GCAATCCTCC CACCTCAGTC CTCCAAAGTT CTGGAATTAC AGGCATGAAT CACTGTGCCA

FIG. 5B

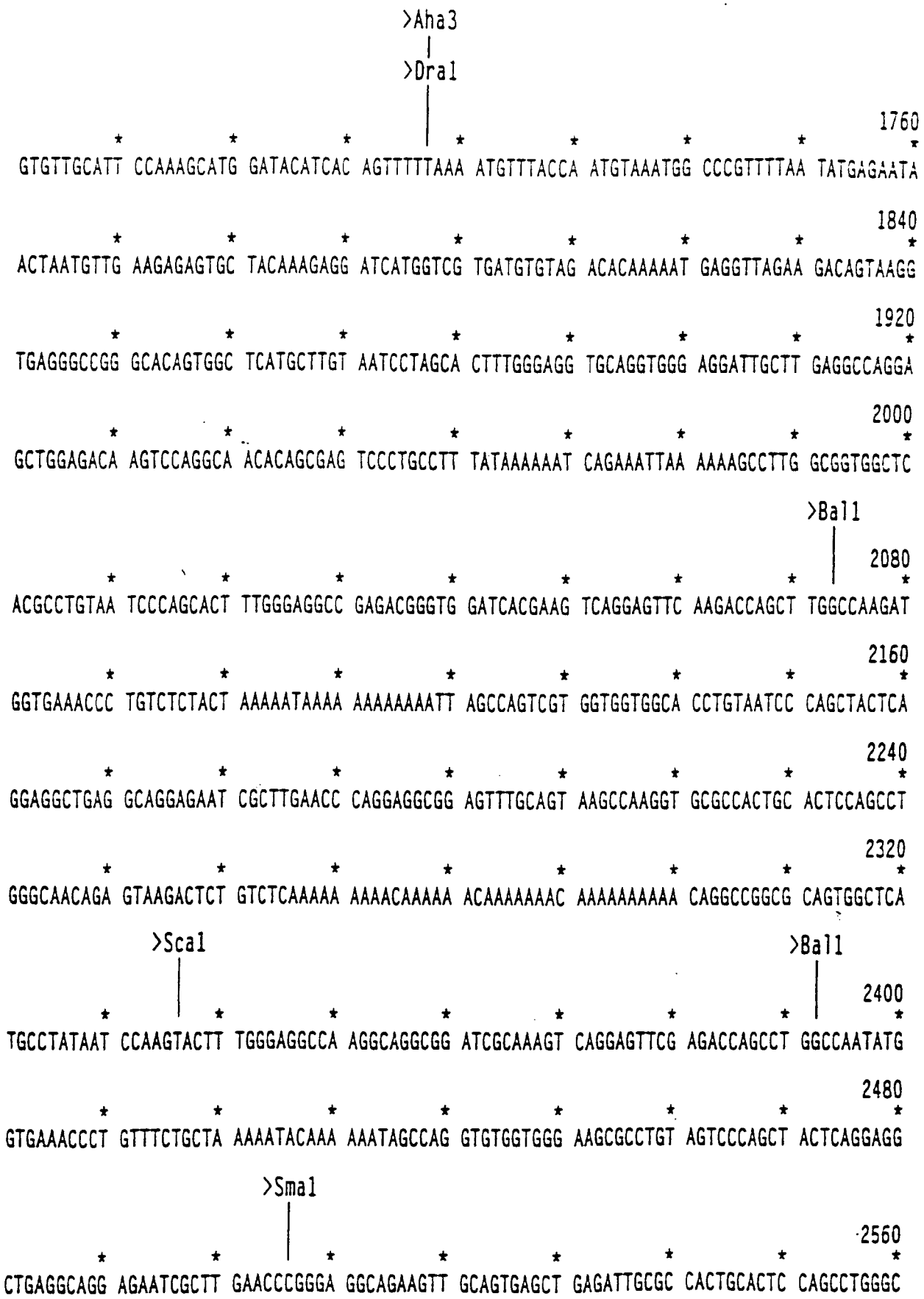

>Aha3
>Dra1
1760
GTGTTGCATT CCAAAGCATG GATACATCAC AGTTTTTAAA ATGTTTACCA ATGTAAATGG CCCGTTTTAA TATGAGAATA
1840
ACTAATGTTG AAGAGAGTGC TACAAAGAGG ATCATGGTCG TGATGTGTAG ACACAAAAAT GAGGTTAGAA GACAGTAAGG
1920
TGAGGGCCGG GCACAGTGGC TCATGCTTGT AATCCTAGCA CTTTGGGAGG TGCAGGTGGG AGGATTGCTT GAGGCCAGGA
2000
GCTGGAGACA AGTCCAGGCA ACACAGCGAG TCCCTGCCTT TATAAAAAAT CAGAAATTAA AAAAGCCTTG GCGGTGGCTC
>Ball
2080
ACGCCTGTAA TCCCAGCACT TTGGGAGGCC GAGACGGGTG GATCACGAAG TCAGGAGTTC AAGACCAGCT TGGCCAAGAT
2160
GGTGAAACCC TGTCTCTACT AAAAATAAAA AAAAAAAATT AGCCAGTCGT GGTGGTGGCA CCTGTAATCC CAGCTACTCA
2240
GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC CAGGAGGCGG AGTTTGCAGT AAGCCAAGGT GCGCCACTGC ACTCCAGCCT
2320
GGGCAACAGA GTAAGACTCT GTCTCAAAAA AAAACAAAAA ACAAAAAAAC AAAAAAAAAA CAGGCCGGCG CAGTGGCTCA
>Sca1
>Ball
2400
TGCCTATAAT CCAAGTACTT TGGGAGGCCA AGGCAGGCGG ATCGCAAAGT CAGGAGTTCG AGACCAGCCT GGCCAATATG
2480
GTGAAACCCT GTTTCTGCTA AAAATACAAA AAATAGCCAG GTGTGGTGGG AAGCGCCTGT AGTCCCAGCT ACTCAGGAGG
>Sma1
2560
CTGAGGCAGG AGAATCGCTT GAACCCGGGA GGCAGAAGTT GCAGTGAGCT GAGATTGCGC CACTGCACTC CAGCCTGGGC

FIG. 5C

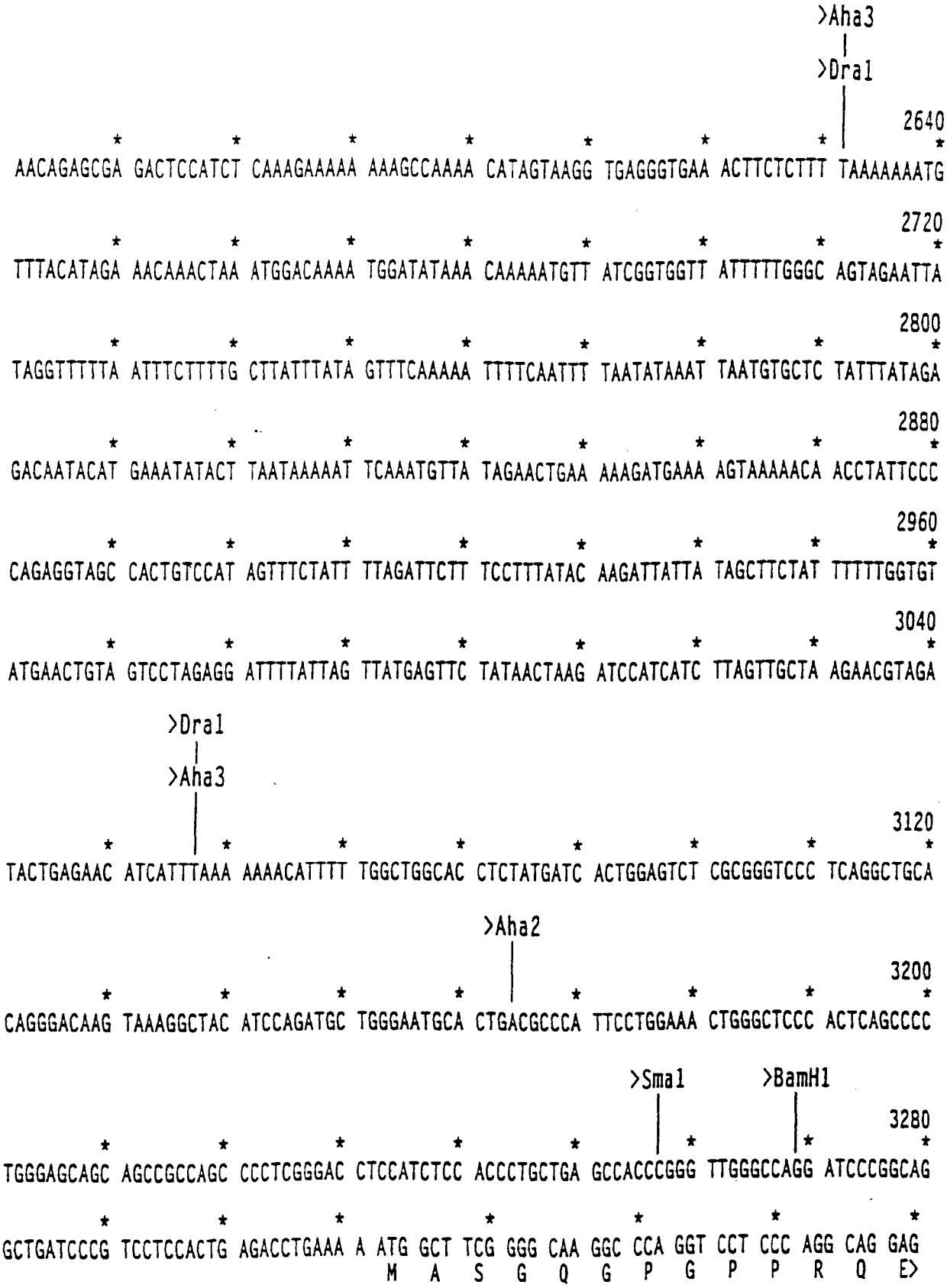
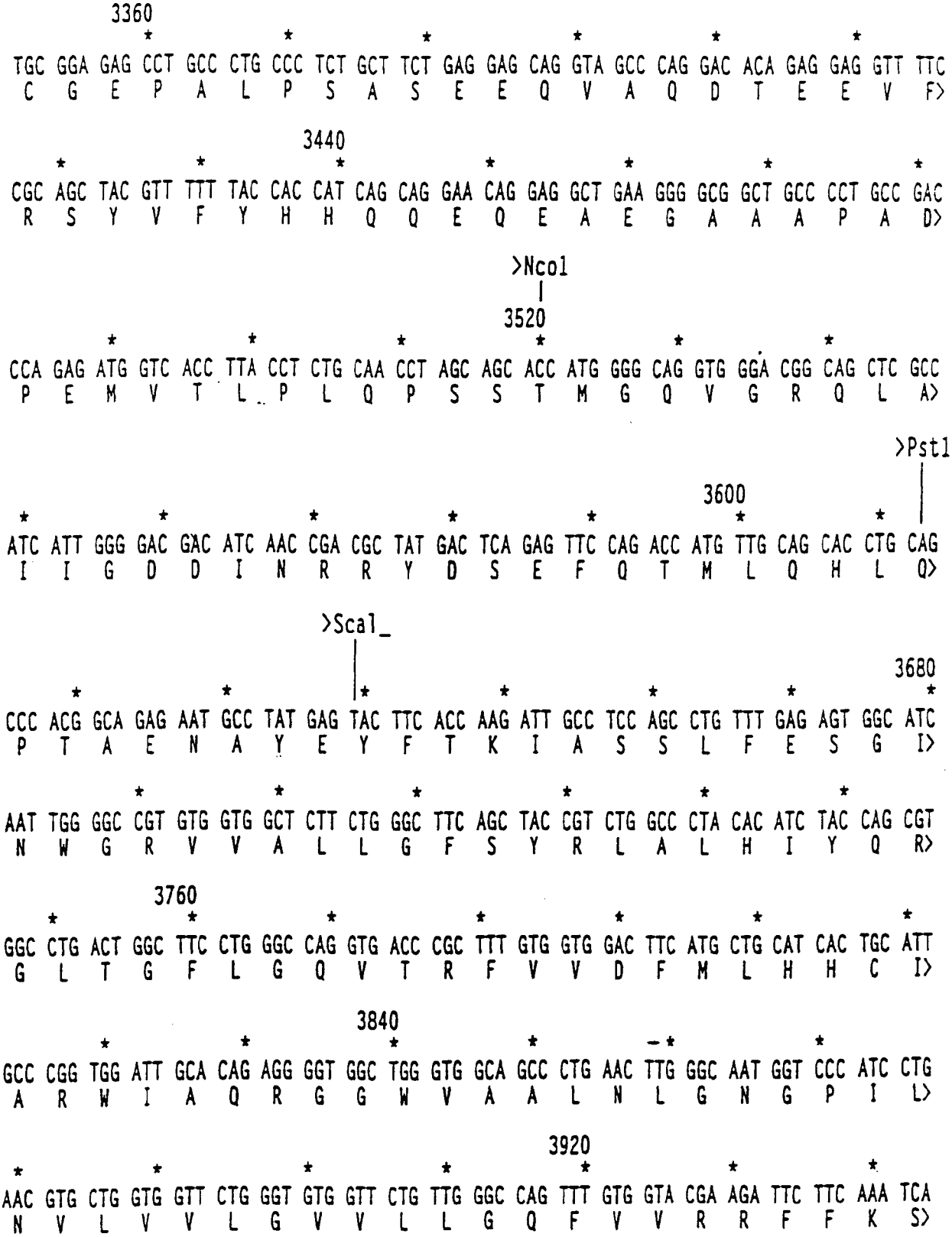

>Aha3
>Dra1
2640
AACAGAGCGA GACTCCATCT CAAAGAAAAA AAAGCCAAAA CATAGTAAGG TGAGGGTGAA ACTTCTCTTT TAAAAAAATG
2720
TTTACATAGA AACAAACTAA ATGGACAAAA TGGATATAAA CAAAAATGTT ATCGGTGGTT ATTTTTGGGC AGTAGAATTA
2800
TAGGTTTTTA ATTTCTTTTG CTTATTTATA GTTTCAAAAA TTTTCAATTT TAATATAAAT TAATGTGCTC TATTTATAGA
2880
GACAATACAT GAAATATACT TAATAAAAAT TCAAATGTTA TAGAACTGAA AAAGATGAAA AGTAAAAACA ACCTATTCCC
2960
CAGAGGTAGC CACTGTCCAT AGTTTCTATT TTAGATTCTT TCCTTTATAC AAGATTATTA TAGCTTCTAT TTTTTGGTGT
3040
ATGAACTGTA GTCCTAGAGG ATTTTATTAG TTATGAGTTC TATAACTAAG ATCCATCATC TTAGTTGCTA AGAACGTAGA
>Dra1
>Aha3
3120
TACTGAGAAC ATCATTTAAA AAAACATTTT TGGCTGGCAC CTCTATGATC ACTGGAGTCT CGCGGGTCCC TCAGGCTGCA
>Aha2
3200
CAGGGACAAG TAAAGGCTAC ATCCAGATGC TGGGAATGCA CTGACGCCCA TTCCTGGAAA CTGGGCTCCC ACTCAGCCCC
>Sma1
>BamH1
3280
TGGGAGCAGC AGCCGCCAGC CCCTCGGGAC CTCCATCTCC ACCCTGCTGA GCCACCCGGG TTGGGCCAGG ATCCCGGCAG
GCTGATCCCG TCCTCCACTG AGACCTGAAA A ATG GCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC AGG CAG GAG
M A S G Q G P G P P R Q E>

FIG. 5D


3360
TGC GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC
C G E P A L P S A S E E Q V A Q D T E E V F>
3440
CGC AGC TAC GTT TTT TAC CAC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GCG GCT GCC CCT GCC GAC
R S Y V F Y H H Q Q E Q E A E G A A A P A D>
>Ncol
3520
CCA GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC
P E M V T L P L Q P S S T M G Q V G R Q L A>
>Pst1
3600
ATC ATT GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG
I I G D D I N R R Y D S E F Q T M L Q H L Q>
>ScaI_
3680
CCC ACG GCA GAG AAT GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC TCC AGC CTG TTT GAG AGT GGC ATC
P T A E N A Y E Y F T K I A S S L F E S G I>
AAT TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC AGC TAC CGT CTG GCC CTA CAC ATC TAC CAG CGT
N W G R V V A L L G F S Y R L A L H I Y Q R>
3760
GGC CTG ACT GGC TTC CTG GGC CAG GTG ACC CGC TTT GTG GTG GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT
G L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I>
3840
GCC CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG
A R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L>
3920
AAC GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA
N V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S>
FIG. 5E

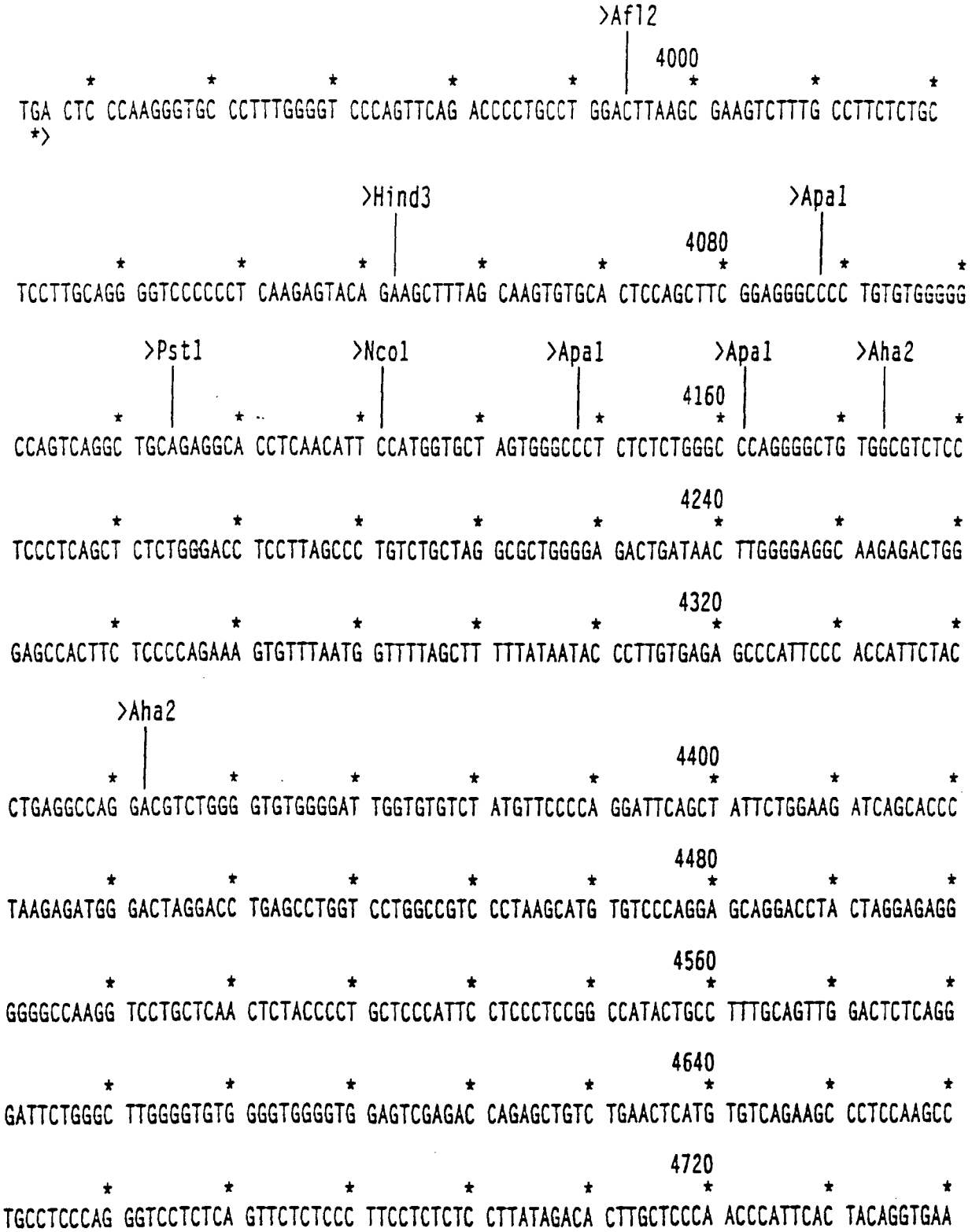

>Afl2
4000
TGA CTC CCAAGGGTGC CCTTTGGGGT CCCAGTTCAG ACCCCTGCCT GGACTTAAGC GAAGTCTTTG CCTTCTCTGC
*>
>Hind3
>Apa1
4080
TCCTTGCAGG GGTCCCCCCT CAAGAGTACA GAAGCTTTAG CAAGTGTGCA CTCCAGCTTC GGAGGGCCCC TGTGTGGGGG
>Pst1
>Nco1
>Apa1
>Apa1
>Aha2
4160
CCAGTCAGGC TGCAGAGGCA CCTCAACATT CCATGGTGCT AGTGGGCCCT CTCTCTGGGC CCAGGGGCTG TGGCGTCTCC
4240
TCCCTCAGCT CTCTGGGACC TCCTTAGCCC TGTCTGCTAG GCGCTGGGGA GACTGATAAC TTGGGGAGGC AAGAGACTGG
4320
GAGCCACTTC TCCCCAGAAA GTGTTTAATG GTTTTAGCTT TTTATAATAC CCTTGTGAGA GCCCATTCCC ACCATTCTAC
>Aha2
4400
CTGAGGCCAG GACGTCTGGG GTGTGGGGAT TGGTGTGTCT ATGTTCCCCA GGATTCAGCT ATTCTGGAAG ATCAGCACCC
4480
TAAGAGATGG GACTAGGACC TGAGCCTGGT CCTGGCCGTC CCTAAGCATG TGTCCCAGGA GCAGGACCTA CTAGGAGAGG
4560
GGGGCCAAGG TCCTGCTCAA CTCTACCCCT GCTCCCATTC CTCCCTCCGG CCATACTGCC TTTGCAGTTG GACTCTCAGG
4640
GATTCTGGGC TTGGGGTGTG GGGTGGGGTG GAGTCGAGAC CAGAGCTGTC TGAACTCATG TGTCAGAAGC CCTCCAAGCC
4720
TGCCTCCCAG GGTCCTCTCA GTTCTCTCCC TTCCTCTCTC CTTATAGACA CTTGCTCCCA ACCCATTCAC TACAGGTGAA

FIG. 5F

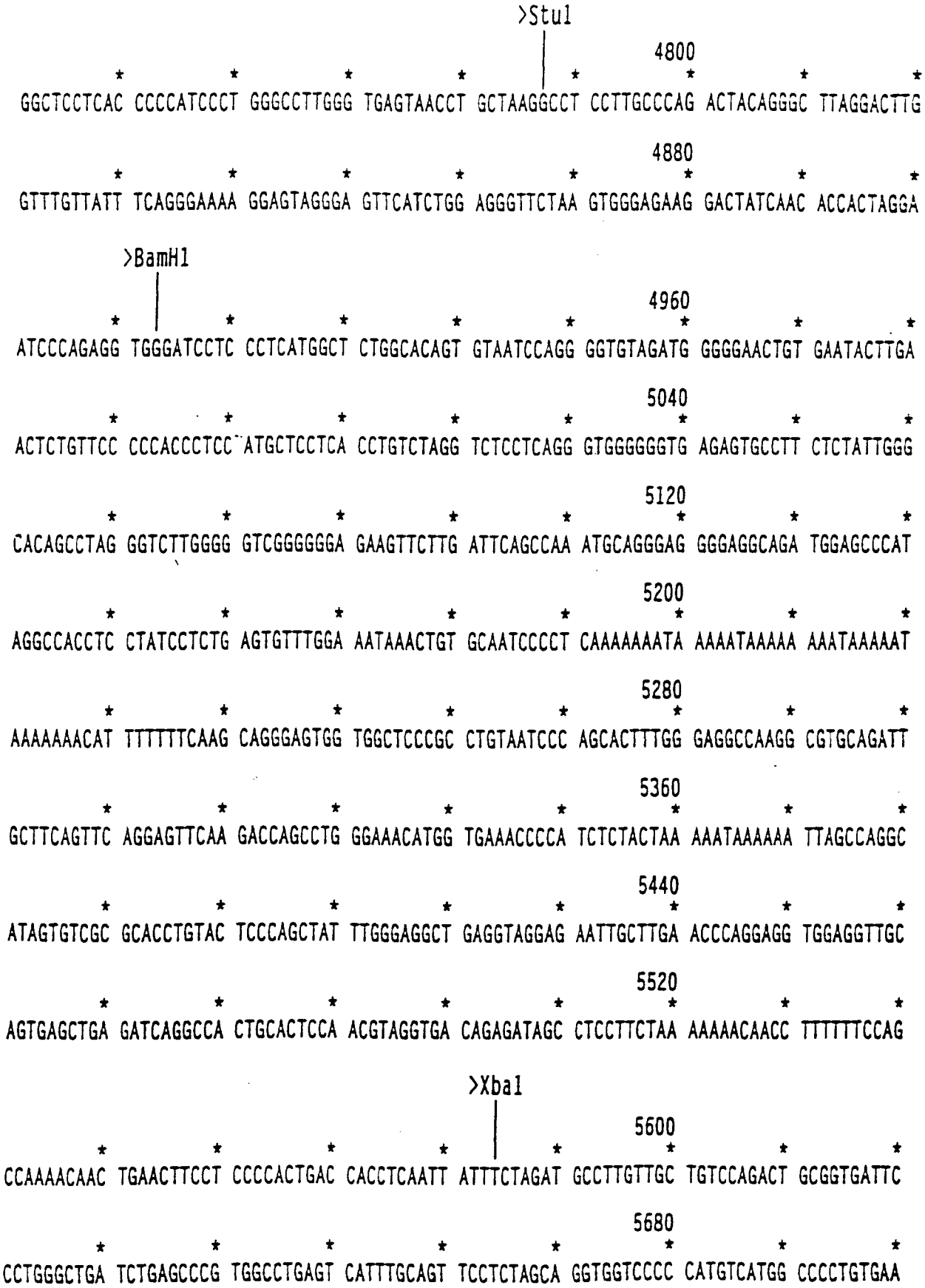

>StuI
4800
GGCTCCTCAC CCCCATCCCT GGGCCTTGGG TGAGTAACCT GCTAAGGCCT CCTTGCCCAG ACTACAGGGC TTAGGACTTG
4880
GTTTGTTATT TCAGGGAAAA GGAGTAGGGA GTTCATCTGG AGGGTTCTAA GTGGGAGAAG GACTATCAAC ACCACTAGGA
>BamH1
4960
ATCCCAGAGG TGGGATCCTC CCTCATGGCT CTGGCACAGT GTAATCCAGG GGTGTAGATG GGGGAACTGT GAATACTTGA
5040
ACTCTGTTCC CCCACCCTCC ATGCTCCTCA CCTGTCTAGG TCTCCTCAGG GTGGGGGGTG AGAGTGCCTT CTCTATTGGG
5120
CACAGCCTAG GGTCTTGGGG GTCGGGGGGA GAAGTTCTTG ATTCAGCCAA ATGCAGGGAG GGGAGGCAGA TGGAGCCCAT
5200
AGGCCACCTC CTATCCTCTG AGTGTTTGGA AATAAACTGT GCAATCCCCT CAAAAAAATA AAAATAAAAA AAATAAAAAT
5280
AAAAAAACAT TTTTTTCAAG CAGGGAGTGG TGGCTCCCGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GAGGCCAAGG CGTGCAGATT
5360
GCTTCAGTTC AGGAGTTCAA GACCAGCCTG GGAAACATGG TGAAACCCCA TCTCTACTAA AAATAAAAAA TTAGCCAGGC
5440
ATAGTGTCGC GCACCTGTAC TCCCAGCTAT TTGGGAGGCT GAGGTAGGAG AATTGCTTGA ACCCAGGAGG TGGAGGTTGC
5520
AGTGAGCTGA GATCAGGCCA CTGCACTCCA ACGTAGGTGA CAGAGATAGC CTCCTTCTAA AAAAACAACC TTTTTTCCAG
>XbaI
5600
CCAAAACAAC TGAACTTCCT CCCCACTGAC CACCTCAATT ATTTCTAGAT GCCTTGTTGC TGTCCAGACT GCGGTGATTC
5680
CCTGGGCTGA TCTGAGCCCG TGGCCTGAGT CATTTGCAGT TCCTCTAGCA GGTGGTCCCC CATGTCATGG CCCCTGTGAA

FIG. 5G

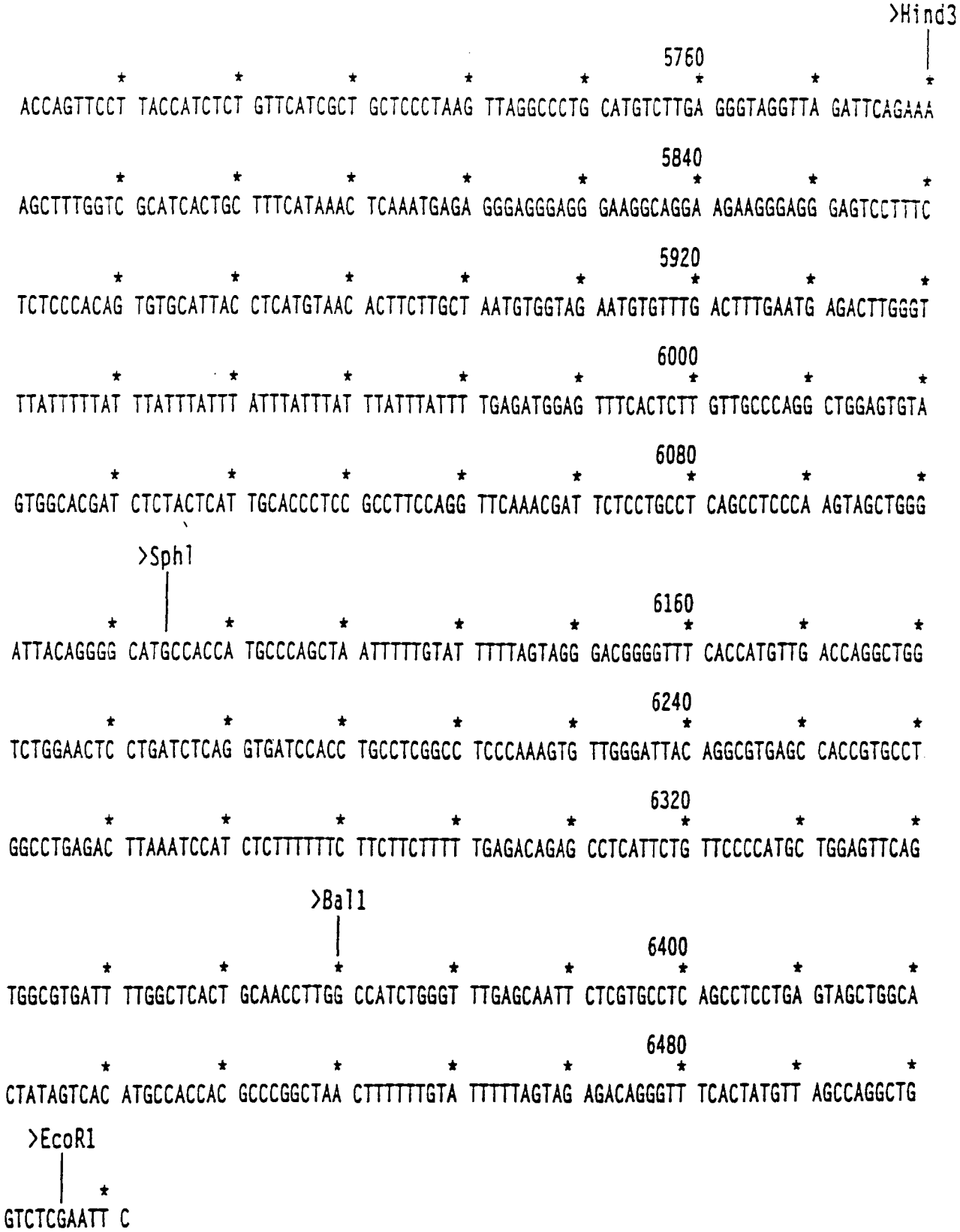

>Hind3
5760
ACCAGTTCCT TACCATCTCT GTTCATCGCT GCTCCCTAAG TTAGGCCCTG CATGTCTTGA GGGTAGGTTA GATTCAGAAA
5840
AGCTTTGGTC GCATCACTGC TTTCATAAAC TCAAATGAGA GGGAGGGAGG GAAGGCAGGA AGAAGGGAGG GAGTCCTTTC
5920
TCTCCCACAG TGTGCATTAC CTCATGTAAC ACTTCTTGCT AATGTGGTAG AATGTGTTTG ACTTTGAATG AGACTTGGGT
6000
TTATTTTTAT TTATTTATTT ATTTATTTAT TTATTTATTT TGAGATGGAG TTTCACTCTT GTTGCCCAGG CTGGAGTGTA
6080
GTGGCACGAT CTCTACTCAT TGCACCCTCC GCCTTCCAGG TTCAAACGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCA AGTAGCTGGG
>Sph1
6160
ATTACAGGGG CATGCCACCA TGCCCAGCTA ATTTTTGTAT TTTTAGTAGG GACGGGGTTT CACCATGTTG ACCAGGCTGG
6240
TCTGGAACTC CTGATCTCAG GTGATCCACC TGCCTCGGCC TCCCAAAGTG TTGGGATTAC AGGCGTGAGC CACCGTGCCT
6320
GGCCTGAGAC TTAAATCCAT CTCTTTTTTC TTCTTCTTTT TGAGACAGAG CCTCATTCTG TTCCCCATGC TGGAGTTCAG
>Ball
6400
TGGCGTGATT TTGGCTCACT GCAACCTTGG CCATCTGGGT TTGAGCAATT CTCGTGCCTC AGCCTCCTGA GTAGCTGGCA
6480
CTATAGTCAC ATGCCACCAC GCCCGGCTAA CTTTTTTGTA TTTTTAGTAG AGACAGGGTT TCACTATGTT AGCCAGGCTG
>EcoR1
GTCTCGAATT C

FIG. 5H


cdn1 masgqgpgpprqecgepalpsaseeqvaqdteevfrsyvfyrhqqeqeaegvaapadpemvt
cdn2 masgqgpgpprqecgepalpsaseeqvaqdteevfrsyvfyHhqqeqeaegAaapadpemvt
bcl2 mahagrtgyDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWdagdvgaappgaapapgifssqpghtphtaasrdpvartsplqtpaapgaa
bax mdgsgeqprgggptsseqimktgalllqgfiqdragrmggeap
bcl-x msqSNRELVVDFLSYKLSQKGYSWsqfsdveenrteapegtesemetpsaingnpswhladspavngatghsssl
mcl-1 ...(+123 aa)eldgyepeplgkrpavlpllelvgesGnntstdgslpstpppaeeeedelyrqsleiisrylreqatgakdtk
A1 maeselmhihslaehylqyvlq
bhrf maystreillalcirdsrvhgngtlhpvlelaar
LMW5-HL megeeliyhniineilvgy
ced9 mtrctadnsltnpayrrrtmatgemkeflgikgteptdfginsdaqdlpspsrqastrrmsigesidgkindweeprlDIEGFVVDYFTHRIRQNGMEWfgapg
cdn1 lplqpsstmgQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGI-NWGRVVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
cdn2 lplqpsstmgQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIASSLFESGI-NWGRVVALLGFSYRLALHIYQRGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
bcl2 agpalspvppVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSRQLHLtpftargRFATVVEELFRDGV-NWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEY-LNR
bax elaldpvpqdastkklseclkrigdeldsnmelqrmiaavdtdsprevFFRVAADMFSDGNFNWGRVVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDF-LRE
bcl-x darevipma-AVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELFRDGV-NWGRIVAFFSFGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAWMATY-LND
mcl-1 pmgrsgatsrkalETLRRVGDGVQRNHETVFQGMLRKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDGVTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKTINQESCIEPLAESITD-VLVR
A1 vpafesapsqacrvlqrvafsvqkeveknlksylddfhvesidtariiFNQVMEKEFEDGIINWGRIVTIFAFGGVLLKKLpqeqialdvcaykqvssfvaefi
bhrf etplrlspedtvvlryhvlleeiiernsetftetwnrfithtehvdldfnsvfleifhD-LINWGRICGFIVFSARMAKYCKDANn-HLESTVITTAYNF-SEG
LMW5-HL ikyymndihelspyqqqikkiltyydeclnkqvtitfsltnaqeiktQFTGVVTELFKrgdpslgralawmawcmhacrtlccnqstpyyvvdlsvrgmleaM-
ced9 lpcgvqpehemmrvmgtifekkhaenfetfceqLlavprisfslyqdvvrtvgnaqtdqcpMSYGRLIGLISFGGFVAAKMmesvelqgqvrnlfvytslfIKT
cdn1 CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvvlgvvllgqfvvrrffks
cdn2 CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvvlgvvllgqfvvrrffks
bcl2 HLHT--WI--QDNGGWDAFVELYgpsmrplfdfswlslktllslalvgacitlgaylghk
bax RLLG--WI--QDQGGWDGLLSYFgtptwqtvtifvagvltasltiwkkmg
bcl-x HLEP--WI--QENGGWDTFVELYgnnaaaesrkgqerfnrwfltgmtvagvvllgslfsrk
mcl-1 TKRD--WLVKQ--RGWDGFVEFFhvedleggirnvllafagvagvgaglaylir
A1 MNNTGEWI-RQ-NGGWEdgfikkfepksgwltflqmtgqiwemlfllk
bhrf -LDG--WIHQG--GGWStliednipgsrrfswtlflagltlsllvicsylfisrgrh
LMW5-HL KHNLLPWMISH--GGQEEFLAFslhsqiysvifnikyflskfcnhhflrscvqllrkcnli
ced9 -RIRNNWKE-H-NRSWDDFMTLgkqmkedyeraeaekvgrrkqnrrwsmigagvtagaigivgvvvcgrmmfslk
sukvanssi-identtisyys
cdn1/cdn2 = 97%

FIG. 6

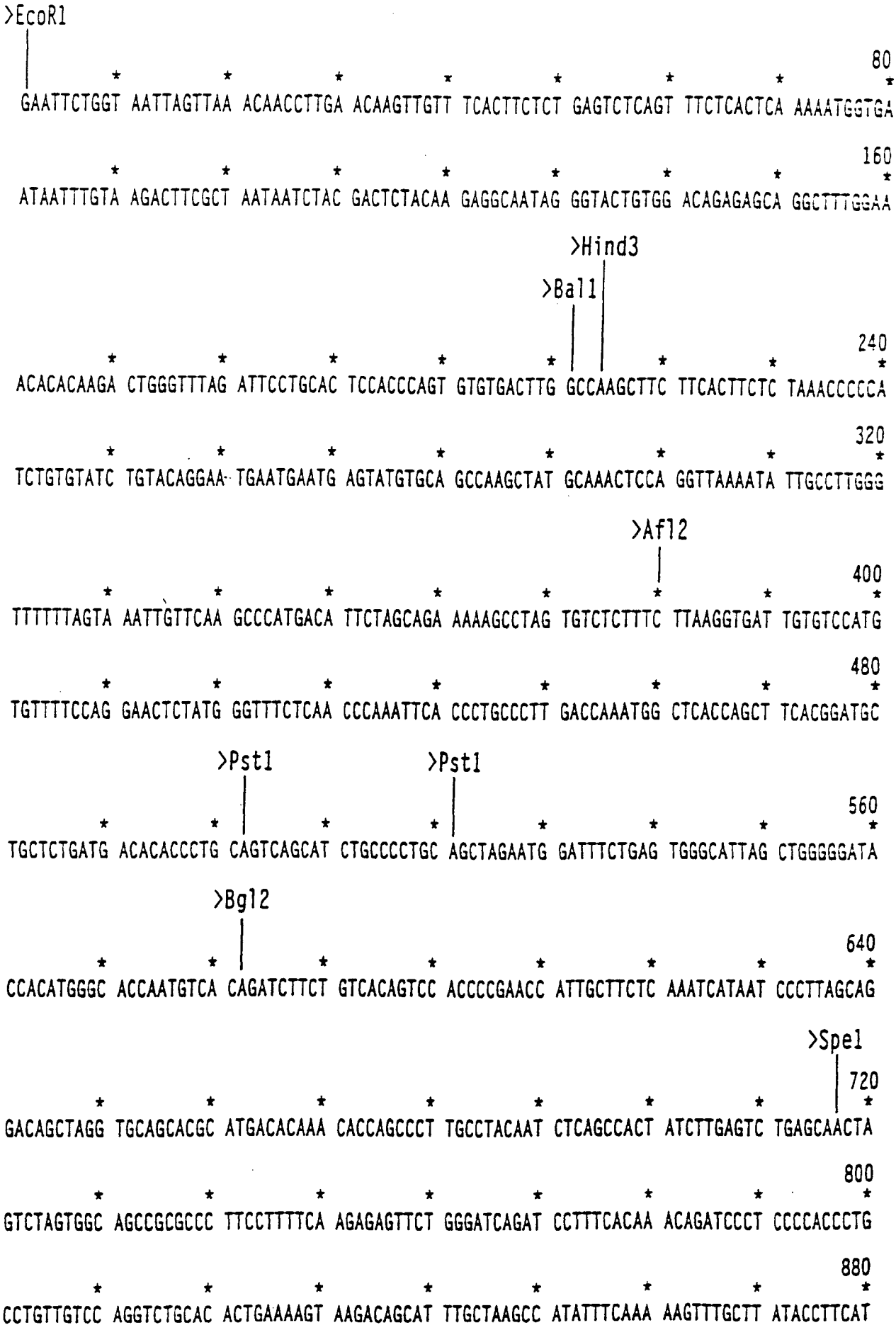

>EcoR1
80
GAATTCTGGT AATTAGTTAA ACAACCTTGA ACAAGTTGTT TCACTTCTCT GAGTCTCAGT TTCTCACTCA AAAATGGTGA
160
ATAATTTGTA AGACTTCGCT AATAATCTAC GACTCTACAA GAGGCAATAG GGTACTGTGG ACAGAGAGCA GGCTTTGGAA
>Hind3
>Ball
240
ACACACAAGA CTGGGTTTAG ATTCCTGCAC TCCACCCAGT GTGTGACTTG GCCAAGCTTC TTCACTTCTC TAAACCCCCA
320
TCTGTGTATC TGTACAGGAA TGAATGAATG AGTATGTGCA GCCAAGCTAT GCAAACTCCA GGTTAAAATA TTGCCTTGGG
>Af12
400
TTTTTTAGTA AATTGTTCAA GCCCATGACA TTCTAGCAGA AAAAGCCTAG TGTCTCTTTC TTAAGGTGAT TGTGTCCATG
480
TGTTTTCCAG GAACTCTATG GGTTTCTCAA CCCAAATTCA CCCTGCCCTT GACCAAATGG CTCACCAGCT TCACGGATGC
>Pst1
>Pst1
560
TGCTCTGATG ACACACCCTG CAGTCAGCAT CTGCCCCTGC AGCTAGAATG GATTTCTGAG TGGGCATTAG CTGGGGGATA
>Bgl2
640
CCACATGGGC ACCAATGTCA CAGATCTTCT GTCACAGTCC ACCCCGAACC ATTGCTTCTC AAATCATAAT CCCTTAGCAG
>Spe1
720
GACAGCTAGG TGCAGCACGC ATGACACAAA CACCAGCCCT TGCCTACAAT CTCAGCCACT ATCTTGAGTC TGAGCAACTA
800
GTCTAGTGGC AGCCGCGCCC TTCCTTTTCA AGAGAGTTCT GGGATCAGAT CCTTTCACAA ACAGATCCCT CCCCACCCTG
880
CCTGTTGTCC AGGTCTGCAC ACTGAAAAGT AAGACAGCAT TTGCTAAGCC ATATTTCAAA AAGTTTGCTT ATACCTTCAT

FIG. 7A

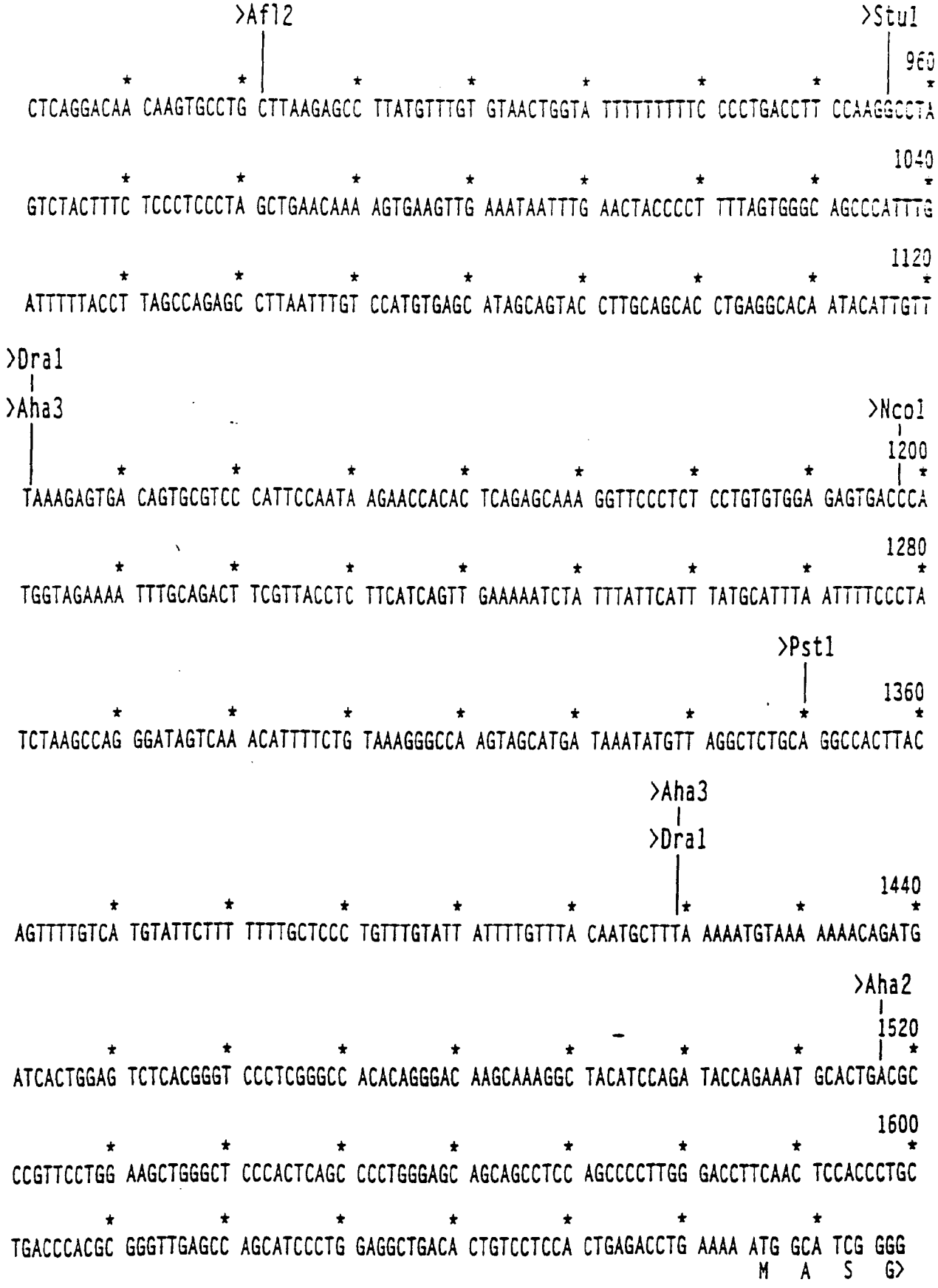

>Af12
>StuI
960
CTCAGGACAA CAAGTGCCTG CTTAAGAGCC TTATGTTTGT GTAACTGGTA TTTTTTTTTC CCCTGACCTT CCAAGGCCTA
1040
GTCTACTTTC TCCCTCCCTA GCTGAACAAA AGTGAAGTTG AAATAATTTG AACTACCCCT TTTAGTGGGC AGCCCATTTG
1120
ATTTTTACCT TAGCCAGAGC CTTAATTTGT CCATGTGAGC ATAGCAGTAC CTTGCAGCAC CTGAGGCACA ATACATTGTT
>Dra1
>Aha3
>NcoI
1200
TAAAGAGTGA CAGTGCGTCC CATTCCAATA AGAACCACAC TCAGAGCAAA GGTTCCCTCT CCTGTGTGGA GAGTGACCCA
1280
TGGTAGAAAA TTTGCAGACT TCGTTACCTC TTCATCAGTT GAAAAATCTA TTTATTCATT TATGCATTTA ATTTTCCCTA
>Pst1
1360
TCTAAGCCAG GGATAGTCAA ACATTTTCTG TAAAGGGCCA AGTAGCATGA TAAATATGTT AGGCTCTGCA GGCCACTTAC
>Aha3
>Dra1
1440
AGTTTTGTCA TGTATTCTTT TTTTGCTCCC TGTTTGTATT ATTTTGTTTA CAATGCTTTA AAAATGTAAA AAAACAGATG
>Aha2
1520
ATCACTGGAG TCTCACGGGT CCCTCGGGCC ACACAGGGAC AAGCAAAGGC TACATCCAGA TACCAGAAAT GCACTGACGC
1600
CCGTTCCTGG AAGCTGGGCT CCCACTCAGC CCCTGGGAGC AGCAGCCTCC AGCCCCTTGG GACCTTCAAC TCCACCCTGC
TGACCCACGC GGGTTGAGCC AGCATCCCTG GAGGCTGACA CTGTCCTCCA CTGAGACCTG AAAA ATG GCA TCG GGG
M A S G>

FIG. 7B

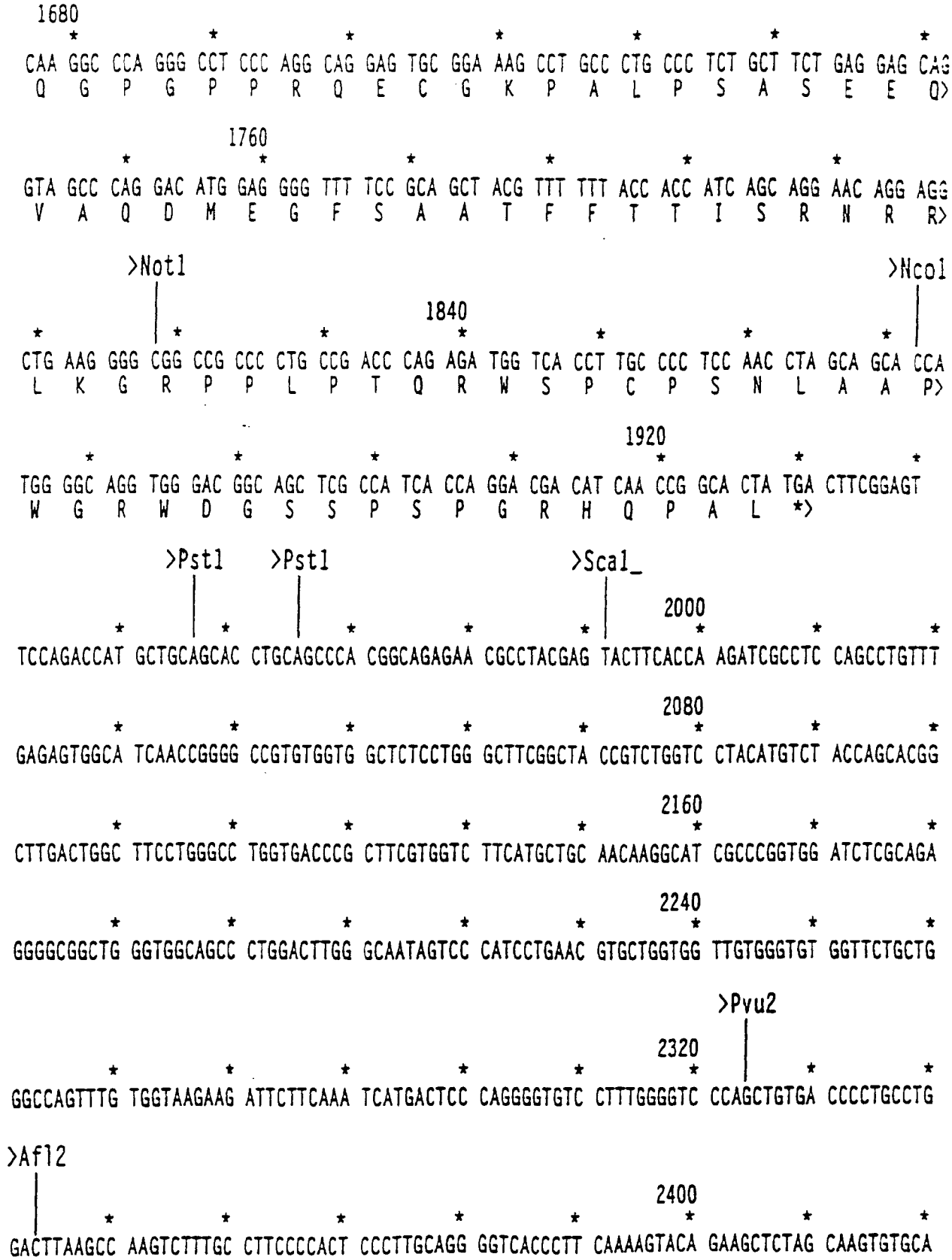

1680
CAA GGC CCA GGG CCT CCC AGG CAG GAG TGC GGA AAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG
Q G P G P P R Q E C G K P A L P S A S E E Q>
1760
GTA GCC CAG GAC ATG GAG GGG TTT TCC GCA GCT ACG TTT TTT ACC ACC ATC AGC AGG AAC AGG AGG
V A Q D M E G F S A A T F F T T I S R N R R>
>Not1
>Nco1
1840
CTG AAG GGG CGG CCG CCC CTG CCG ACC CAG AGA TGG TCA CCT TGC CCC TCC AAC CTA GCA GCA CCA
L K G R P P L P T Q R W S P C P S N L A A P>
1920
TGG GGC AGG TGG GAC GGC AGC TCG CCA TCA CCA GGA CGA CAT CAA CCG GCA CTA TGA CTTCGGAGT
W G R W D G S S P S P G R H Q P A L *>
>Pst1
>Pst1
>Sca1_
2000
TCCAGACCAT GCTGCAGCAC CTGCAGCCCA CGGCAGAGAA CGCCTACGAG TACTTCACCA AGATCGCCTC CAGCCTGTTT
2080
GAGAGTGGCA TCAACCGGGG CCGTGTGGTG GCTCTCCTGG GCTTCGGCTA CCGTCTGGTC CTACATGTCT ACCAGCACGG
2160
CTTGACTGGC TTCCTGGGCC TGGTGACCCG CTTCGTGGTC TTCATGCTGC AACAAGGCAT CGCCCGGTGG ATCTCGCAGA
2240
GGGGCGGCTG GGTGGCAGCC CTGGACTTGG GCAATAGTCC CATCCTGAAC GTGCTGGTGG TTGTGGGTGT GGTTCTGCTG
>Pvu2
2320
GGCCAGTTTG TGGTAAGAAG ATTCTTCAAA TCATGACTCC CAGGGGTGTC CTTTGGGGTC CCAGCTGTGA CCCCTGCCTG
>Af12
2400
GACTTAAGCC AAGTCTTTGC CTTCCCCACT CCCTTGCAGG GGTCACCCTT CAAAAGTACA GAAGCTCTAG CAAGTGTGCA

FIG. 7C

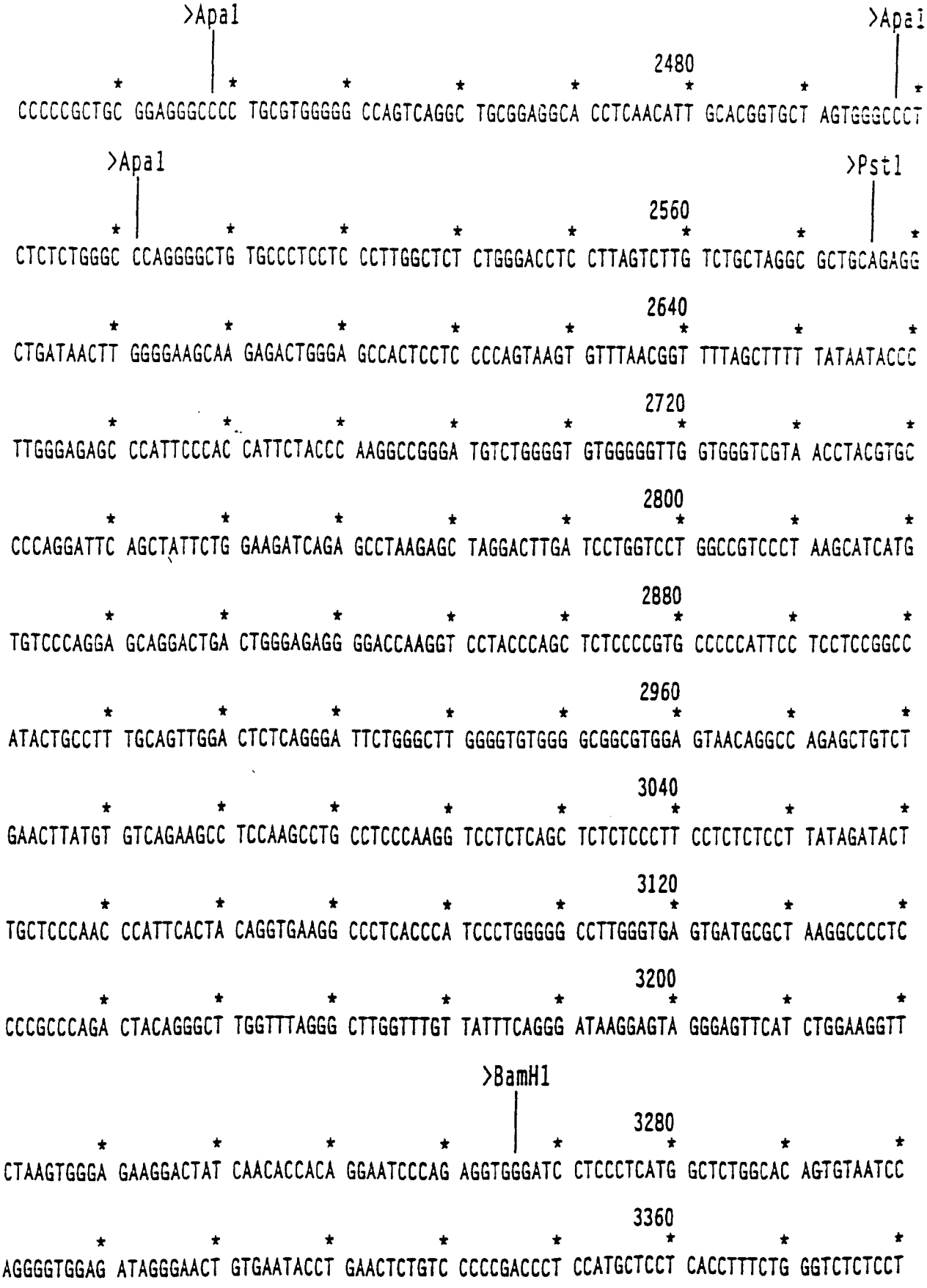

>ApaI
>ApaI
2480
CCCCCGCTGC GGAGGGCCCC TGCGTGGGGG CCAGTCAGGC TGCGGAGGCA CCTCAACATT GCACGGTGCT AGTGGGCCCT
>ApaI
>PstI
2560
CTCTCTGGGC CCAGGGGCTG TGCCCTCCTC CCTTGGCTCT CTGGGACCTC CTTAGTCTTG TCTGCTAGGC GCTGCAGAGG
2640
CTGATAACTT GGGGAAGCAA GAGACTGGGA GCCACTCCTC CCCAGTAAGT GTTTAACGGT TTTAGCTTTT TATAATACCC
2720
TTGGGAGAGC CCATTCCCAC CATTCTACCC AAGGCCGGGA TGTCTGGGGT GTGGGGGTTG GTGGGTCGTA ACCTACGTGC
2800
CCCAGGATTC AGCTATTCTG GAAGATCAGA GCCTAAGAGC TAGGACTTGA TCCTGGTCCT GGCCGTCCCT AAGCATCATG
2880
TGTCCCAGGA GCAGGACTGA CTGGGAGAGG GGACCAAGGT CCTACCCAGC TCTCCCCGTG CCCCCATTCC TCCTCCGGCC
2960
ATACTGCCTT TGCAGTTGGA CTCTCAGGGA TTCTGGGCTT GGGGTGTGGG GCGGCGTGGA GTAACAGGCC AGAGCTGTCT
3040
GAACTTATGT GTCAGAAGCC TCCAAGCCTG CCTCCCAAGG TCCTCTCAGC TCTCTCCCTT CCTCTCTCCT TATAGATACT
3120
TGCTCCCAAC CCATTCACTA CAGGTGAAGG CCCTCACCCA TCCCTGGGGG CCTTGGGTGA GTGATGCGCT AAGGCCCCTC
3200
CCCGCCCAGA CTACAGGGCT TGGTTTAGGG CTTGGTTTGT TATTTCAGGG ATAAGGAGTA GGGAGTTCAT CTGGAAGGTT
>BamH1
3280
CTAAGTGGGA GAAGGACTAT CAACACCACA GGAATCCCAG AGGTGGGATC CTCCCTCATG GCTCTGGCAC AGTGTAATCC
3360
AGGGGTGGAG ATAGGGAACT GTGAATACCT GAACTCTGTC CCCCGACCCT CCATGCTCCT CACCTTTCTG GGTCTCTCCT

FIG. 7D

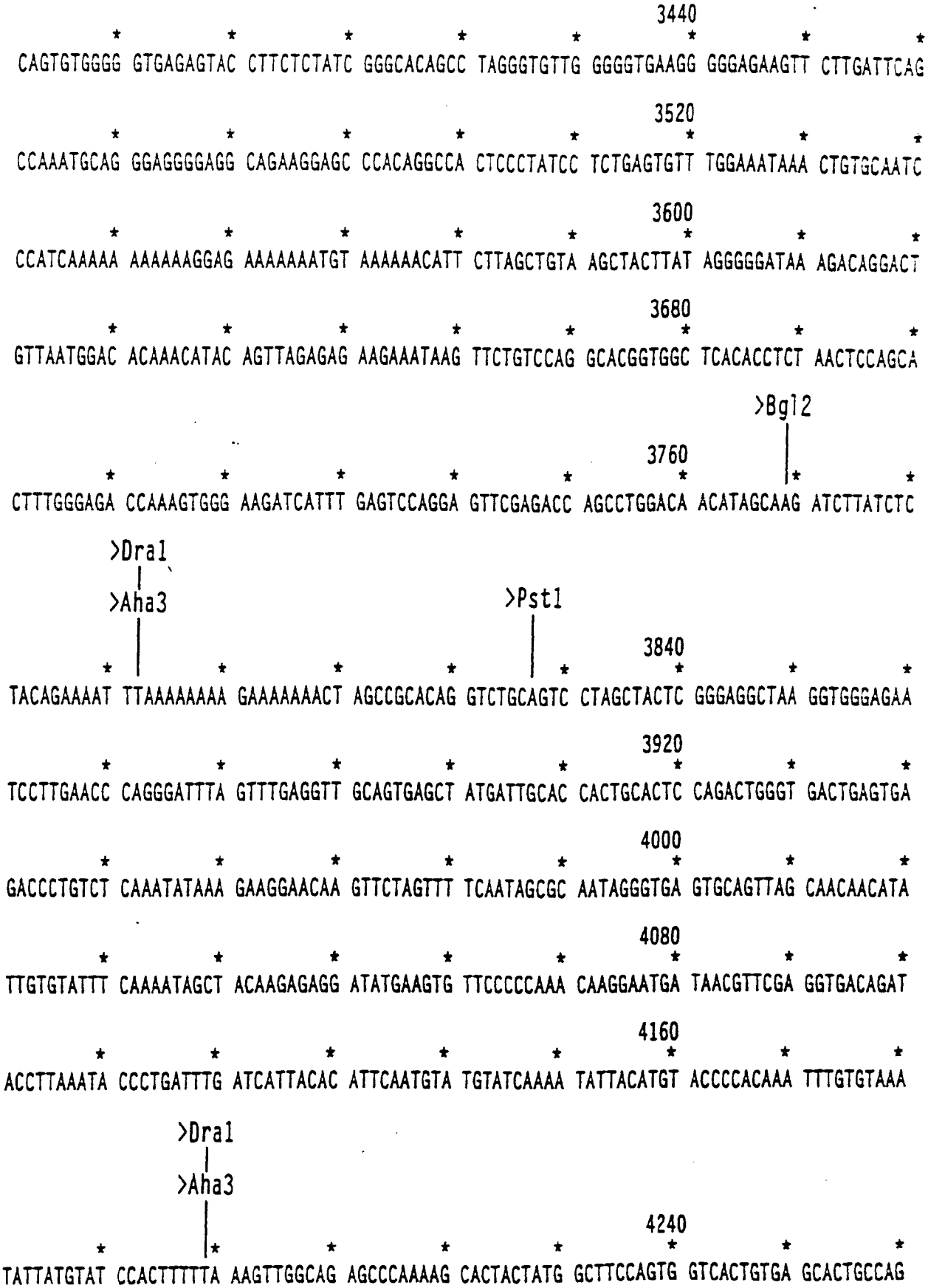

3440
CAGTGTGGGG GTGAGAGTAC CTTCTCTATC GGGCACAGCC TAGGGTGTTG GGGGTGAAGG GGGAGAAGTT CTTGATTCAG
3520
CCAAATGCAG GGAGGGGAGG CAGAAGGAGC CCACAGGCCA CTCCCTATCC TCTGAGTGTT TGGAAATAAA CTGTGCAATC
3600
CCATCAAAAA AAAAAAGGAG AAAAAAATGT AAAAAACATT CTTAGCTGTA AGCTACTTAT AGGGGGATAA AGACAGGACT
3680
GTTAATGGAC ACAAACATAC AGTTAGAGAG AAGAAATAAG TTCTGTCCAG GCACGGTGGC TCACACCTCT AACTCCAGCA
>Bgl2
3760
CTTTGGGAGA CCAAAGTGGG AAGATCATTT GAGTCCAGGA GTTCGAGACC AGCCTGGACA ACATAGCAAG ATCTTATCTC
>Dra1
>Aha3
>Pst1
3840
TACAGAAAAT TTAAAAAAAA GAAAAAAACT AGCCGCACAG GTCTGCAGTC CTAGCTACTC GGGAGGCTAA GGTGGGAGAA
3920
TCCTTGAACC CAGGGATTTA GTTTGAGGTT GCAGTGAGCT ATGATTGCAC CACTGCACTC CAGACTGGGT GACTGAGTGA
4000
GACCCTGTCT CAAATATAAA GAAGGAACAA GTTCTAGTTT TCAATAGCGC AATAGGGTGA GTGCAGTTAG CAACAACATA
4080
TTGTGTATTT CAAAATAGCT ACAAGAGAGG ATATGAAGTG TTCCCCCAAA CAAGGAATGA TAACGTTCGA GGTGACAGAT
4160
ACCTTAAATA CCCTGATTTG ATCATTACAC ATTCAATGTA TGTATCAAAA TATTACATGT ACCCCACAAA TTTGTGTAAA
>Dra1
>Aha3
4240
TATTATGTAT CCACTTTTTA AAGTTGGCAG AGCCCAAAAG CACTACTATG GCTTCCAGTG GTCACTGTGA GCACTGCCAG

FIG. 7E

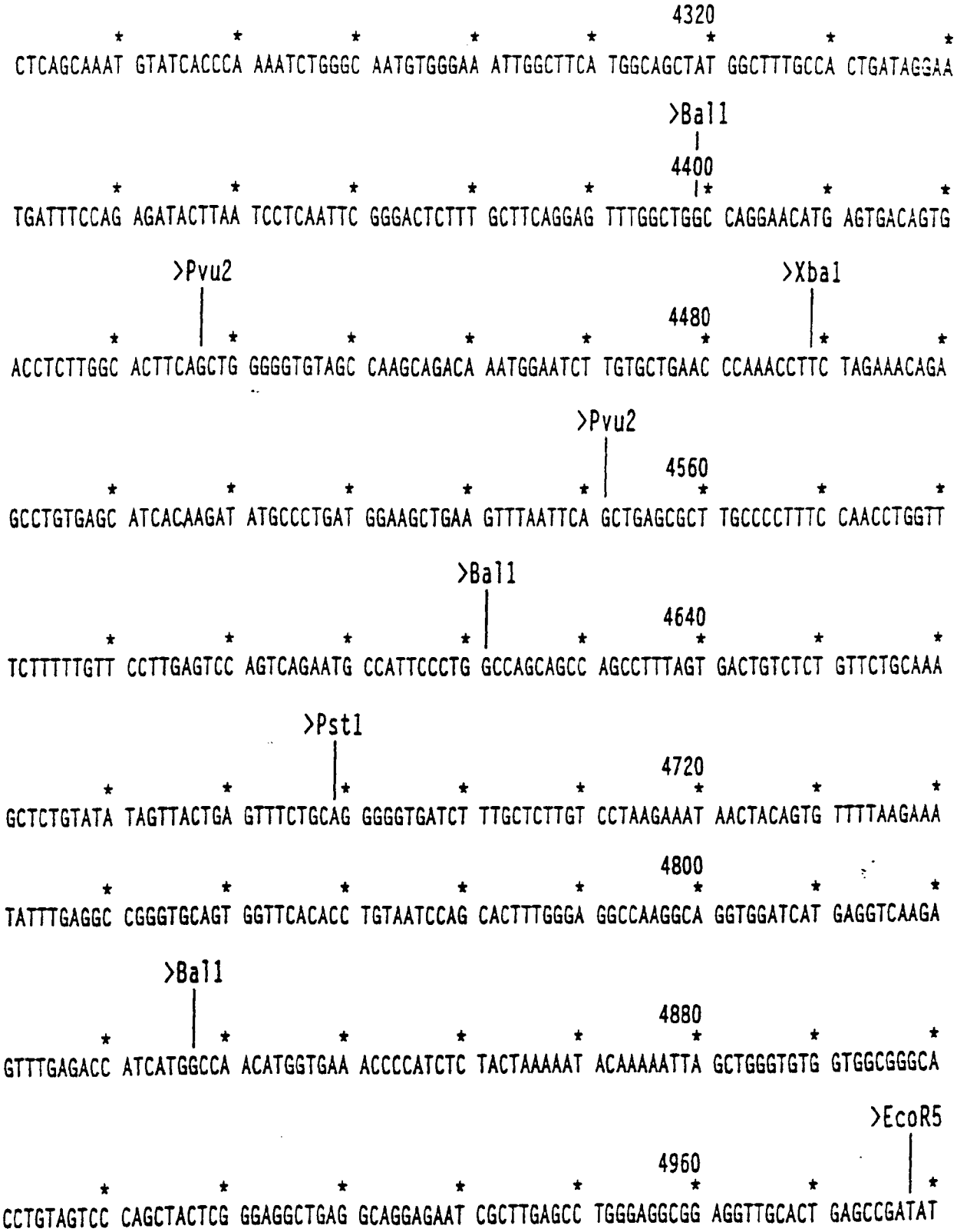

4320
CTCAGCAAAT GTATCACCCA AAATCTGGGC AATGTGGGAA ATTGGCTTCA TGGCAGCTAT GGCTTTGCCA CTGATAGGAA
>Ball
4400
TGATTTCCAG AGATACTTAA TCCTCAATTC GGGACTCTTT GCTTCAGGAG TTTGGCTGGC CAGGAACATG AGTGACAGTG
>Pvu2
>Xbal
4480
ACCTCTTGGC ACTTCAGCTG GGGGTGTAGC CAAGCAGACA AATGGAATCT TGTGCTGAAC CCAAACCTTC TAGAAACAGA
>Pvu2
4560
GCCTGTGAGC ATCACAAGAT ATGCCCTGAT GGAAGCTGAA GTTTAATTCA GCTGAGCGCT TGCCCCTTTC CAACCTGGTT
>Ball
4640
TCTTTTTGTT CCTTGAGTCC AGTCAGAATG CCATTCCCTG GCCAGCAGCC AGCCTTTAGT GACTGTCTCT GTTCTGCAAA
>Pstl
4720
GCTCTGTATA TAGTTACTGA GTTTCTGCAG GGGGTGATCT TTGCTCTTGT CCTAAGAAAT AACTACAGTG TTTTAAGAAA
4800
TATTTGAGGC CGGGTGCAGT GGTTCACACC TGTAATCCAG CACTTTGGGA GGCCAAGGCA GGTGGATCAT GAGGTCAAGA
>Ball
4880
GTTTGAGACC ATCATGGCCA ACATGGTGAA ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAAAATTA GCTGGGTGTG GTGGCGGGCA
>EcoR5
4960
CCTGTAGTCC CAGCTACTCG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAGCC TGGGAGGCGG AGGTTGCACT GAGCCGATAT

FIG. 7F

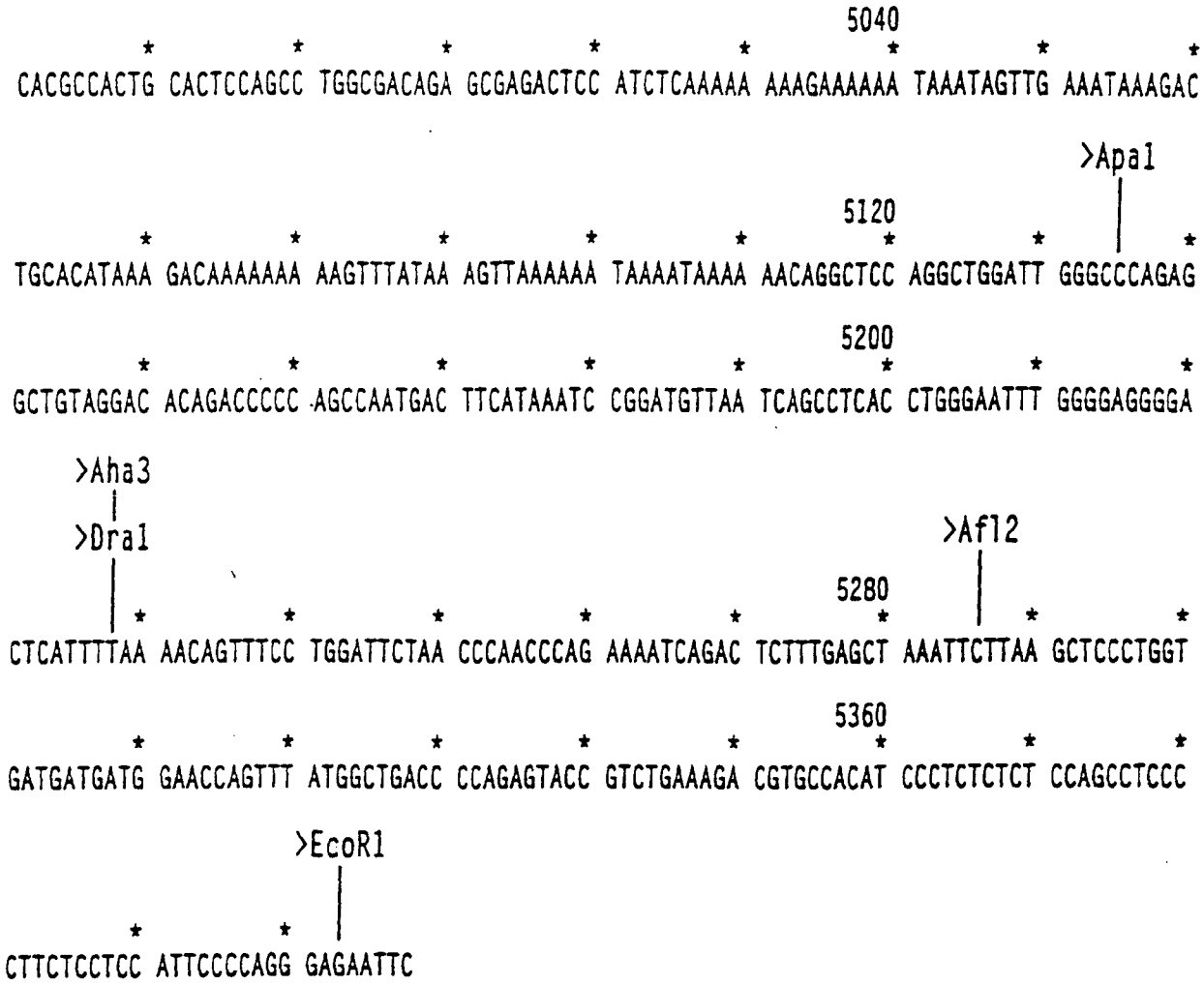

5040
CACGCCACTG CACTCCAGCC TGGCGACAGA GCGAGACTCC ATCTCAAAAA AAAGAAAAAA TAAATAGTTG AAATAAAGAC
>Apa1
5120
TGCACATAAA GACAAAAAAA AAGTTTATAA AGTTAAAAAA TAAAATAAAA AACAGGCTCC AGGCTGGATT GGGCCCAGAG
5200
GCTGTAGGAC ACAGACCCCC AGCCAATGAC TTCATAAATC CGGATGTTAA TCAGCCTCAC CTGGGAATTT GGGGAGGGGA
>Aha3
>Dra1
>Af12
5280
CTCATTTTAA AACAGTTTCC TGGATTCTAA CCCAACCCAG AAAATCAGAC TCTTTGAGCT AAATTCTTAA GCTCCCTGGT
5360
GATGATGATG GAACCAGTTT ATGGCTGACC CCAGAGTACC GTCTGAAAGA CGTGCCACAT CCCTCTCTCT CCAGCCTCCC
>EcoR1
CTTCTCCTCC ATTCCCCAGG GAGAATTC

FIG. 7G

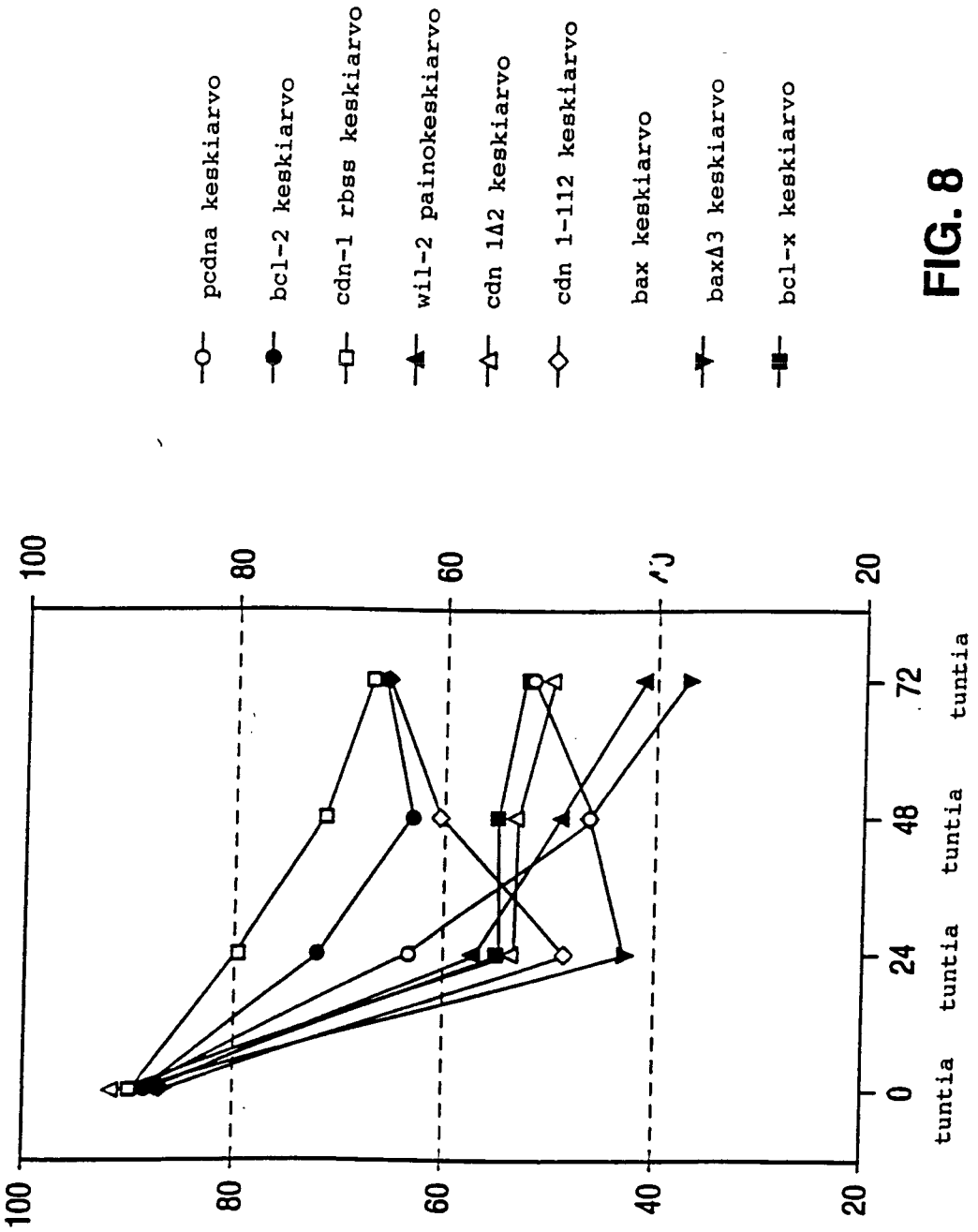

pcdna keskiarvo
bcl-2 keskiarvo
cdn-1 rbss keskiarvo
wil-2 painokeskiarvo
cdn 1Δ2 keskiarvo
cdn 1-112 keskiarvo
bax keskiarvo
baxΔ3 keskiarvo
bcl-x keskiarvo
100
80
60
40
20
0
24
48
72
tuntia
tuntia
tuntia
tuntia
Kolonni 1

FIG. 8

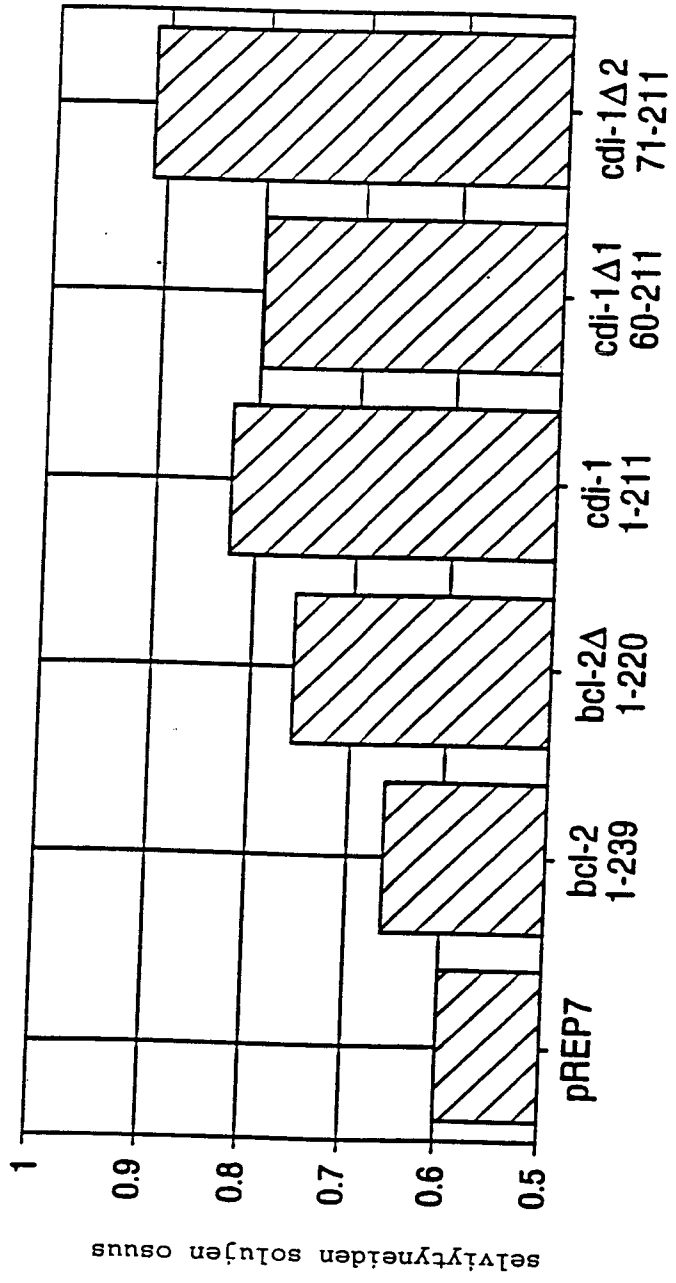

1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
pREP7
bcl-2 1-239
bcl-2Δ 1-220
cdi-1 1-211
cdi-1Δ1 60-211
cdi-1Δ2 71-211

FIG. 9

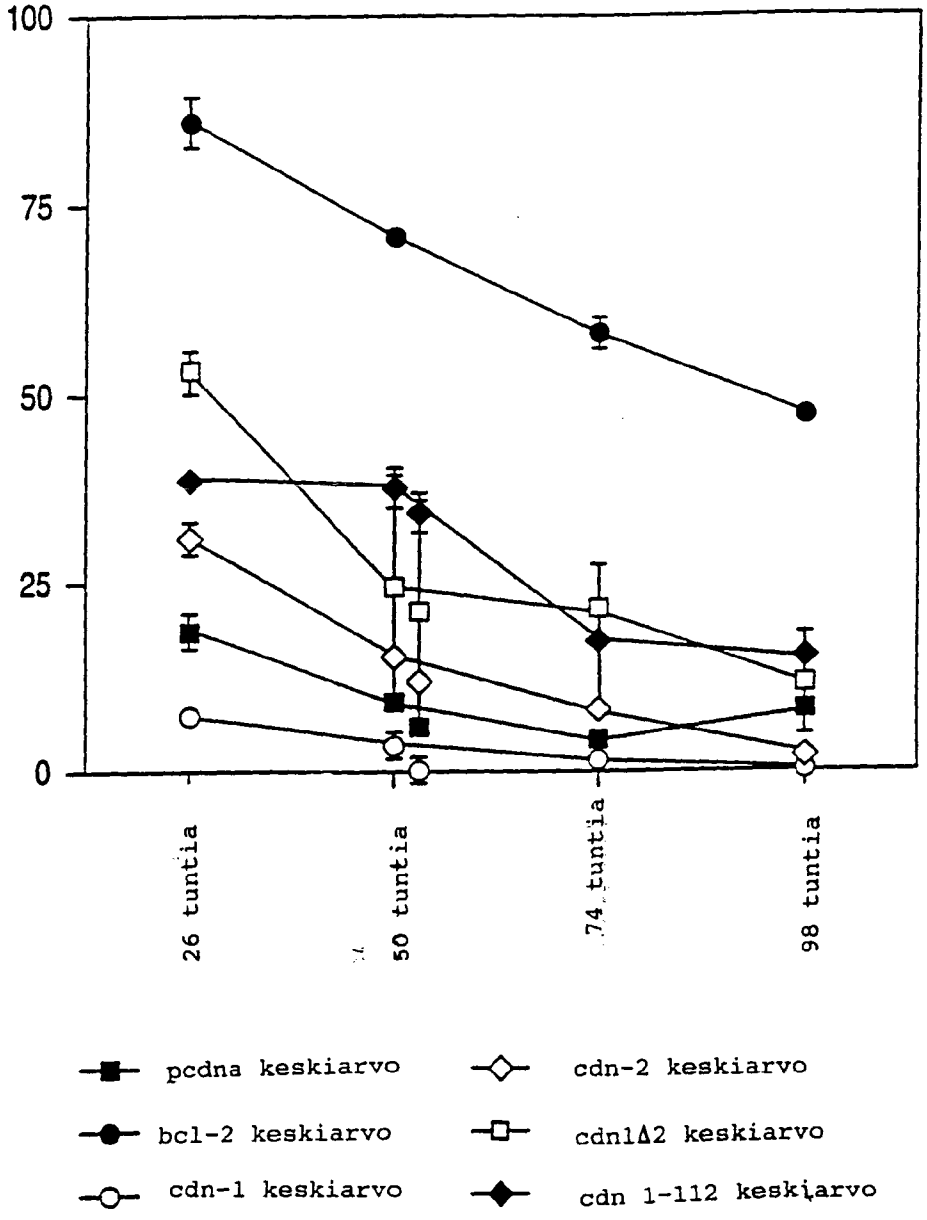

100
75
50
25
0
26 tuntia
50 tuntia
74 tuntia
98 tuntia
pcdna keskiarvo
bcl-2 keskiarvo
cdn-1 keskiarvo
cdn-2 keskiarvo
cdn1Δ2 keskiarvo
cdn 1-112 keskiarvo

FIG. 10

Δ1
MASGQGPGPPRQECGEPALPSASEEQVAQDTEEVFRSYVFYRHQQEQEAEGVAAPADPEMVT

Δ2 Δ3
LPLQPSSTMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGNWGR

VVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHHCIARWIAQRGGWVAALNLGNGPILN

VLVVLGVVLLGQFVVRRFFKS

FIG. 11